

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Robinia pseudoacacia* VE *Robinia hispida* BİTKİ ÖZÜTLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN, FENOLİK VE MİNERAL BİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

Betül KARA

AĞUSTOS-2022
GÜMÜŞHANE



T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Robinia pseudoacacia* VE *Robinia hispida* BİTKİ ÖZÜTLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN, FENOLİK VE MİNERAL BİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES, PHENOLIC AND
MINERAL COMPOSITIONS OF *Robinia pseudoacacia* AND *Robinia hispida*
PLANT EXTRACTS**

YÜKSEK LİSANS

Betül KARA

**AĞUSTOS-2022
GÜMÜŞHANE**



T.C.

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

***Robinia pseudoacacia* VE *Robinia hispida* BİTKİ ÖZÜTLERİNİN BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN, FENOLİK VE MİNERAL BİLEŞİMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES, PHENOLIC AND
MINERAL COMPOSITIONS OF *Robinia pseudoacacia* AND *Robinia hispida*
PLANT EXTRACTS**

YÜKSEK LİSANS

Betül KARA

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nesibe ARSLAN BURNAZ

AĞUSTOS-2022

GÜMÜŞHANE

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans olarak hazırlamış olduğum “*Robinia pseudoacacia* ve *Robinia hispida* Bitki Özütlerinin Biyolojik Aktivitelerinin, Fenolik ve Mineral Bileşimlerinin Araştırılması” isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

22/08/2022

.....
Betül KARA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecimde bilgileri ile beni aydınlatan, çalışmalarında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nesibe ARSLAN BURNAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma sınavı jüri üyesi hocalarım Sayın Prof. Huri İLYASOĞLU ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayça AKTAŞ KARAÇELİK'a değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Teze konu olan bitkilerin tanımlanmasını yapan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bülent AKAR hocaya teşekkür ederim.

Yine enzim inhibisyon çalışmalarında bana yardımcı olan Prof. Dr. Sevim Beyza ÖZTÜRK SARIKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, başaracağıma olan inançlarını kaybetmeyen ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen annem Nazmiye KARA, babam Temel KARA ve kardeşlerim Okan KARA ile İlayda ALBAYRAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak yürüdüğüm bu yolda beni hiç yalnız bırakmayan, tüm zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan eşim Kadir AKTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu Yüksek Lisans Tezi GÜBAP 2907: Lisansüstü Öğrenci Destek Programı tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 21.E0102.07.01).

Betül KARA
GÜMÜŞHANE – 2022

ÖZET

Diyabet hastalığı dünyada en sık rastlanılan hastalıklar arasındadır. Organizmada oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulmasıyla oluşan oksidatif stres diyabet hastalığının nedenleri arasındadır. Bununla birlikte, karbonhidrat yıkım mekanizmasında görevli olan α -glukozidaz enziminde oluşan değişiklikler de diyabete yol açar.

Bu çalışmada, halk arasında yalancı akasya olarak bilinen *Robinia pseudoacacia* (beyaz çiçekli) ve *Robinia hispida* (pembe çiçekli) bitkilerinin farklı çözücü ve konsantrasyonlarda hazırlanan toprak üstü kısımlarına ait özütleri kullanılmıştır. Bu özütlerde TPC, TFC, DPPH ve ABTS, FRAP, CUPRAC metotları ile antioksidan aktiviteleri ve α -glukozidaz inhibisyonu metodu ile antidiyabetik aktiviteleri belirlenmiştir. Kromatografik LC-MS/MS analizi ile bitkilerdeki fenolik bileşikler ve miktarları karşılaştırılmıştır. ICP-MS analizi ile mineral içerikleri belirlenmiştir. Ayrıca bitki özütlerinin renk analizi yapılmıştır.

Bitki özütlerinin içeriği fenolik ve flavonoid madde açısından farklılık göstermekle birlikte, çözücü tipi ve konsantrasyonunun içeriğin belirlenmesinde önemli bir etken olduğu görülmüştür. İki bitki türü karşılaştırıldığında ise pembe akasya çiçek ve yapraklarına ait özütler TPC, TFC, FRAP, CUPRAC, ABTS ve DPPH açısından daha iyi aktivite sergilemiştir. Enzim inhibisyonu çalışmasında en yüksek antidiyabetik aktiviteyi pembe akasya çiçek özütleri göstermiştir. Mineral analizi sonuçlarında özütlerde en yüksek miktarda bulunan element potasyum olarak bulunmuştur.

Biyolojik olarak aktif özütlerin tanımlanması, temel biyolojik bilimler, farmasötik uygulamalar ve gelecekteki araştırmalar için çok önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Antidiyabetik, Antioksidan, Mineral içerik, *Robinia pseudoacacia*, *Robinia hispida*.

SUMMARY

Diabetes is among the most common diseases in the world. Oxidative stress, which occurs when the balance between oxidant and anti-oxidant systems in the organism is disrupted in favor of oxidants, is among the causes of diabetes. However, changes in a α -glucosidase enzyme that is involved in the carbohydrate breakdown mechanism also lead to diabetes.

In this study, extracts of the above-ground parts of *Robinia pseudoacacia* (white flowered) and *Robinia hispida* (pink flowered) plants, popularly known as locust, prepared in different solvents and concentrations were used. In these extracts, antioxidant activities were determined by TPC, TFC, DPPH and ABTS, FRAP, CUPRAC methods and antidiabetic activities were determined by α -glucosidase inhibition method. Phenolic compounds in plants and their amounts were compared with chromatographic LC-MS/MS analysis. Mineral contents were determined by ICP-MS analysis. In addition, color analysis of plant extracts were made.

Although the content of plant extracts differed in terms of phenolic and flavonoid substances, it was observed that the solvent type and concentration were an important factor in determining the content. When the two plant species were compared, extracts of pink acacia flowers and leaves showed better activity in terms of TPC, TFC, FRAP, CUPRAC, ABTS and DPPH. In the enzyme inhibition study, bristly locust flower extracts showed the highest antidiabetic activity. In the results of mineral analysis, the element with the highest amount in the extracts was found to be potassium.

The identification of biologically active extracts is crucial for basic biological sciences, pharmaceutical applications, and future research.

Keywords: Antidiabetic, Antioxidant, Mineral content, *Robinia pseudoacacia*, *Robinia hispida*.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	III
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Serbest Radikal Türleri	4
2.2. Oksidatif Stres.....	5
2.2.1. Oksidatif Stresin Biyomoleküllere Etkisi	6
2.3. Antioksidanlar.....	7
2.3.1. Endojen Antioksidanlar.....	8
2.3.2. Eksojen Antioksidanlar	9
2.4. Diyabet.....	11
2.4.1. Diyabetin Sınıflandırılması.....	13
2.4.2. Diyabetin Oksidatif Stres ile İlişkisi	14
2.4.3. Diyabetin Tedavisinde Antidiyabetik İlaçlar	15
2.5. Enzimler.....	15
2.5.1. Enzim İnhibisyonunun İlaç Üretimindeki Önemi.....	16
2.5.2. Alfa-glukozidaz (E.C:3.2.1.20)	16
2.6. <i>Robinia</i> Türleri.....	16
2.6.1. <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	17
2.6.2. <i>Robinia hispida</i> L.	18
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	20
3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Malzemeler.....	20
3.2. Kullanılan Kimyasallar	20
3.3. Bitkilerin Toplanması ve Hazırlanması	21
3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (TPC)	24

3.5. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini (TFC)	24
3.6. Bitkilerin Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi	25
3.6.1. ABTS ⁺ Radikali Temizleme Yöntemi	25
3.6.2. DPPH Radikali Temizleme Yöntemi.....	25
3.6.3. Demir (Fe ⁺³) İndirgeyici Güç Yöntemi (FRAP).....	25
3.6.4. Cu ⁺² İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi.....	26
3.7. Bitkilerin Antidiyabetik Etkilerinin Belirlenmesi	26
3.8. Bitki Özütlерinde HPLC-MS/MS Analizi	27
3.8.1. LC-MS/MS Şartları	27
3.9. Bitki Özütlерinde Renk Analizi	28
3.10. Bitki Özütlерinde ICP-MS Analizi.....	28
3.10.1. ICP-MS Şartları.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Bulguları	29
4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini Bulguları	30
4.3. ABTS Analizi Bulguları	32
4.4. DPPH Analizi Bulguları	34
4.5. FRAP Analizi Bulguları	35
4.6. CUPRAC Analizi Bulguları	37
4.7. Alfa-glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Analizi Bulguları.....	39
4.8. HPLC-MS/MS Analizi Bulguları	40
4.9. Renk Analizi Bulguları	43
4.10. ICP-MS Analizi Bulguları	44
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	52
KAYNAKÇA.....	55
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Oksidatif stresin oluşmasına yol açan serbest radikaller	5
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	20
Tablo 3. Farklı çözücülerle elde edilmiş bitki özütlerinin kodları	23
Tablo 4. LC analizinde kullanılan gradient akış programı.....	27
Tablo 5. Beyaz ve pembe akasya bitkilerinin çiçek ve yaprak özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması	40
Tablo 6. LC/MS-MS analizi çalışma parametreleri	41
Tablo 7. Bitki özütlerinin LC/MS-MS analizi sonuçları.....	42
Tablo 8. Beyaz akasya özütlerinin renk değerleri	43
Tablo 9. Pembe akasya özütlerinin renk değerleri	43
Tablo 10. Analizde standart olarak kullanılan minerallerin kalibrasyon parametreleri ..	45
Tablo 11. <i>Robinia pseudoacacia</i> ve <i>Robinia hispida</i> bitkilerinin çiçek ve yapraklarının mineral içerikleri (mg/kg)	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Oksidatif stres ile gelişebilecek kronik hastalıklara örnekler	6
Şekil 2. Benzoik asitler.	10
Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı.....	10
Şekil 4. <i>Robinia pseudoacacia</i> L.	18
Şekil 5. <i>Robinia hispida</i> L.....	19
Şekil 6. <i>Robinia pseudoacacia</i> (beyaz akasya) ve <i>Robinia hispida</i> (pembe akasya).....	21
Şekil 7. Toz haline getirilmiş çiçek ve yaprak kısımları.	22
Şekil 8. Ultrasonik banyo ile ekstraksiyon işlemi.....	22
Şekil 9. Santrifüj sonrası süzme işlemi ve elde edilen özütler.....	23
Şekil 10. Toplam fenolik madde tayini yönteminde gallik asitin standart kalibrasyon grafiği.....	29
Şekil 11. Bitkilerin çiçek özütlerinin toplam fenolik madde miktarları (mg/100g özüt)	29
Şekil 12. Bitkilerin yaprak özütlerinin toplam fenolik madde miktarları (100 g özütteki).....	30
Şekil 13. Toplam flavonoid madde tayini yönteminde kateşinin standart kalibrasyon grafiği.....	31
Şekil 14. Bitkilerin çiçek özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları (mg/100g özüt)	31
Şekil 15. Bitkilerin yaprak özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları (mg/100g özüt)	31
Şekil 16. ABTS•+ radikali temizleme aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği	32
Şekil 17. Bitkilerin çiçek özütlerinin 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi	33
Şekil 18. Bitkilerin yaprak özütlerinin 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi	33
Şekil 19. DPPH• radikali temizleme aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği	34
Şekil 20. Bitkilerin çiçek özütlerinin 515 nm'deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi	34
Şekil 21. Bitkilerin yaprak özütlerinin 515 nm'deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi	35
Şekil 22. FRAP aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği	36

Şekil 23. Bitkilerin çiçek özütlerinin 595 nm'deki FRAP değerleri (TEAC; mg/L)	36
Şekil 24. Bitkilerin yaprak özütlerinin 595 nm'deki FRAP değerleri (TEAC; mg/L) ...	36
Şekil 25. CUPRAC aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği	37
Şekil 26.Bitkilerin çiçek özütlerinin 450 nm'deki CUPRAC değerleri (TEAC; mg/mL)	38
Şekil 27.Bitkilerin yaprak özütlerinin 450 nm'deki CUPRAC değerleri (TEAC; mg/mL)	38
Şekil 28.α-Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan beyaz akasya çiçeğinin etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği	39
Şekil 29.α-Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan beyaz akasya yaprağının etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği...	39
Şekil 30.α-Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan pembe akasya çiçeğinin etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği	39
Şekil 31.α-Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan pembe akasya yaprağının etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: mikrolitre
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
8-OHdG	: 8-hidroksi deoksiguanozin
ABT	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikasit)
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AlCl_3	: Alüminyum klorür
CAT	: Katalaz
Cm	: santimetre
Cu^{+2}	: Bakır (II) katyonu
CuCl_2	: Bakır (II) klorür
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	: 2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil
e^-	: Elektron
FAD	: Flavın adenin dinükleotid
Fe^{+2}	: Demir (II) katyonu
Fe^{+3}	: Demir (III) katyonu
FeCl	: Demir (III) klorür
FRAP	: Demir indirgeyici antioksidan güç t
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
H_2O_2	: Hidrojen Peroksid
HNO_2	: Nitrik asit
HOB _r	: Hipobromöz asit
HOCl	: Hipokloröz asit
IDDM	: İnsüline bağımlı diyabet
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	: Potasyum persülfat
LOO^-	: Lipid peroksil
M	: metre
M.Ö	: Milattan önce

ME	: Milli Eğitim Bakanlığı
mL	: mililitre
mM	: milimolar
N ₂ O ₃	: Dinitrojen trioksit
N ₂ O ₄	: Dinitrojen tetroksid
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
NH ₄ Ac	: Amonyum asetat
Nm	: nanometre
NO ⁻	: Nitrik Oksit
NO ⁺	: Nitroksil katyonu
NO ₂	: Azot Dioksit
NO ₂ ⁻	: Nitrojen dioksit
NO ₂ ⁺	: Nitronyum katyonu
NO ₂ Cl	: Nitril klorid
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
O ₃	: Ozon
OH ⁻	: Hidroksil radikali
ONOO	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitrik asit
ORAC	: Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RO ⁻	: Alkoksil
ROO ⁻	: Peroksil
ROONO	: Alkil peroksinitrit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
t.y.	: Tarihi yok
TEMED	: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TBARS	: Tiyoarbitürik asit reaktif maddeler
TFC	: Toplam flavonoid madde miktarı
TPC	: Toplam fenolik madde miktarı

TPTZ : 2,4,6-tripiridil-triazin
vd. : ve diğlerleri, ve devamı
WHO : Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

İnsanların beslenme şekilleri, hayat şartları ve teknolojinin de hızla gelişimi sonucu ortaya çıkan stres faktörleri, organizmada serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Çevresel faktörler ve vücutta gerçekleşen metabolizma olayları sonucunda oluşan serbest radikallerin miktarı, dengeyi bozacak şekilde arttığında oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres, canlı dokusundaki oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur. Oksidatif stresi yok etmek için gerekli olan en önemli maddeler antioksidanlardır (Kisaoglu vd., 2013). Antioksidanlar oksidatif stres sonucu oluşan, ortaklaşmamış e- içeren serbest radikalleri tutarak etkisiz hale getirir ve böylece hücre hasarını engeller (Aslankoç vd., 2019). Antioksidanlar hem vücut tarafından üretilir hem de dışarıdan beslenme yolu ile alınabilirler. E vitamini, C vitamini ve fenolik bileşikler dışarıdan alınan antioksidanların başında gelir (Siti vd., 2015). Serbest radikal süpürücü olarak tanınan antioksidanlar, güçlü aktiviteleri sayesinde serbest radikallerin neden olduğu, metabolizma faaliyetleri sonucu ortaya çıkan olumsuz durumları ve hastalıkları büyük oranda engelleyerek bağışıklık sistemine yardımcı olurlar (Burdock, 1998).

Dokularda serbest radikal miktarının artması birçok hastalığa sebebiyet vermektedir. Kardiyolojik hastalıklar, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, demans ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıkların yanı sıra kanser ve diyabet (*Diabetes mellitus*) hastalığının da oksidatif stres ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Sezer ve Keskin, 2014). *Diabetes mellitus* (DM), insülin yetersizliği ile ortaya çıkan, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklarla devam eden endokrin bir metabolizma hastalığıdır (Vantyghema vd., 2009). Birçok hastalıkta olduğu gibi diyabet hastalığının da meydana gelmesine sebep olan oksidatif stres faktörü ile antioksidan oranı arttırılarak engellenebileceği bildirilmiştir. Diyabet hastalığında antioksidanların yetersiz kalması nedeniyle oksidan-antioksidan dengesi oksidanlar yönüne artarak denge bozulmuş durumdadır (Mai vd., 2007).

Bitkiler ve bitkisel ilaçlar içerdikleri fenolik bileşikler sayesinde oksidatif stresin neden olduğu birçok hastalığın tedavisinde kullanılırlar (Grassi vd., 2010).

Diyabet hastalığının tedavi yöntemlerinde birden fazla bitkinin kullanılabildiği ve bu bitkilerin kandaki glukoz seviyesini azaltarak antidiyabetik etki gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (Mai vd., 2007; Coman vd., 2012; Jerang vd., 2013; Salehi vd., 2019)

Antidiyabetik aktivite belirlemede karbonhidrat yıkım mekanizmasında görev yapan α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyon testi kullanılmaktadır (Alqahtani, vd., 2020). Bitki polifenollerinin bu enzimleri inhibe etme özelliği olduğunu gösteren örnek çalışma bulunmaktadır. Dutta, yeşil çayda alfa glukozidaz enziminin inhibisyonunu sağlayan fenolik moleküller bulunmuştur (Mai vd., 2007).

Günümüzde hastalıkların tedavi edilmesinde; yan etkisinden dolayı yapay antioksidanlardan ziyade doğal antioksidanların kullanımına olan ilgi artmış durumdadır. Yıllar boyunca yapılan çalışmalarda, tıbbi olarak önem taşıyan bitkilerden elde edilen özütlerin içinde bulundurduğu bileşikler ve özellikle de antioksidan aktivite gösteren sekonder metabolitlerin bu konudaki önemi vurgulanmıştır. Aynı zamanda bitki özütlerinin içerisinde tedavi edici biyoaktif bileşikler barındırdığını bildiren örnek çalışma bulunmaktadır (Al-Dabbas vd., 2006).

Fabaceae familyasına ait olan *Robinia* türleri ülkemizde halk arasında akasya olarak bilinmektedir. Çok yıllık ağaçlar olup, *Robinia pseudoacacia* beyaz çiçekli yalancı akasya, *Robinia hispida* pembe çiçekli gül akasya olarak bilinir. Türkiye’de Kuzey Anadolu’da yayılım gösteren ağaçlardır (Bahçesel, t.y.).

Ülkemizin doğal zenginliklerinden olan *Robinia* türleri süs bitkisi olarak kullanılmasının yanı sıra literatürde birçok çalışmaya konu olmuş ve biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. Araştırmalarda, bitkisel ilaç alternatifi üretebilmek için yapılan biyolojik aktivite analizlerinin en önemlilerinden biri de enzim inhibisyonu aktivitesi analizleridir. Canlı metabolizmasında dengeyi sağlayabilmek için bazı enzimlerin belirli miktarlarda inhibe edilmesi birçok hastalığın tedavisine yardımcı olmaktadır. Literatürde *Robinia pseudoacacia*’nın asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibisyon aktivitesi gösterdiğine ve ilaç alternatifi olarak kullanılabileceğine ilişkin çalışma mevcuttur (Orhan vd., 2004).

Robinia hispida türüne ilişkin sınırlı sayıda çalışma olup, bu tez çalışmasında her iki türün farklı kısımlarının (çiçek ve yaprak) α -glukozidaz enzim inhibisyonu, fenolik bileşen karakterizasyonu, antioksidan aktivite tayini ve mineral içeriği detaylı olarak araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Serbest Radikaller

Elektron parçacıkları orbital olarak adlandırılan alanlarda kendilerine özgü bir yörüngede dönme hareketi ile yer değiştirirler. Bu orbitaller içerisinde çoğunlukla zıt yönde hareket eden 2 adet elektron bulundurlar. Serbest radikaller, büyük molekül ağırlığına sahip olmayan, yapısında eşlenmemiş elektron bulunduran, kararsız yapıda moleküllerdir (Halliwell vd., 1985; Bast vd., 1991). Çok etkili moleküller olarak bilinen serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren parçacıkların, elektron transfer zincirinde oluşan elektronlarla yer değiştirmesi ile veya oksidaz molekülleriyle gerçekleştirdikleri tek elektron transferiyle oluşurlar. Serbest radikaller, molekülün yapısında olan bağların homolitik olarak parçalanmasıyla ve içerdiği tüm elektronların başka atomlar üzerinde kalması ile de meydana gelmektedirler (Young, vd., 2001; Cherubini, vd., 2005).

Serbest radikal moleküllerine yapısal olarak benzerlik gösteren bir molekül de oksijendir. Oksijen molekülü reaktiflik özelliği taşımamasına rağmen diğer radikal molekülleri ile reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Elektron dağılımında iki elektronu da eşlenmemiş durumdadır ve bu nedenle oksijen bazen bir radikal olarak görülmektedir (Vincent, vd., 2004; Cherubini, vd., 2005).

Serbest radikal oluşum nedenleri;

- Uyuşturucu,
- Alkol,
- Travma,
- İskemi,
- Aktive olmuş fagositler,
- Stres,
- Çevresel faktörler,
- Endoplazmik retikulum e-transport sistemleri,

• Ksantin oksidaz: Hücresel enerjinin azalması ve hücreler arasında fazla oluşan kalsiyum proteazı aktive eder ve ksantin dehidrogenaz molekülünü ksantin oksidaza dönüştürür. Bu enzim, ksantinün ürik aside dönüşmesini sağlayarak bu reaksiyon sırasında O_2 molekülünün meydana gelmesine sebep olur.

- Mitokondriyal elektron (e^-) transportu: Hücrelerde en çok etkili olan serbest radikal oluşum kaynağı olarak tanımlanır. Elektron taşınması sırasında, dışarıda kalan elektronların O_2 molekülünü indirgemesi ile reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur.

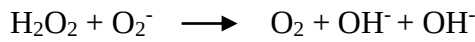
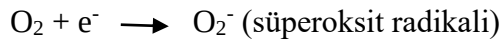
- Hemoglobin yıkımı,

- Peroksizomlarda bulunan oksidazlar: Hidrojen peroksit oluşmasına neden olurlar.

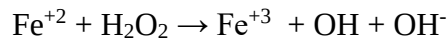
- Araşidonik asit metabolizması: Lipooksijenaz ve siklooksijenaz, reaksiyon sırasında ROS oluşumuna neden olur (Demir, 2010).

2.1.1. Serbest Radikal Türleri

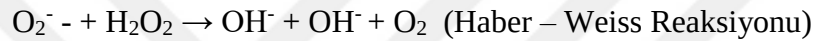
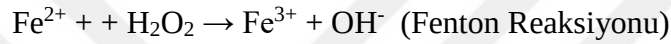
Süperoksit Radikali (O_2^-), oksijenli solunum yapan hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşmaktadır. Elektron taşıyıcılarının oksidasyonu ile süperoksit radikalinin oluşması ortamda bulunan oksijen miktarına göre değişmektedir. O_2^- radikalinin oksidan özelliğinin az olmasından dolayı büyük ölçüde hücre hasarı oluşturacağı düşünülmemektedir. Ancak kendisi büyük bir hasar oluşturmaya bile hücrelerde oksidatif strese sebep olabilecek birden fazla reaksiyonun oluşumuna neden olmaktadır. Fe^{+2} kationunun bulunduğu ortamda hidrojen peroksit ve oksijen molekülü bir araya gelerek çok etkin bir radikal olan hidroksil radikalinin (OH^-) ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Oluşan bu radikal DNA ve diğer moleküllerle etkileşime girerek hücrede çok büyük hasarların oluşmasına yol açmaktadır (Akyol, 2007; Tokaç, 2007).



Hidroksil radikali (OH^-), oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin en etkin olanı olarak bilinmektedir. Bu radikal, Cu^{+2} ve Fe^{+2} kationlarının hidrojen peroksit (H_2O_2) radikali ile etkileşime girmesi sonucu ortaya çıkan bir radikaldir. H_2O_2 radikalinin büyük toksisite özelliğine sahip olması OH^- radikalinden kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda OH^- radikalinin aromatik halkalara katılabilme özelliği vardır. DNA ve RNA moleküllerinde bulunan bazların halkasal yapısına dahil olabildiği için serbest radikal oluşumuna yol açmaktadır. DNA'nın temel elemanlarından olan baz ve şeker yapılarına zarar vererek DNA'nın sarmal zincirinde kırılmalara neden olmaktadır. Hücrelerde oluşan bu hasarlar çok büyük ölçüde olduğunda tamir mekanizmaları etki gösterememekte ve baz yapılarındaki değişiklik, hücre ölümü, mutasyon gibi olaylarla sonuçlanmaktadır (Emecen, 2009).



Hidrojen peroksit radikali, yapısında eşleşmemiş elektron olmadığı halde serbest radikal türleri arasına dahil olmaktadır. Başka metaller veya radikaller ile etkileşime girerek reaksiyon sonucu ortaya çıkan moleküller ona bu özelliği kazandırmaktadır. O_2^- radikalinin bulunduğu ortamda Haber-Weiss reaksiyonu gerçekleştirerek veya Fe^{+2} katyonu ile etkileşim yaparak Fenton reaksiyonunu gerçekleştirmesi ile moleküllere zarar veren ve hücre hasarlarına neden olan OH^- radikalinin oluşmasına yol açmaktadır (Jomova ve Valko, 2011). Reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türleri Tablo 1’de listelenmiştir.



Tablo 1. Oksidatif stresin oluşmasına yol açan serbest radikaller (Uzunboy, 2015).

1. ROS	Radikaller	Hidroksil	$\text{OH}^\bullet$
		Süperoksit	$\bullet\text{O}_2^-$
		Hidroperoksil	$\text{HO}_2^\bullet$
		Peroksil	$\text{ROO}^\bullet$
		Lipid peroksil	$\text{LOO}^\bullet$
		Alkoksil	$\text{RO}^\bullet$
	Radikal olmayanlar	Ozon	O_3
		Singlet oksijen	$^1\text{O}_2$
		Hidrojen peroksit	H_2O_2
		Hipokloröz asit	HOCl
2. RNS	Radikaller	Hipobromöz asit	HOBr
		Azot dioksit	$\text{NO}_2^\bullet$
		Azot oksit	$\text{NO}^\bullet$
		Alkil peroksinitrit	ROONO
2. RNS	Radikal olmayanlar	Peroksinitrik asit	ONOOH
		Nitrozil anyonu	NO^-
		Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Diazot tetraoksit	N_2O_4
		Nitröz asit	HNO_2
		Nitril klorid	NO_2Cl
		Peroksinitrit	ONOO

2.2. Oksidatif Stres

Canlı sistemlerinde serbest radikallerin meydana getirdiği biyolojik hasarları ortadan kaldırmak üzere üretilen oksidanlar ve süpürücü özelliği olan antioksidanlar

arasında denge bulunmaktadır. Bazı antioksidan faktörlerin yetersiz kalması durumunda denge oksidanlar yönünde bozulabilir. Serbest radikaller lehine bozulmaya başlayan bu denge birtakım etkilere yol açmaktadır. Bu durum sonucunda ortaya çıkan etki oksidatif stres olarak adlandırılır. Canlılarda bu denge sağlandığında, serbest radikaller biyolojik sistemleri hasara uğratamamaktadır (Sies, 2014).

Hücresinin esas elemanlarından biri olan mitokondri organelinin kendi metabolik olayları sonucunda ortaya çıkan ürünler endojen, yani organizmanın kendi ürettiği ROS'ların asıl kaynağı olarak bilinmektedir. Bununla birlikte bazı büyüme faktörlerine ve metabolizmada oluşan yolakların sinyallerine yanıt olarak hücre zarında bulunan oksidazlar da ROS'ların oluşmasına yol açmaktadır (Abraham, 2001). Bu durumda ortaya çıkan oksidatif stres, canlı vücuduna çok önemli zararlar verebilir. Özellikle birçok hastalığın oluşmasına yol açmaktadır. Diyabet, parkinson hastalığı, kanser, böbrek yetmezliği, demans, bronşit, nörolojik bozukluklar ve hipertansiyon gibi durumlar oksidatif stresin neden olduğu hastalıklardan bazılarıdır (Çakatay ve Kayalı, 2006; Freeman ve Crapo, 1982). Oksidatif stresin yol açtığı bazı hastalıklar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Oksidatif stres ile gelişebilecek kronik hastalıklara örnekler (Karakan ve Nazlıkul, 2007)

2.2.1. Oksidatif Stresin Biyomoleküllere Etkisi

Canlı vücudu yaşlandıkça ilerleyen ilaç kullanımları veya çeşitli yollarla vücuda alınan kimyasal maddeler ve uyarıcı etkenler oksidatif strese yol açan ROS'ların

oluşmasına neden olmaktadır. Canlı yapısında bulunan ve canlılığın en temel yapıtaşları olan organik moleküllerin, DNA, yağ dokuları, protein, protein yapılı olan enzimlerin ve oksidatif stres sonucuyla hasara uğradığı bildirilmiştir. DNA'nın ve membran proteinlerinin tahrip olması, lipid peroksidasyonu, lipid metabolizmasında değişiklikler ve enzim aktivitelerinde fonksiyon bozuklukları oksidatif stres sonucu oluşan hasarlardan bazılarıdır (Özcan vd., 2015). Bununla birlikte oksidatif stresin, hücre ölümlerine neden olarak dokuları büyük oranda hasara uğrattığı ve bunun sonucunda birçok hastalığın kaynağı olarak görüldüğü bilinmektedir (Sezer ve Keskin, 2014).

2.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar, ortaklaşmamış e- içeren serbest radikalleri tutarak etkisiz hale getiren moleküllerdir. Tüm biyolojik sistemlerde antioksidanlar ve serbest radikaller arasında denge bulunmaktadır. Bu dengenin bozulması çeşitli hücre hasarlarının meydana gelmesine ve sonrasında hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Memişoğulları, 2003; Memişoğulları, 2004). Organizma, biyolojik hasarları ortadan kaldırmak ve oluşan hastalıkların komplikasyonlarını önlemek amacıyla antioksidan mekanizmaları devreye sokarak bu dengenin tekrar kurulmasını sağlar. Bu mekanizmalar sayesinde birçok biyolojik sorunun önlenmesinde başarılı olunabileceği bildirilmiştir. Antioksidan moleküller farklı mekanizmalarla serbest radikalleri inaktif hale getirebilmektedir (Young, 2001; Sözmen, 2002; Taysi, 2002).

Onarma etkisi, serbest radikallerin biyolojik sistemlerde oksidatif stres etkisi yaratarak yol açtığı hasarları engellemeye yönelik çalışan bir mekanizmadır. Temizleme etkisi, oksidan moleküllerin enzimler yardımı ile etkinliğinin düşürülerek organizmaya zarar veremeyecek duruma getirilmesine dayanan mekanizmadır. Zincir koparma etkisi, ROS ve RNS'lerin E vitamini, hemoglobin ve seruloplazmin yardımıyla bağlanarak diğer biyolojik moleküllerle bağlantısının kesilmesini sağlayan mekanizmadır. Baskılama etkisi ise oksidan moleküllerin yapısına flavonoidler ve vitaminler gibi antioksidanların bir hidrojen bağlayarak bu molekülleri inaktif hale getirmesidir (Gökpınar vd., 2006; Arkan, 2011).

Antioksidanlar belirli gruplar halinde sınıflandırılırlar. İlk olarak endojen ve eksojen olmak üzere 2 grupta sınıflandırılır. Endojen antioksidanlar da kendi içerisinde enzimatik ve non-enzimatik (enzimatik olmayan) olarak ikiye ayrılmaktadır (Öztürk vd., 2009).

2.3.1. Endojen Antioksidanlar

2.3.1.1. Katalaz

Katalaz enzimi (CAT), tetramer yapılı olup yapısında dört polipeptit zinciri bulundurmaktadır. Aynı zamanda yapısında NADPH vardır. Hücrede peroksizomlarda bulunur. H₂O₂'nin su ve oksijene dönüşmesini sağlar (Giles ve Jacob, 2002).

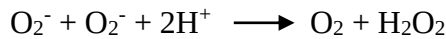


2.3.1.2. Glutatyon

Suda çözünen bir madde olan glutatyon (GSH) aminoasitlerden oluşmaktadır. Glutatyonun yapısında bulunan tiyol grubu etkin bir indirgeyici özelliğe sahiptir. Hücre içerisinde indirgen formda bulunur ve burada üretilen peroksitleri indirger. Sentezlenmesi iki aşamada gerçekleşmekte olup çok güçlü bir antioksidandır (Emecen, 2009).

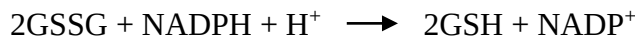
2.3.1.3. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD) en önemli endojen antioksidanlardan biridir. Oksidatif strese karşı oluşturulan savunma sisteminin temel elemanlarından biridir. Süperoksit radikalini ve ROS'ları etkisiz hale getirmekte büyük rol oynar. Enzimatik aktivitesi ile iki tane süperoksit radikalinin bir tanesini O₂ bileşiğine dönüştürür. Diğer süperoksit radikalinin ise süperoksitten daha zayıf bir radikal olan H₂O₂'ye dönüşmesini sağlar (Memişoğulları, 2005).



2.3.1.4. Glutatyon Redüktaz

Yapısında Flavin Adenin Dinükleotid (FAD) bulunduran Glutatyon Redüktaz (GR) enzimi, enzim, NADPH molekülünde bulunan elektron parçacıklarının bir tanesini oksitlenmiş glutatyonun disülfid bağına katarak glutatyona (GSH) dönüşmesini katalizler. Böylece NADPH'ın biyolojik sistemlere hasar vermesini engeller (Memişoğulları, 2005).



2.3.1.5. Seruloplazmin

Hidrojen peroksit molekülünü kullanarak bakır elementinin reoksidasyonunu sağlar. Ferro demiri (Fe^{+2}), ferrik demire (Fe^{+3}) dönüştürerek fenton reaksiyonunu dolayısıyla hidroksil radikalının oluşmasını engeller (Aydemir ve Sarı, 2009; Emecen, 2009).

2.3.1.6. Melatonin

DNA'yı serbest radikallerin etkisinden koruyan en önemli antioksidanlardandır. Hücre çekirdeğine girebilme özelliği bu halini güçlendirmektedir (Emecen, 2009). Üretimi genellikle karanlıkta daha fazla miktarda olan melatonin bir hormon molekülüdür. Canlı organizmasında gösterdiği antioksidan özelliğin yanında bağışıklık sistemlerine yardımcı olur ve yaşamsal faaliyetlerden olan uyku ve vücut ısısı ile ilgili sistemleri düzenler (Atasoy, 2019). Bu hormon süperoksit ve hidroksil radikallerini bağlayarak aktivite göstermektedir (Aydemir ve Sarı, 2009).

2.3.2. Eksojen Antioksidanlar

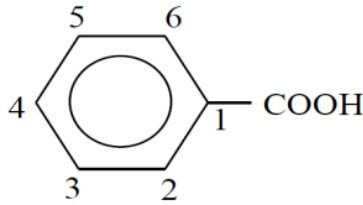
Canlı organizmasına dışarıdan alınan ve antioksidan aktivite gösteren birçok molekül bulunmaktadır. Bazı vitaminler bu moleküller arasında yer almaktadır. C vitamini (askorbik asit), provitamin A (β -karoten), B9 vitamini (folik asit) ve E vitamini (α -Tokoferol)'dir. A vitamini yağda çözünen güçlü bir antioksidandır. Çözünürlük bakımından aynı özelliğe sahip bir diğer vitamin de E vitaminidir. E vitamini hücreyi lipid peroksidasyonunun etkilerinden korumaktadır. Suda çözülebilen vitaminlerden biri olan C vitamini, ROS ve RNS'leri çok etkin bir süpürücü özelliğe sahiptir. Böylelikle biyolojik sistemleri oksidatif hasara karşı koruyan moleküller arasında yer almaktadır (Karabulut ve Gülay, 2016b). Vitaminlerden ayrı olarak dışarıdan alınan antioksidan aktiviteye sahip moleküller arasında fenolik asitler de bulunmaktadır. Bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan fenolik asitler kendi içinde birçok farklı gruplara ayrılmaktadır (Menevşeoğlu, 2012).

2.3.2.1. Fenolik Bileşikler

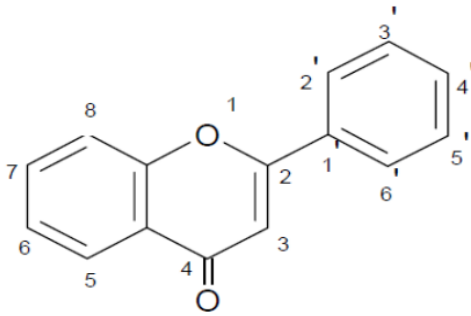
Fenolik bileşikler bir diğer ismi ile polifenoller olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerin yapısında çok sayıda fonksiyona sahip olan bu bileşikler bitkiler büyüme aşamasında iken sentez reaksiyonları sırasında ortaya çıkan sekonder (ikincil) metabolitler olarak da bilinir. Fenolik bileşiklerin halka yapısına bağlı bir ya da birden fazla $-OH$ grubu bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler iki grupta

sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırma flavonoidler ve fenolik asitler şeklindedir (Yılmaz, 2010). Flavonoidler; antosiyanidinler, flavonlar ve flavonollar, flavononlar, kateşinler ve löykoantosiyanidinler ve son olarak proantosiyaninler olarak beş farklı gruptan oluşmaktadırlar. Fenolik asitler ise; sinamik asitler (hidroksisinamik asitler) ve benzoik asitler (hidroksibenzoik asitler) olarak iki farklı gruba ayrılmaktadır. (Menevşeoğlu, 2012).

Fenolik bileşikler yapıları sayesinde antioksidan aktivite göstermektedir. Aromatik halkalarına bağlı konumda olan –OH gruplarının sayısı ve konumları farklılık göstermektedir. Sahip oldukları bu yapı, mevcut bileşiklere serbest radikalleri temizleme aktivitesi kazandırmaktadır (Meral vd., 2012). Serbest radikallerin etkisi ile oluşan hasarların neden olduğu diyabet, demans, kanser gibi birçok hastalığın tedavi yollarının geliştirilmesi için antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Şekil 2 ve Şekil 3'te fenolik bileşiklerin halka yapısına örnek moleküller gösterilmiştir.



Şekil 2. Benzoik asitler (MEB, 2012).



Şekil 3. Flavonoidlerin genel yapısı (MEB, 2012).

2.3.2.2. Doğal Ürünler

Bilimsel çalışmalar sonucunda sağlık sektörünü etkileyen birçok alanda kullanılan doğal ürünlerle ilgili gelişmeler giderek artmaktadır. Bu doğal ürünlerin kaynağı bitkiler ve mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Geçmiş M.Ö. 5000'li yıllara dayanan doğal ürünlerin tedavi amaçlı kullanımı tespit edilmiştir. Aynı şekilde günümüzde de tıbbi ve aromatik bitkiler birçok hastalığın tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tıbbi ve aromatik bitkileri dünya nüfusunun yaklaşık %65-80'lik kısmının kullandığını bildirmiştir. Şu ana kadar geleneksel olarak geliştirilen ilaçların %80'i doğal ürünlerden elde edilmektedir (Acıbuca ve Budak, 2018).

Doğal ürünler yapısında tanin, lignin ve antosiyanin gibi önemli fenolik bileşikler bulundurması sayesinde birçok tedavide kullanılmaktadır (Arunkumar ve Muthuselvam, 2009; Padmavathi, 2013). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite göstererek serbest radikalleri süpürmesi ve oksidatif strese engel olması doğal ürünlere anti-enflamatuvar, antioksidan ve antidiyabetik vb. birçok biyolojik aktivite özelliği kazandırmaktadır. Bu biyolojik aktiviteler sayesinde, organizmada ortaya çıkan kanser, demans ve diyabet gibi hastalıkların riskinin azaltılması ve önlenmesi mümkündür (Pandey ve Rivzi, 2009; Li vd., 2014). Ülkemiz topoğrafyası ve iklimi sayesinde bitki çeşidi bakımından çok zengin bir yerleşkedir. Çeşitliliğin geniş olması ülkemiz için büyük önem arz etmektedir (Eminağaoğlu vd., 2014; Yazıcı, 2018).

2.4. Diyabet

Diyabet, insülin yetersizliği ile ortaya çıkan, karbonhidrat metabolizması en önemlisi olmakla beraber yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluklarla devam eden endokrin bir metabolizma hastalığıdır (Memişoğulları, 2005). Çalışmaları sonucunda bir maddenin kanda bulunan glukoz miktarını düşürdüğünü gözlemleyen Mayer ve Schaefer (1909) bu maddeyi insülin olarak adlandırmışlardır. Collip ve arkadaşları (1921) araştırmaları sonucu insülin olarak adlandırılan bu maddenin vücutta eksikliğinin diyabet hastalığının oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Birçok farklı yolla bu hastalığı teşhis etme yöntemleri geliştiren Hintli araştırmacılar hastalığı “medhumeha” olarak adlandırmışlardır (Ivorra, 1989; Medvei, 1993).

Geçmiş yıllarda Kapadokya’da yaşayan bir hekim olan Aretaeus, bu hastalığa ‘Diabetes’ adını vermiştir. Aretaeus’un diyabet hastalığı için yaptığı tanımlama günümüzde hala kullanılmaktadır. Bu tanımlamada diyabet hastalığının kronik bir hastalık olduğunu, eklemlerde oluşan ödeme benzer su fazlalığının hızlı bir şekilde idrar olarak dışarı atıldığını, hastalığın vücutta yavaşça ilerlediğini ve çok etkili olduğunu belirtmiştir. Aracellus, bu hastalık ile ilgili çeşitli uygulamalar yaparak çalışmalarını ortaya koymuştur. Diyabet hastası olan kişilerin idrarının tatlı olduğu için Thomas Willis isimli araştırmacı diabetes sözcüğünün arkasına tatlı anlamına gelen ‘mellitus’ sözcüğünü getirmiştir (Bağrıaçık, 1997). Diyabet hastalığının tedavisi Frederick Banting ve Charles Best isimli araştırmacıların bulduğu insülinle başlamıştır. Zamanla

tedavi yollarında farklı yöntemler kullanılarak gelişmeler gerçekleşmiştir. Bununla birlikte hala bu hastalığın kişilerde hangi semptomları ortaya çıkardığı konusunda araştırmalar yapılmaktadır (Atabek, 1973; Bağrıaçık, 1997).

M.Ö.'ye dayanan bir araştırma tarihi olsa da diyabet hastalığının detaylarına 1900'lü yıllarda yapılan deneysel araştırmalar ile ulaşılmıştır. Köpeklerin kullanılarak deneysel araştırmaların gerçekleştirildiği bir çalışmada pankreasın bu hastalık konusunda önem taşıdığı sonucuna varılmıştır. Deney hayvanlarının pankreasları çıkarılmış ve bunun sonucunda hayvanlarda diyabet hastalığına ait semptomlar gözlemlenmiştir. Bu semptomlar üzerine çok geçmeden ölen deney hayvanlarında izlenen bu durum pankreasın diyabetle ilgili olduğunu göstermiştir (Von Mehring vd.,1890). Best ve arkadaşlarının (1921) domuz hayvanlarıyla yaptığı bir çalışmada hayvanların pankreas organından insülini saflaştırarak bir diyabet hastası olan Leonard Thompson üzerinde tedavi amaçlı kullanarak başarılı olmuşlardır. Geliştirdikleri bu tedavi yöntemi sayesinde Nobel Tıp Ödülü kazanmışlardır (Atabek, 1973). Yıllar boyu süren bu çalışmalara ve geliştirilen tedavi yöntemlerine rağmen hala diyabet hastalığı ölüm oranı nedenleri arasında yer almaktadır. İstatistiksel olarak yapılan çalışmalar bu oranları daha detaylı olarak açıklamaktadır (Himsworth, 1936; Atabek, 1973; Akyurt, 2014).

Diyabet hastalığı ile ilgili gerçekleştirilen incelemeler sonucunda 2002 yılında bu hastalığa yakalananların 200 milyon sayılı insanı aştığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda 2030 yılında dünya geneli için 366 milyon kişinin bu hastalıktan etkileneceği öne sürülmüştür (Türker vd., 2013).

Diyabet hastalığının organizmada ortaya çıkardığı olumsuz sonuçlar için pek çok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar arasında en dikkat çeken pro-oksidan ve anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulmasıyla ortaya çıkan oksidatif stresin diyabet hastalığına neden olmasıdır. Dokularda artış gösteren serbest radikaller protein, lipid ve nükleik asitlerle etkileşime girerek hücre membranının bütünlüğünü kaybedip işlevselliğini yitirmesine aynı zamanda organik moleküllerin yapı ve fonksiyonlarında genetik mutasyonların oluşmasına sebep olmaktadır (Memişoğulları, 2005). Bağırsakların mikrovillus olarak adlandırılan bölgelerinde alfa-glukozidaz enzimleri bulunmaktadır. Monosakkaritlerin bağırsaklardan rahatlıkla emilmesini sağlamak için polisakkaritleri bu enzimler parçalamaktadır (Mai vd., 2007). Kanda bulunan glukoz miktarının optimum düzeyde kalması metabolizmada görevli olan birçok molekülün miktarı ve çeşitli mekanizmaların işleyişine bağlıdır (Inzucchi, 2003).

2.4.1. Diyabetin Sınıflandırılması

Yıllardır süregelen araştırmaların sonuçlarına dayalı olarak kullanılan sınıflandırma şekilleri değişiklik göstermektedir. WHO ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) 1979 yılında bu sınıflandırmaya bir güncelleme getirmiştir. WHO ve ADA'nın bilgilendirmesine göre DM, 4 ana grupta incelenmektedir. Bu gruplar; Tip 1 DM, Tip 2 DM, Gestasyonel DM ve diğer spesifik tipler olarak sınıflandırılmaktadır (ADA, 2018; The Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003; Gavin, 1998; Albert vd., 1998).

2.4.1.1. Tip I Diyabet

İnsüline bağımlı diyabet (IDDM) olarak da adlandırılan diyabet çeşidi pankreasın Langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerinin hasara uğrayarak insülin hormonu salgılayamaması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Karaman ve Elgin, 2016). Viral hastalıkların etkisi ile de oluşabilen bu hastalık, bağışıklık sistemine de bağlı olabilmektedir (Akyurt, 2014). Çocuklarda daha sık rastlanmakla birlikte diğer yaşlarda da görülen bu hastalık bir anda oluşabilmektedir. Susuzluk, kilo kaybı, polifaji gibi etkileri olup hiperglisemi durumlarında sinirsel belirtiler de görülmektedir (Karaman ve Elgin, 2016).

2.4.1.2. Tip II Diyabet

Tip 2 DM insüline bağımlı değildir ve en sık rastlanan hastalıklar arasındadır. Diyabet hastalarının yaklaşık %90-95'ini bu tip oluşturmaktadır. Özellikle obezite hastalarında bulunan hareketsizlik durumu insülinin işlevini etkilemektedir. Bununla birlikte Langerhans adacıklarında bulunan beta hücrelerinin uğradığı hasar sonucu ortaya çıkabilecek fonksiyon bozuklukları da bu hastalığı tetiklemektedir (Zimmet vd., 2001). Çoğunlukla 30'lu yaşlar sonrasında görülen bu hastalığa son zamanlarda ergen ve genç yetişkin kişilerde de rastlanmaya başlanmıştır. Bu tip hastalıkta insülin hormonunun salgılanmasında bir sorun yokken hücre reseptörlerinde gelişen işlevsel bozukluktan dolayı hormonlara karşı direnç oluşması söz konusudur (Büyüköztürk, 1992).

2.4.1.3. Gestasyonel Diyabet

Glukoz intoleransı olarak da adlandırılan bu tip diyabet hamilelikte ortaya çıkmaktadır (American Diabetes Association, 2010). Aşırı kiloya sahip 25 yaş üzeri kadın olmak, hamilelikte dengesiz alınan kilo, anomalili bir bebek doğurmak bu tip

hastalığın belirtileridir. Kalıtsal olarak önceki nesillerinde bu hastalığa yakalanan kişilerin olması ve hamilelik boyunca idrarda tespit edilen glukoz fazlalığı da bu riski taşımaktadır (WHO, 2016). Bu hastalığa yakalanan kişilerin bebeklerinin ölü doğma ve sarılık geçirme riski bulunmaktadır. Doğan bebeklerin ilerleyen yaşlarında hastalıklarının Tip 2 diyabete dönüşme ihtimali yüksektir. Bu şekilde hamilelik geçiren kişilerin ise kanda kolesterol oranının yüksek olması, hamilelikte zehirlenme geçirmesi ve diğer infeksiyon hastalıklara yakalanabilme ihtimalinin diğer hamile bireylere oranla yüksek olduğu bilinmektedir (Hartling vd., 2013).

2.4.1.4. Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet

Kimyasal maddelerden dolayı oluşan diyabet, genetik faktörler ile oluşan diyabet, ilaç kaynaklı olan rahatsızlıklar, çeşitli pankreas hastalıkları, insülin işlevinin bozukluğunun neden olduğu diğer hasarlar ve bağışıklık sisteminden kaynaklı ortaya çıkan enfeksiyonlardır (ADA, 2010).

2.4.2. Diyabetin Oksidatif Stres ile İlişkisi

Serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bulunan dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıyla oksidatif stres oluşmaktadır. Ortaya çıkan bu etki diyabet hastalığının yol açtığı hasarların oluşmasına neden olmaktadır (Memişoğulları, 2005). Serbest radikallerin, diyabet olan kişilerin metabolizmasında lipid peroksidasyonuna yol açtığı ve bu hastalığın ilerlemesine neden olduğu yapılan araştırmalar sonucunda bildirilmiştir (Pitkanen vd., 1992). Konjuge dienler ve tiyobarbitürük asit (TBARS) gibi reaktif maddelerin artışı diyabet hastalarında görünen bir durumdur. Söz konusu bu artış olduğunda diyabet hastası bireyin metabolizmasında mevcut bir takım antioksidan moleküllerin miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Antioksidanların azalması ile serbest radikaller lehine bozulan denge oksidatif stresin bu hastalıkta etkisi olduğunu göstermektedir (Memişoğulları, 2005). Bazı çalışmalarda, 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) olarak adlandırılan moleküller oksidatif stresin varlığını ortaya koyan yani belirteci olarak kullanılan moleküller olarak rapor edilmiştir. Deney hayvanlarından yararlanılarak yapılan bir çalışmada ratlarda diyabet oluşturularak bu belirteç ile oksidatif stres varlığı araştırılmıştır. Deneyler sonucunda belirtecin miktarında artış olduğu sonucuna ulaşılmış ve diyabet hastalığı komplikasyonlarının serbest radikallerinin oluşumuna neden olduğu kanıtlanmıştır (Akyurt, 2014). Kas hücrelerinin kullanıldığı başka bir çalışmada ise hücrelerin glukoz konsantrasyonu yüksek bir ortama bırakıldığı ve hücrelerde oksidatif stres başladığı gözlemlenmiştir. Literatürde şu ana

kadar yapılan çalışmalar kanda bulunan yüksek miktarda glukozun oksidatif stresin oluşumu ile ilgisi olduğunu kanıtlamaktadır (Robertson vd., 2004).

2.4.3. Diyabetin Tedavisinde Antidiyabetik İlaçlar

Tip 2 DM, alfa-glukozidazı inhibe eden moleküller, kanda bulunan şeker miktarını sınırlandıran diyet biçimi ve mikrovilluslardaki emilim oranını düşüren moleküller ile tedavi edilmektedir (Akyurt, 2014). Bu tedavilerin yanı sıra egzersiz ve spor yapmak da diyabet hastası kişilerin yapması gerekenler arasında yer almalıdır (ADA, 2019).

Antidiyabetik ilaçların kullanımı yapılan diğer tedavilerin yanında Tip 2 DM hastalarına uygulanmaktadır. Bu ilaçlar arasında alfa-glukozidaz inhibitörleri, insülin salgılatıcı moleküller ve insulinomimetikler yer almaktadır. Hastalığın ilk zamanlarında kullanılan antidiyabetik ilaçlar faydalı olsa da diyabet hastalığının bir süre sonra bu ilaçlardan fayda görülmediği için hasta kişilere kombine ilaç tedavileri uygulanmaktadır (TEMD, 2019).

2.5. Enzimler

Enzimler, birbirinden farklı aktivitelere sahip olan ve sadece birkaç tanesi dahil olmamak üzere protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Bu moleküller, canlı metabolizmasında birçok reaksiyonun meydana gelmesinde ve bunun sonucunda istenilen ürünün oluşmasında görev alırlar. Canlı hayatı için büyük önem taşıyan enzimler biyolojik sistemlerde reaksiyonların hızlı şekilde gerçekleşmesini sağlar. Eğer enzimler aktivitelerini yerine getiremez ise biyolojik olaylar aksar ve canlı hayatı tehlikeye girer (Price, 1982). Enzimler doğal olduğu için katalitik aktiviteleri çok yüksektir. Enzimlerin etkileri ile meydana gelen reaksiyonların sonucunda ortaya çıkan moleküllere ürün denir. rnleri meydana getirirken etki ettikleri moleküller substrat olarak adlandırılır. Sadece kendi substratı ile uyumlu olan enzimler hızlı bir şekilde ürünü oluşturmayı hedefler (Nelson, 2005). Yapılan araştırmalar sonucunda ortaya çıkan genetik hastalıkların çoğunun kaynağının gerekli enzimlerin eksikliğinden dolayı olduğu belirtilmektedir. Bir enzimin eksikliği veya aktivitesini yerine getirememesinin birtakım sonuçlara yol açtığı gibi aktivitesi çok yüksek olan enzimler de bazı sorunların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Bundan hareketle bazı hastalıklara özel ilaç üretimlerinde söz konusu ilacın etken maddesinin enzimle uyumlu olması esas alınarak aktivitesi yüksek olan enzimlerin bu ilaçla baskılanması ve inhibe edilmesi yoluyla geliştirilmektedir (Price, 1982).

2.5.1. Enzim İnhibisyonunun İlaç Üretimindeki Önemi

Enzimlerin aktivitelerini yerine getirmesini engellemek amacıyla geliştirilen moleküller enzim inhibitörleridir. Bazı durumlarda enzimlerin aktivitesinin durdurulması biyolojik sistemlerde hayati önem taşımaktadır. Bu yüzden enzim inhibitörlerinin ilaç sektöründeki yeri büyük önem taşımaktadır. Enzimler ve inhibitörleri üzerinde yapılan incelemeler hem metabolizmadaki biyolojik olayların kavranmasını hem de bu moleküllerin yapısının ve mekanizmasının anlaşılmasını sağlar (Nelson, 2005; Bilen, 2019). Enzim aktivitelerinin önemli olduğu gibi aktivitelerinin engellenme mekanizmaları da önemlidir. Bir enzimi inhibe etmek biyolojik sistemde gerçekleşecek bir hasarı engelleyebilir, metabolizmada istenmeyen bir molekülün ortadan kaldırılmasını sağlayabilir. Bu nedenle ilaç sektöründe kullanılan asıl molekül enzim inhibitörleridir. İlaç sektörü ile ilgili araştırmaların çoğu inhibisyon olayı üzerine yönelmiştir. İlaç üretimlerinde kullanılacak olan enzim inhibitörlerinin söz konusu olan enzime tamamen uyumlu olması gerekmektedir. Bu durum üretilen ilacın kullanılması durumunda vücutta oluşturacağı toksisiteyi en aza indirmek bakımından büyük önem taşımaktadır (Çolak, 2014). Tüm bunlar dikkate alındığında, son yıllarda yapılan çalışmalar ışığında enzim inhibitörlerinin doğal kaynaklardan üretilmesinin sağlık açısından önemli olduğu bilimsel bir gerçektir.

2.5.2. Alfa-glukozidaz (E.C:3.2.1.20)

Doğada bulunan en önemli enzim sınıflarından biri alfa-glukozidazlardır. Bu enzimler alfa-amilazlarla ilişkili olarak çalışmaktadırlar. Enzimlerin nerden üretildiğine bağlı olarak ihtiyaçları olan sıcaklık ve pH faktörlerinin değerleri değişiklik göstermektedir. Alfa-glukozidaz enzimi karbonhidratları oluşturan moleküllerin arasındaki bağlar üzerinde aktivasyon gösteren en önemli enzimlerindendir. Karbonhidrat moleküllerinin monosakkaritlere kadar ayrılmasını katalizler. Bazı büyük moleküllerin diğer grup enzimler tarafından hidroliz edilerek oluşturulmuş olan oligosakkaritlerin α -1,4 bağlarını bu enzimler katalizler. Bununla birlikte alfa-glukozidazların katalizlediği reaksiyonlar geri dönüşümlü reaksiyonlardır (Bourne ve Henrissat, 2001; Çöleri, 2007).

2.6. *Robinia* Türleri

Anavatanı Kuzey Amerika olan ve hemen hemen 20 civarında türü olan *Robina* cinsi bitkilerin çoğu süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Yetiştirme koşulları olarak seçici olmayıp genel olarak her toprakta yetiştirilebilirler. Bununla birlikte hava kirliliğine

karşı dirençleri bulunmaktadır. Görüntüsü bakımından park düzenlemelerinde sıklıkla kullanılan bu cins bitkiler kokulu ve renkleri bakımından dikkat çekicidirler. Çok hızlı gelişim gösteren türleri bulunduğundan bazen orman ağacı olarak da yetiştirilmektedir. Çiçekleri bal arıları için gıda deposu görevi taşıdığından arıcılıkta önemli yeri bulunmaktadır. Jean Robin tarafından ülkeye getirilen bu bitki türü daha sonra yol kenarlarında ve istasyon kenarlarında dikilerek Avrupa'ya doğru yayılım göstermiştir (Yaltırık, 2000).

Robinia türleri Türkiye'de "Diken Ağacı" ve "Salkım Ağacı" gibi isimlerle de tanınmaktadır. Genellikle *Fabaceae* familyasının bitkilerine ait olan bir özellik olarak kök uçlarında mikorizalar bulunmaktadır. Bu mikoriza yapıları serbest azotları tespit etmektedirler ve bu özellik sayesinde ıslah çalışmalarında önemli bir yere sahiptir (İ. Turna ve H. Turna, 2000). Bu bitki türlerinin kabuğunun çiftlik hayvanları için zehirli olduğu bilinmekte ve yaprakları boya üretiminde kullanılmaktadır. Odununun dekoratif olması sayesinde mobilya, müzik aletleri ve oymacılık gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Yaltırık, 2000).

2.6.1. *Robinia pseudoacacia* L.

Beyaz çiçekli yalancı akasya olarak bilinen *Robinia pseudoacacia* L. çok yıllık bir bitki olup, *Fabaceae* familyasına aittir. Anavatan olarak Amerika'nın doğu kısımlarında yayılım göstermektedir (Hazar vd., 2020) Türkiye'de; Artvin, İstanbul, Sakarya'da ormanlık yerlerde, genellikle Karadeniz kıyı şeritlerinde, yol kenarlarında doğal olarak yetişmektedir. Uzunluğu ortalama olarak 15 m'dir ve en fazla 20-30 metreye kadar ulaşabilmektedir. Gövdesi çatlaklı ve rengi koyu gri-kahverengidir. Dalları küçük ve dikenli yaprakları ise bileşik şeklinde 7-19 oval yaprakçıktan oluşmaktadır. 2-4 cm uzunluğunda, 1-2 cm genişliğinde ve yeşil renkli olan yaprakçıklar elips şeklinde ve uçları sivridir. Çiçekleri kokulu, yan durumlu, yoğun salkım sarkık ve nektar bakımından zengindir. Çanak yaprakları çan şeklinde birleşik, açık yeşil, taç yaprakları beyaz renklidir (Çekül, t.y.). Çiçeklenme zamanı bahar aylarının başı ile yaz aylarının başı olan nisan ve haziran ayları arasında yayılım göstermektedir (Bahçesel, t.y.). Şekil 4'te *Robinia pseudoacacia* L.'nin görseli yer almaktadır.

Robinia pseudoacacia L. ile ilgili yapılan bir çalışmada flavonoid ve saponin içeriklerinin önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir (Jia vd., 2017). Başka bir çalışmada ise *Rrobinia pseudoacacia* türünden elde edilen bitki özütlerinden yapılan deneylerle fenolik içeriği tespit edilmiş ve ORAC (Oksijen Radikali Absorbans

Kapasitesi) testi yapılarak yüksek antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Katiki vd., 2013).

Araştırmalarda, bitkisel ilaç alternatifi üretebilmek için yapılan biyolojik aktivite analizlerinin en önemlilerinden biri de enzim inhibisyonu aktivitesi analizleridir. Böylece canlı metabolizmasında dengeyi sağlayabilmek için çeşitli enzimlerin belirli miktarlarda inhibe edilmesi birçok hastalığın tedavisine yardımcı olmaktadır. Bir çalışma da *Robinia pseudoacacia* bitkisinin metanol içinde çözülmüş özütlerinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerini inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *Robinia pseudoacacia* özütünün bütirilkolinesteraz daha yüksek olmak üzere iki enzimde de inhibisyon aktivitesi gösterdiğini ve detaylı çalışmalar sonucunda Alzheimer tedavisinde alternatif bir ürün olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Orhan vd., 2004).



Şekil 4. *Robinia pseudoacacia* L. (Serapark, t.y.).

2.6.2. *Robinia hispida* L.

Fabaceae familyasına ait olan bir başka *Robinia* türü; pembe çiçekli gül akasya olarak bilinen *Robinia hispida* L.'dir. Bu bitki ormanlık alanlarda yayılım gösterir ve ortalama 3 m uzunluğunda olup, 5 m'ye kadar ulaşabilmektedir. Gövdesi açık gri-kahverengi olup çatlaklıdır. Dalları seyrek, yaprakları bileşik ve düz kenarlıdır. Yaprak dizilişi olarak almaşık yapıya sahip olan bitkinin tüy örtüsü bulunmaktadır. Yaprakları yaklaşık 25 cm uzunluğuna sahiptir ve 13 ya da daha fazla yaprakçık bulundurmaktadır. Çiçekleri pembe renkte, yan durumlu, sarkık, gevşek salkımlı 1,5-2 cm boyunda ve çanak yaprakları çan şeklinde birleşiktir. Çiçeklenme zamanı Mayıs ve Temmuz ayları

arasında yayılım göstermektedir (Bahçesel, t.y.). Şekil 5'te *Robinia hispida* L.'nin görseli yer almaktadır.

Robinia hispida türüne ilişkin sınırlı sayıda çalışma olup, incelendiği bir çalışmada *Robinia hispida* ve *Robinia pseudoacacia* türlerine ait çiçeklerde glikozillenmiş flavonoidlerin karakterize edilmesi için bir LC-Q-TOF-MS metodu geliştirilmiş, toplam 44 glikozillenmiş flavonoid tespit edilmiştir (Ma vd., 2021). Yapılan bir başka çalışmada yine bu iki türün çiçeklerine ait özütlerin fenolik asitler bakımından zengin olduğu, önemli ölçüde toplam polifenol ve flavonoid içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışma kapsamında *Robinia hispida*'nın antioksidan aktivitesinin tespiti için ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikası)) serbest radikal süpürme gücü analizi yapılmış ve yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Hallmann, 2020).



Şekil 5. *Robinia hispida* L. (Gibbons, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Malzemeler

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz Adı	Markası
LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi)	Agilent 1260 Series Degasser (Gaz giderici)
	Agilent 1100 Series Quad Pump (Dörtlü pompa)
	Agilent 1100 Series VWD (Ultra Viyole dedektör)
	Agilent 1200 Series DAD (Diyot serili dedektör)
ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi)	Agilent Technologies
Kolon	C ₁₈ , Hichrom (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Ultrasonik Banyo	RK103H, Bandelin Sonorex, 140/560W, 35 kHz, Heinrichstraße, Berlin, Germany
UV-vis spektrofotometre	Shimadzu UV-1800, Japan
Renk ölçüm cihazı	Konica Minolta, CR-400, Japonya
pH metre	Hanna pH 211
Analitik terazi	Ohaus, Pioneer TM Balances, PA214C, Parsippany, NJ, USA
Vorteks karıştırıcı	IKA® Works, MS1 Mini-shaker vortex, Inc., USA
Öğütme değirmeni	IKA-Werke M20, GmbH & Co.KG, Staufen, Germany
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Laboratory Blender, USA
Santrifüj	Centurion Scientific K2015R, UK
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	Wisestir, SMSH-6, Daihan
Otomatik mikropipet	Eppendorf, Research Plus, Germany
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Etüv	Elektromag M6040-P

Tablo 2’de analizlerde kullanılan cihazlar ve markaları yer almaktadır. Bunların yanı sıra analizlerde; plastik (mikrokült) ve kuvarz yarı mikro (Isolab, Germany) spektrofotometre küvetleri, santrifüj tüpleri (Isolab, Germany), süzgeç/filtre kağıtları (Whatman No.1), deney tüpleri ve diğer cam malzemeler (mezür, beher, erlen, huni vb.) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Analizlerde ve bitki ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan analitik saflıktaki çeşitli çözücüler (etanol, metanol, aseton, asetonitril, dimetil sülfoksit) Isolab ve Sigma-

Merck firmalarından satın alınmıştır. Biyoaktivite analizlerinde kullanılan Folin-ciocalteu reaktifi, sodyum asetat trihidrat, gallik asit, Troloks® (6-hidroksil-, 5, 7, 8, tetrametilikroman-2-karboksilik asit), neocuproin, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin- 6-sülfonat (ABTS), 2,2 -difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), sodyum karbonat (Na₂CO₃), asetik asit, hidroklorik asit, alüminyum klorür (AlCl₃), sodyum nitrit (NaNO₂), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum persülfat (K₂S₂O₈), demir (III) klorür (FeCl₃), bakır (II) klorür (CuCl₂), amonyum asetat (NH₄Ac), 2,4,6-tripiridil-triazin (TPTZ), alfa-glukozidaz enzimi, indirgenmiş L-glutasyon ve p-nitrofenil- α -D-glukopiranosid Sigma-Merck firmasından satın alınmıştır.

3.3. Bitkilerin Toplanması ve Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılmak üzere akasyaların çiçeklenme döneminde (Mayıs, 2021) Gümüşhane'nin merkezine bağlı Bağlarbaşı mahallesinde bulunan *Robinia pseudoacacia* (beyaz çiçekli akasya) ve *Robinia hispida* (pembe çiçekli akasya) ağaçlarından çiçekler yapraklarıyla birlikte toplanmıştır. Toplanan bitkilere ait görseller Şekil 6'da yer almaktadır. Beyaz ve pembe akasyanın toplandığı yerlere ait koordinatlar sırasıyla; 40°25' 49.0"N 39°31' 04.8"E ve 40°26' 19.3"N 39°30' 53.9"E.



Şekil 6. *Robinia pseudoacacia* (beyaz akasya) ve *Robinia hispida* (pembe akasya)

Toplanan çiçekler ve yapraklar birbirinden ayrıldıktan sonra tabaka halindeki filtre kâğıtlarına serilerek 2 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra 2 gün boyunca etüvde 50°C'de kurutuldu. Kuruyan çiçek ve yapraklar öğütme değirmeninde toz haline getirildi, cam kavanozlara koyulduktan sonra ağzı sıkıca kapatıldı ve kodlandı. Ardından analizlerde kullanılmak üzere buzdolabına (+4°C) kaldırıldı. Toz halindeki çiçekler ve yapraklar Şekil 7'de görülmektedir. Beyaz çiçek BÇ, beyaz yaprak BY, pembe çiçek PÇ, pembe yaprak PY olarak kodlandı.



Şekil 7. Toz haline getirilmiş çiçek ve yaprak kısımları

Ekstraksiyona başlamadan önce aşağıda belirtilen çözücüler hazırlandı:

%90'lık; etanol/metanol/aseton/dimetil sülfoksit

%70'lık; etanol/metanol/aseton/dimetil sülfoksit

%50'lik etanol/metanol/aseton/dimetil sülfoksit kullanılmıştır.

Santrifüj tüplerine hassas terazide toz halindeki çiçek ve yaprak numunelerinden 1'er gram tartıldı. Her tüpe 25 mL kendi çözücüsü eklenerek vortekslendi. Sonrasında ultrasonik banyoda sık sık sıcaklık kontrolü yapılarak 40°C'de 10+10+10 olacak şekilde toplam 30 dk ekstrakte edildi (Altemimi vd., 2015). Ultrasonik banyo işlemi Şekil 8'de gösterilmektedir.



Şekil 8. Ultrasonik banyo ile ekstraksiyon işlemi

Ultrasonik banyodan alınan örnekler 5000 rpm'de ve 5°C'de 5 dk boyunca santrifüj edildi (Wang vd., 2021). Aktarılabacak tüpler hazırlandı ve santrifüj sonrası

örnekler süzgeç kâğıdı ile farklı tüplere süzüldü (Şekil 9). Ekstraktların son hacmi kendi çözücülerini ile 20 mL'ye tamamlandı ve Tablo 3'te gösterilen kodlamalar yapılarak ağız kapaklı cam tüplere aktarıldıktan sonra buzdolabına (-18°C) kaldırıldı.



Şekil 9. Santrifüj sonrası süzme işlemi ve elde edilen özütler

Tablo 3. Farklı çözücülerle elde edilmiş bitki özütlerinin kodları

Beyaz Akasya (<i>Robinia pseudoacacia</i>)				Pembe Akasya (<i>Robinia hispida</i>)			
Bitki kısmı	Çözücü konst.* (%)	Çözücü	Numune Kodu	Bitki kısmı	Çözücü konst.* (%)	Çözücü	Numune Kodu
Çiçek	50	Aseton	B-1	Çiçek	50	Aseton	P-1
	70		B-2		70		P-2
	90		B-3		90		P-3
Çiçek	50	Etanol	B-4	Çiçek	50	Etanol	P-4
	70		B-5		70		P-5
	90		B-6		90		P-6
Çiçek	50	Metanol	B-7	Çiçek	50	Metanol	P-7
	70		B-8		70		P-8
	90		B-9		90		P-9
Çiçek	50	DMSO	B-10	Çiçek	50	DMSO	P-10
	70		B-11		70		P-11
	90		B-12		90		P-12
Yaprak	50	Aseton	B-13	Yaprak	50	Aseton	P-13
	70		B-14		70		P-14
	90		B-15		90		P-15
Yaprak	50	Etanol	B-16	Yaprak	50	Etanol	P-16
	70		B-17		70		P-17
	90		B-18		90		P-18

Tablo 3. (Devamı)

Beyaz Akasya (<i>Robinia pseudoacacia</i>)				Pembe Akasya (<i>Robinia hispida</i>)			
Bitki kısmı	Çözücü konst.* (%)	Çözücü	Numune Kodu	Bitki kısmı	Çözücü konst.* (%)	Çözücü	Numune Kodu
Yaprak	50	Metanol	B-19	Yaprak	50	Metanol	P-19
	70		B-20		70		P-20
	90		B-21		90		P-21
Yaprak	50	DMSO	B-22	Yaprak	50	DMSO	P-22
	70		B-23		70		P-23
	90		B-24		90		P-24

*konst.: Konsantrasyon

3.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (TPC)

Bu yöntem, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşiklerin Folin reaktifi ile alkali ortamda mor-menekşe renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Bu kompleks 765 nm’de maksimum absorbands oluşturur (Slinkart ve Singleton, 1977).

Numunelerdeki toplam fenolik madde miktarları, kolorimetrik olarak tayin edileceği için öncelikle seyreltmeler yapılarak farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 200, 400, 500, 1000 µg/mL) standart olarak kullanılan gallik asit hazırlandı ve çalışıldı. Analiz için tüplere; 100 µL numune/standart çözeltisi eklendi. Sonrasında 500 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında karanlıkta 5 dk bekletildi. Bekleme sonrası 400 µL Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek tekrar vortekslendi ve üzerine 4 mL saf su eklendi. Tekrar oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 765 nm’de absorbands okundu.

3.5. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini (TFC)

Toplam flavonoid içeriği (TFC), alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik metodu kullanılarak belirlendi. Metodun prensibi, AlCl₃’ün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asitte kararlı kompleksler oluşturması esasına dayanmaktadır. Buna ek olarak, AlCl₃, flavonoidlerin A- veya B- halkalarının orto-dihidroksil grupları ile de kompleks oluşturmaktadır. Sonuçlar standart flavonoid madde olan kuersetin veya kateşin eş değeri olarak verilmektedir (Chang vd., 2002).

Standart olarak kateşin kullanıldı ve analiz için tüplere; 250 µL numune/kateşin eklendi. Üzerine 1.25 mL saf su ve 75 µL %5’lik NaNO₂ çözeltisi eklendi ve vortekslenerek 6 dakika karanlık alanda beklemeye bırakıldı. Ardından 150 µL %10’luk AlCl₃ çözeltisi eklendi ve tekrar vortekslenerek 5 dakika beklemeye bırakıldı. Son

olarak 0.5 mL 1 M NaOH ilave edildi ve toplam hacim, saf su ile 2.5 mL'ye tamamlandı. Sonrasında spektrofotometrede 510 nm'de absorbanslar okundu.

3.6. Bitkilerin Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi

3.6.1. ABTS^{•+} Radikali Temizleme Yöntemi

Re vd. (1999) tarafından geliştirilen yöntem ABTS radikali temizleme aktivitesi testi modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntem, çeşitli maddelerin antioksidan kapasitelerinin, Troloks[®] eşdeğer kapasitesi (TEAC) açısından ABTS^{•+} radikalini kullanarak belirlenmesine dayanmaktadır (Re vd., 1999).

Stok ABTS solüsyonunu hazırlamak için 5mL, 7 mM ABTS^{•+} radikal katyon solüsyonuna 5 mL, 2.45 mM potasyum persülfat solüsyonu eklenerek karıştırıldı ve karanlıkta oda sıcaklığında 16 saat bekletildi. Daha sonra mavi-yeşil çözeltinin absorbansı 734 nm'de 0.70 ($\pm$ 0.02) AU'ya ayarlanana kadar etanol ile seyreltildi. Standart olarak Troloks[®] kullanıldı ve bir kalibrasyon grafiği elde etmek için etanol ile farklı konsantrasyonlara seyreltildi (25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL). Analiz için tüplere 50 μ L standart/numune eklendi ve üzerine 1950 μ L ABTS solüsyonu eklenerek karıştırıldı ve vortekslendi. Sonrasında 6 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda absorbanslar 734 nm'de okundu.

3.6.2. DPPH• Radikali Temizleme Yöntemi

Bu analiz için Brand-Williams vd. (1995) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), mor renkli bir organik azot radikalidir. 515 nm'de maksimum UV-vis absorpsiyonuna sahiptir. Antioksidan molekülle reaksiyona girdiğinde indirgenir ve çözelti içerisinde rengi açık sarıya döner (Brand-Williams vd., 1995).

DPPH analizi için öncelikle manyetik karıştırıcı üzerinde DPPH solüsyonu hazırlandı. Standart olarak Troloks[®] kullanıldı. Tüplere 3.9 mL DPPH çözeltisi ve 0.1 mL standart/numune çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Karışımlar 60 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda absorbanslar 515 nm'de okundu.

3.6.3. Demir (Fe⁺³) İndirgeyici Güç Yöntemi (FRAP)

Benzie ve Strain (1996) tarafından TPTZ kullanılarak geliştirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemde göre indirgeme kuvveti, numunelerin dolaylı olarak toplam

indirgeme potansiyelini göstermektedir. Fe^{+3} 'ün Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ile 595 nm'de maksimum absorbans veren $\text{K}_3(\text{Fe})\text{CN}_6$ renkli kompleksi oluşmaktadır (Benzie ve Strain, 1996).

Standart olarak Troloks® kullanıldı ve analiz için öncelikle demir tuzu radikal çözeltisi hazırlandı. pH 3.6'da sulu asetat tamponu, FeCl_3 çözeltisi ve TPTZ (2,4,6-tripiridiller-triazin) çözeltileri sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılarak $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3]$ demir tuzu radikal çözeltisi oluşturuldu. Ardından tüplere 1950 μL radikal çözeltisi ve 50 μL standart/numune eklendi ve vortekslendi. Sonrasında 20 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. Bekleme süresi sonrasında absorbanslar 595 nm'de okundu.

3.6.4. Cu^{+2} İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Bu analiz için Apak vd. (2004) geliştirdiği yöntem kullanıldı. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neocuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır (I)-neocuproin [Cu(I)-Nc] şelatına indirgenmesi yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplandı (Apak vd., 2004).

Standart olarak Troloks® kullanıldı. Öncelikle test tüplerine 500 μL CuCl_2 , 500 μL neocuproine ve 500 μL NH_4Ac eklendi. Üzerine 100 μL standart/numune eklendi. Sonrasında 450 μL saf su eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. İnkübasyon sonrası 450 nm'de absorbanslar ölçüldü.

3.7. Bitkilerin Antidiyabetik Etkilerinin Belirlenmesi

Enzim inhibisyonu analizinde; α -glukozidaz inhibisyon aktivitesini değerlendirmek için Tao vd.'nin kullandığı yöntem uygulanmıştır (Tao vd., 2013). Bu yöntemde, α -glukozidaz aktivitesi, α -glukozidazın, *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosidi hidrolize ederek, mevcut α -glukozidaz aktivitesiyle orantılı bir kolorimetrik ürün oluşumuyla sonuçlanan bir reaksiyonla belirlenir. Numunelerin α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi 405 nm'deki absorbans değişiklikleri gözlemlenerek her örnek farklı konsantrasyonlarda çalışılarak IC_{50} değerleri hesaplandı.

Analizde kullanılmak üzere enzimi seyreltmek için 0,1 mM sodyum fosfat tamponu hazırlandı ve enzim 1:100 oranında seyreltildi. Aktivite ölçme işleminde kullanmak için de 0.1 M sodyum fosfat tamponu hazırlandı. Test tüplerine 730 μL saf su, 200 μL 0.1 M tampon, 20 μL enzim ve numune (her seferinde farklı konsantrasyonlarda) eklendi. Ardından substrat olarak 50 μL *p*-nitrofenil- α -D-

glukopiranosid eklenerek 3 dk sonra 405 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Kontrol tüplerine numune dışında tüm pipetlemeler sağlanarak ölçüm yapıldı.

3.8. Bitki Özütlерinde HPLC-MS/MS Analizi

Akasya çiçek ve yapraklarında fenolik ve flavonoid bileşenler LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yöntemi ile hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. LC-MS/MS Şartları

Akasya numunelerinin LC-MS/MS analizleri hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirilmiştir. Sistem Agilent 1260 serisi LC ve buna kombine edilen Agilent 6460Triple Quad LC-MS Jet Stream’den (AJS/ESI) oluşmaktadır. Analizde kütle spektroskopisi (MS) metodunda iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonlaşma (ESI) modu kullanılmıştır. İyonizasyonda hem pozitif hem de negatif iyonizasyondan yararlanılmıştır. Analiz için Eclipse Plus Phenyl Hexyl (4.6*150mm 3.5µm) kromatografi kolonu kullanılmıştır. Analiz öncesinde numuneler 0.22 µL şırınga filtresinden geçirildikten sonra sisteme enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20µL, akış hızı 0.5 mL/dk ve kolon fırını sıcaklığı 40°C’dir. Mobil faz çözeltileri olarak 1 mM amonyum format (A) ve metanol:asetonitril karışımı (65/35) (B) kullanılmıştır. Gradient program Tablo 4’teki gibidir.

Tablo 4. LC analizinde kullanılan gradient akış programı

Zaman (dk)	A (%)	B (%)	Akış (mL/dk)	Maksimum basınç sınırı (bar)
0.0	95.0	5.0	0.50	500.00
1.0	95.0	5.0	0.50	500.00
30.0	0.0	100.0	0.50	500.00
31.0	95.0	5.0	0.50	500.00
40.0	95.0	5.0	0.50	500.00

LC/MS-MS cihazı ile yapılan analizde numunelerde dimetoksisinamik asit, hidroksibenzoik asit, apigenin, biochanin, kafeik asit, klorojenik asit, sinnamik asit, kumarik asit, daidzein, ellagik asit, emodin, ferulik asit, gallik asit, genistisin asit, hesperidin, kaempferol, luteolin, m- kumarik asit, miristik asit, naringenin, oksalik asit, p-kumarik asit, pinobanksin, pinostrobin, protokateşik asit, kuersetin, rosmarinik asit, sinapik asit, süksinik asit, siringik asit, tartarik asit, trans-sinamik asit, vanilik asit standartlarının varlığı nitel ve nicel olarak araştırılmıştır.

ESI için optimal koşullar şu şekildedir: 350°C'de 10 mL/dk gaz akışı, 400°C'de 10 mL/dk'da sheath gazı akışı; 45 psi'lik nebulizatör basıncı. Yürütmede pozitif ve negatif modlar 3500 V kapiler voltajı ve 500 V nozzle voltajı olarak ayarlanmıştır.

3.9. Bitki Özütlelerinde Renk Analizi

Akasya özütlelerinin renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) bir kolorimetre cihazı (Konica Minolta, CR400, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Okuma sırasında kabın orta noktasına cihaz tam düz bir şekilde yerleştirilerek okuma yapıldı. Her bir değer için üç ölçüm yapılarak ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Numune olarak beyaz ve pembe akasyaların çiçek ve yapraklarının farklı polaritelerdeki 4 çözücünün (1.aseton, 2.etanol, 3.metanol, 4.DMSO) çeşitli konsantrasyonlarındaki (%50-70-90) özütleleri kullanılmıştır.

3.10. Bitki Özütlelerinde ICP-MS Analizi

Akasya çiçek ve yapraklarında mineral analizi ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi) yöntemi ile hizmet alımı karşılığında BAP projesi kapsamında Gümüşhane Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. ICP-MS Şartları

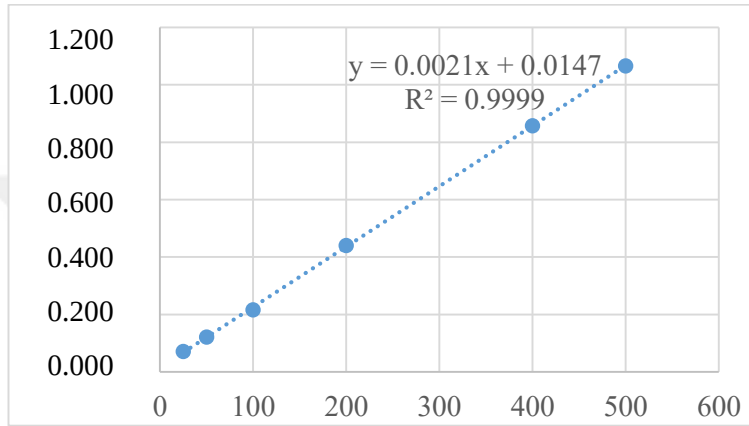
Akasya numunelerinin ICP-MS analizi hizmet alımı karşılığında BAP projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir. Agilent 7700 Serisi kullanılmıştır. Gaz olarak argon ve argon gaz basıncı 500-700 kPa olarak kullanılmıştır. Helyum gaz basıncı; 90-130 kPa, taşıyıcı gaz akış oranı; 0.99 L/dk, helyum gaz akış oranı; 4.5 mL/dk, plazma gaz akış oranı; 15 L/dk olarak uygulanmıştır. Plazma Gücü 1550 W olarak belirlenmiştir. Su sıcaklığı 15-45°C ve sprej chamber sıcaklığı: 2 °C olarak kullanılmıştır. Plazma modu; Low Matrix, nebulizer pompa hızı; 0.3 rps olarak ayarlanmıştır. Numune alımı 42 sn ve stabilize 45 sn olarak belirlenmiştir. Entegrasyon zamanı ise 0.1-1.0 sn/Point olarak kullanılmıştır.

ICP-MS cihazı ile yapılan analizde numunelerde lityum, sodyum, magnezyum, alüminyum, potasyum, kalsiyum, vanadyum, krom, manganez, demir, kobalt, nikel, bakır, çinko, arsenik, selenyum, rubidyum, stronsiyum, gümüş, kadmiyum, sezyum, baryum, kurşun ve bizmut elementlerinin içerikleri araştırılmıştır.

4. BULGULAR

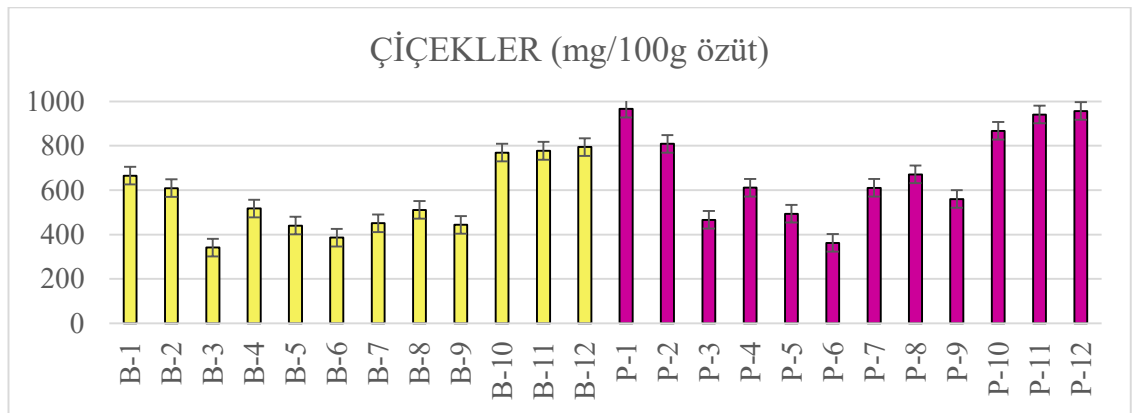
4.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini Bulguları

Toplam fenolik madde tayini yönteminde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. 765 nm’de gallik asit konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine ait standart kalibrasyon grafiği Şekil 10’da verilmiştir.

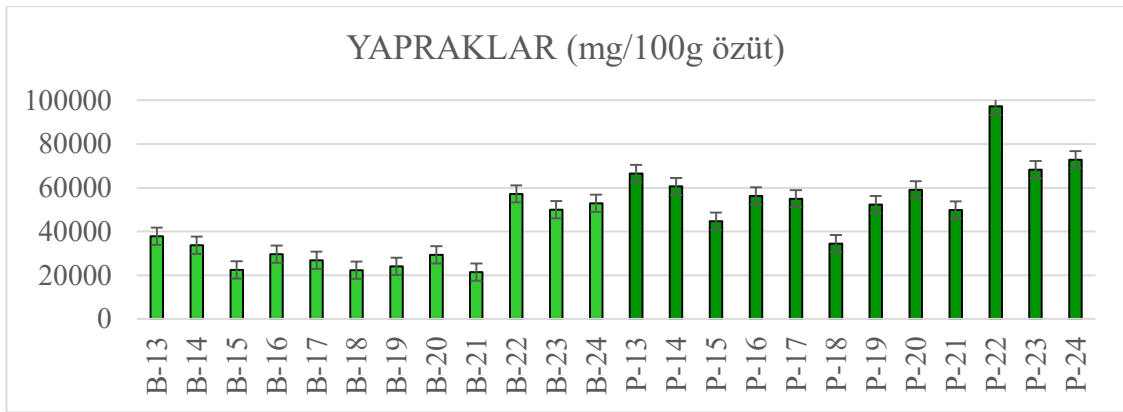


Şekil 10. Toplam fenolik madde tayini yönteminde gallik asitin standart kalibrasyon grafiği

Bitki özütlerinde toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. 100 mL özütte eşdeğer miktarda µg gallik asit $y = 0.0021x + 0.0147$ denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. Grafikler Şekil 11 ve Şekil 12’de verilmiştir.



Şekil 11. Bitkilerin çiçek özütlerinin toplam fenolik madde miktarları (mg/100g özüt)



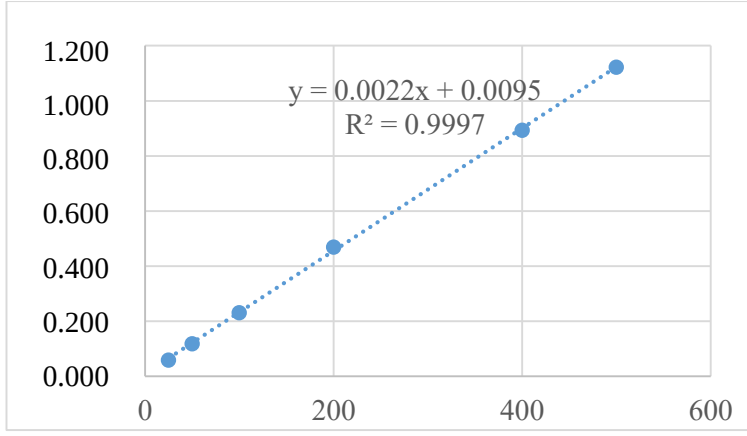
Şekil 12. Bitkilerin yaprak özütlerinin toplam fenolik madde miktarları (100 g özütteki mg gallik asit eşdeğer miktarı)

Bitki özütlerinin yapraklarına ait fenolik madde miktarları çiçeklere oranla oldukça yüksektir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipleri açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha fazla miktarda fenolik madde içermektedir. Çiçek ve yapraklarda çözücü tipi etkisi karşılaştırıldığında: DMSO > aseton ~ metanol ~ etanol olarak sıralanabilir.

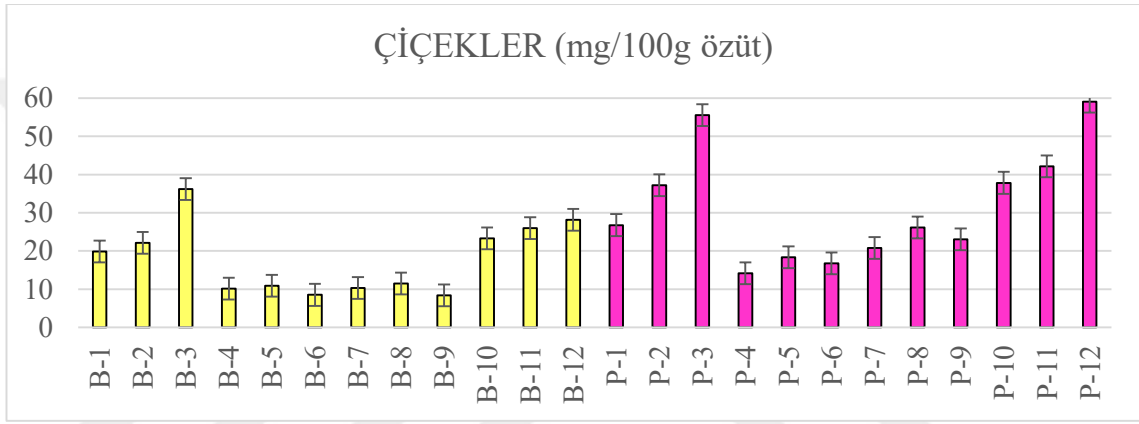
Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonunun fenolik madde miktarına etkisine de bakılmıştır. Aseton ve etanollü ekstraktlarda çözücü konsantrasyonu arttıkça ekstrakte edilen fenolik madde miktarında azalma olduğu görülmüştür. DMSO çözücüsünde ise çiçeklerde tam tersine çözücü konsantrasyonu arttıkça fenolik madde miktarında da artış söz konusudur. Ancak metanollü ekstraktlarda düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiş, fenolik madde miktarı açısından metanolde en iyi konsantrasyon %70 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde DMSO'lu yaprak ekstraktlarında da düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiş, fenolik madde miktarı açısından DMSO'da en iyi konsantrasyon %50 olarak belirlenmiştir.

4.2. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Tayini Bulguları

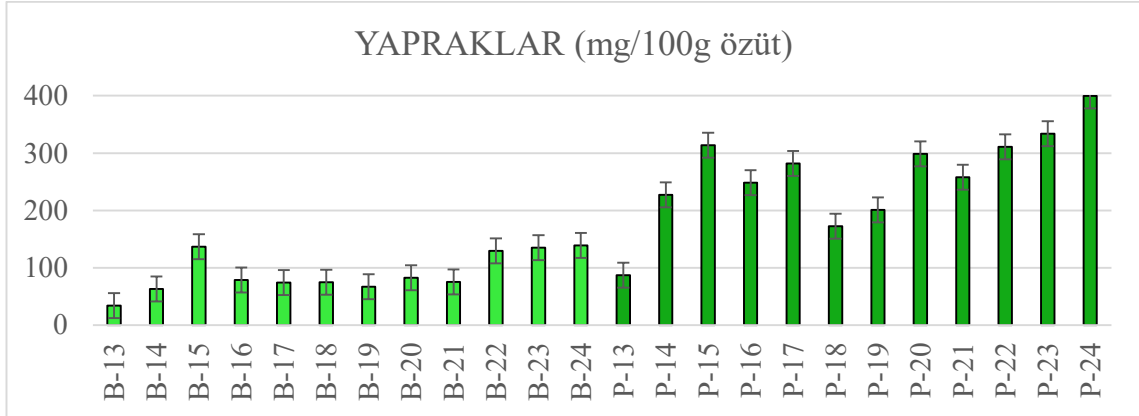
Toplam flavonoid madde tayini yönteminde standart olarak kateşin kullanılmıştır. 510 nm'de kateşin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerine ait standart kalibrasyon grafiği Şekil 13'te verilmiştir. Bitki özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları (mg/100g özüt) Şekil 14 ve Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 13. Toplam flavonoid madde tayini yönteminde kateşinin standart kalibrasyon grafiği



Şekil 14. Bitkilerin çiçek özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları (mg/100g özüt)



Şekil 15. Bitkilerin yaprak özütlerinin toplam flavonoid madde miktarları (mg/100g özüt)

Bitki özütlerinin yapraklarına ait flavonoid madde miktarları çiçeklere oranla daha yüksektir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipleri açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha fazla miktarda flavonoid madde içermektedir. Çiçek ve yapraklarda çözücü tipinin etkisi benzer olup

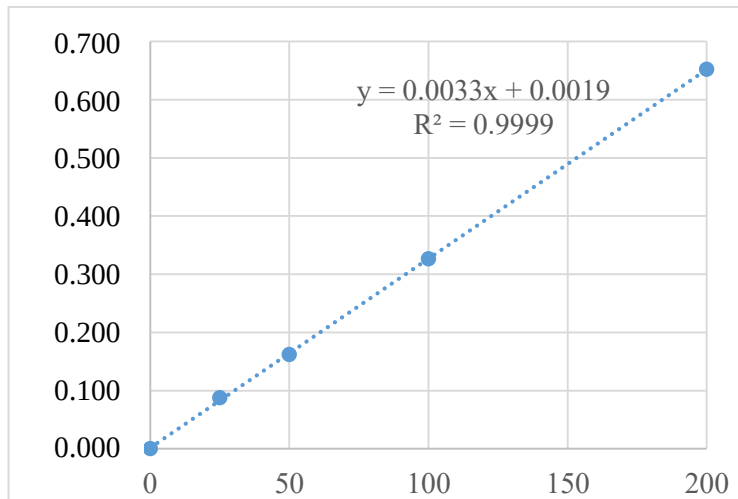
flavonoid miktarı açısından DMSO ve aseton çözücileri diğerlerine oranla daha etkin bulunmuştur. Çiçeklerde çözücü tipi etkisi: DMSO ~ aseton > etanol ~ metanol olarak sıralanabilir. Yapraklarda ise çözücü tipi etkisi: DMSO > aseton > etanol ~ metanol olarak sıralanabilir.

Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonun flavonoid madde miktarına etkisine de bakılmıştır. Aseton ve DMSO'lu özütlerde çözücü konsantrasyonu arttıkça ekstrakte edilen flavonoid madde miktarında artma olduğu görülmüştür. Ancak etanollü ve metanollü ekstraktlarda düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiş, flavonoid madde miktarı açısından her ikisinde de en iyi konsantrasyon %70 olarak belirlenmiştir.

4.3. ABTS Analizi Bulguları

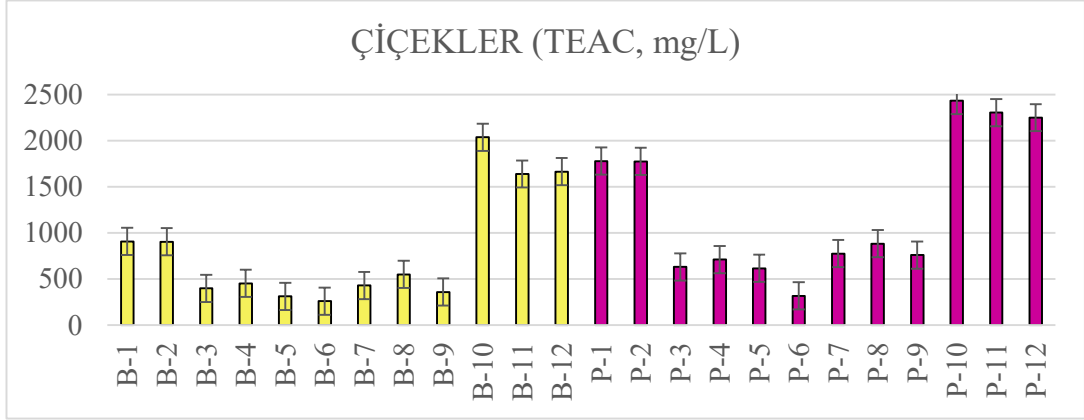
Bitki özütlerinin ABTS^{•+} radikal temizleme aktivite analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılarak ön deneme yapılmış, çalışılacak konsantrasyonlara karar verilmiştir. Çiçek özütlerinin 1:5, 1:10 ve 1:20; yaprak özütlerinin 1:50 ve 1:100 seyreltik konsantrasyonlarında analiz ve ölçümler yapılmıştır.

Bitki özütlerinin ABTS^{•+} radikal temizleme aktiviteleri TEAC (mg/L) cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks standardına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 16'da verilmiştir.

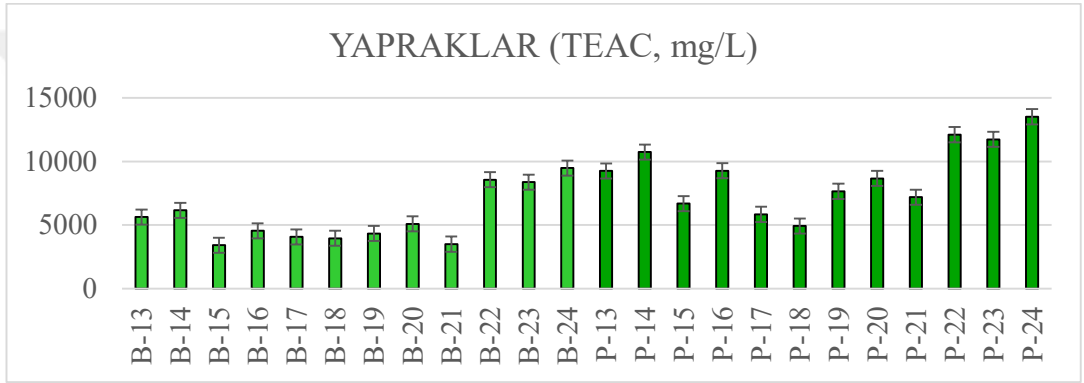


Şekil 16. ABTS^{•+} radikali temizleme aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği

Şekil 17 ve Şekil 18'de bulunan grafikler 734 nm'de farklı konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerlerini göstermektedir.



Şekil 17. Bitkilerin çiçek özütlerinin 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen TEAC değerleri (mg/L)



Şekil 18. Bitkilerin yaprak özütlerinin 734 nm'deki ABTS radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen TEAC değerleri (mg/L)

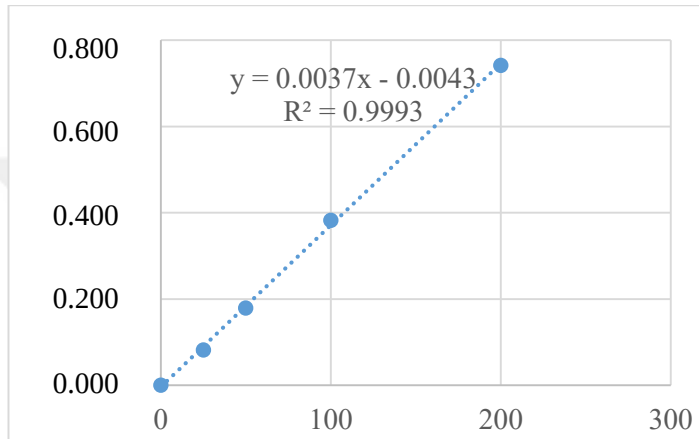
Bitki özütlerinin % ABTS^{•+} radikali temizleme aktiviteleri de TPC ile benzer sıralamaya sahiptir. Sonuçları arasında pozitif korelasyon olduğu söylenebilir. Bitki özütlerinin yapraklarına ait ABTS TEAC değerleri çiçeklere oranla 5-6 kat daha yüksektir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipi açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha yüksek TEAC değerlerine sahiptir. Çiçek ve yapraklarda çözücü tipi etkisi karşılaştırıldığında: DMSO > aseton > metanol ~ etanol olarak sıralanabilir. Bu sıralama TPC ile benzerlik göstermektedir.

Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonunun ABTS^{•+} radikal temizleme aktivitesine etkisine de bakılmıştır. Ancak özütlerde düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiştir. Çiçeklerde %50 DMSO, yapraklarda ise %90 DMSO ABTS^{•+} radikali temizleme aktivitesi açısından en iyi ekstraksiyon çözücüsü olarak değerlendirilebilir.

4.4. DPPH• Analizi Bulguları

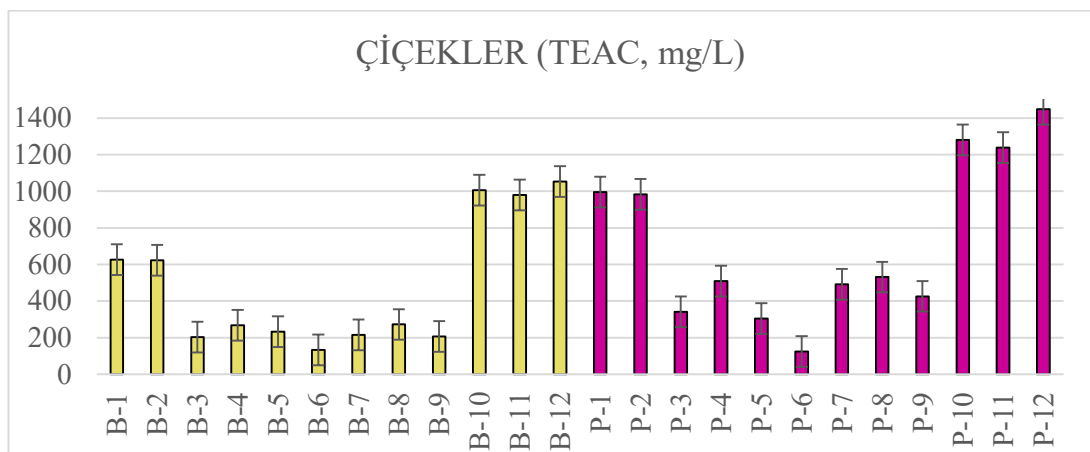
Bitki özütlerinin DPPH• radikal temizleme aktivite analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılarak ön deneme yapılmış, çalışılacak konsantrasyonlara karar verilmiştir. Çiçek özütlerinin 1:5, 1:10 ve 1:20; yaprak özütlerinin 1:50 ve 1:100 seyreltik konsantrasyonlarında analiz ve ölçümler yapılmıştır.

Bitki özütlerinin DPPH• radikal temizleme aktiviteleri TEAC (mg/L) cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks® standardına ait absorbans-konsantrasyon grafikleri Şekil 19'da verilmiştir.

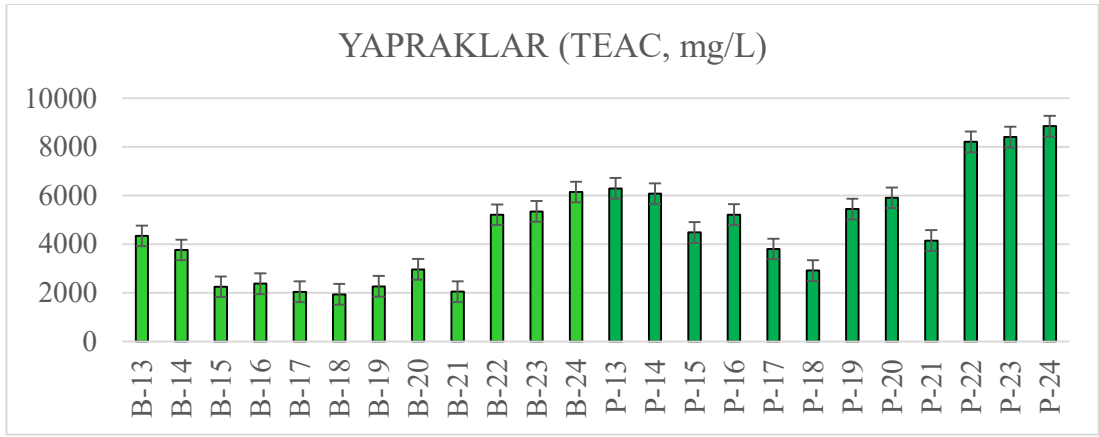


Şekil 19. DPPH• radikali temizleme aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği

Şekil 20 ve Şekil 21'de bulunan grafikler 515 nm'de farklı konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerlerini göstermektedir.



Şekil 20. Bitkilerin çiçek özütlerinin 515 nm'deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen TEAC değerleri (mg/L)



Şekil 21. Bitkilerin yaprak özütlerinin 515 nm'deki DPPH• radikali temizleme aktivitesi analizi sonucu elde edilen TEAC değerleri (mg/L)

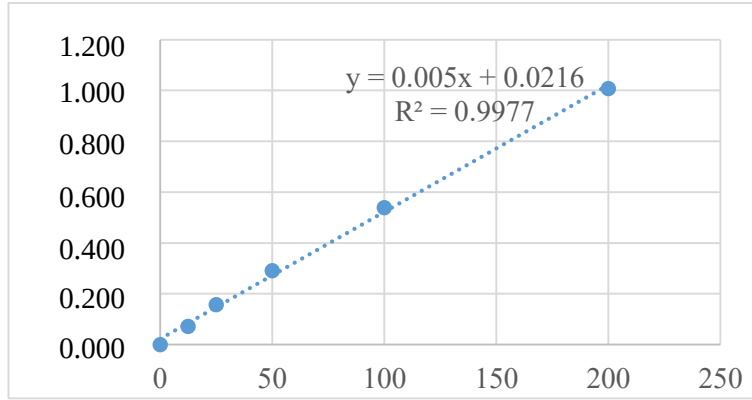
Bitki özütlerinin DPPH• radikali temizleme aktiviteleri de TPC ve ABTS ile benzer sıralamaya sahip olup yaprak özütlerinin radikal temizleme aktivitesi çiçek özütlerinininkine oranla oldukça yüksektir. Diğer analiz sonuçlarıyla karşılaştırıldığında aralarında pozitif korelasyon olduğu söylenebilir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipleri açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha iyi radikal temizleme aktivitesine sahiptir. Çiçek ve yapraklarda çözücü tipi etkisi karşılaştırıldığında: DMSO > aseton > metanol ~ etanol olarak sıralanabilir. Bu sıralama TPC ve ABTS ile benzerlik göstermektedir.

Grafikler incelendiğinde, DMSO ve asetondan elde edilmiş olan bitki özütlerinin DPPH• radikalini en fazla temizlediği görülmektedir. Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonunun DPPH• radikal temizleme aktivitesine etkisine de bakılmıştır. Aseton ve etanollü özütlerde çözücü konsantrasyonu arttıkça DPPH• radikali temizleme aktivitelerinde TEAC cinsinden azalma olduğu görülmüştür. DMSO çözücüsünde ise çiçeklerde tam tersine çözücü konsantrasyonu arttıkça DPPH• radikali temizleme aktivitelerinde de artış söz konusudur. Ancak metanollü özütlerde düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiş, fenolik madde miktarı açısından metanolde en iyi konsantrasyon %70 olarak belirlenmiştir. Çiçeklerde ve yapraklarda %90 DMSO DPPH• radikali temizleme aktivitesi açısından en iyi ekstraksiyon çözücüsü olarak değerlendirilebilir.

4.5. FRAP Analizi Bulguları

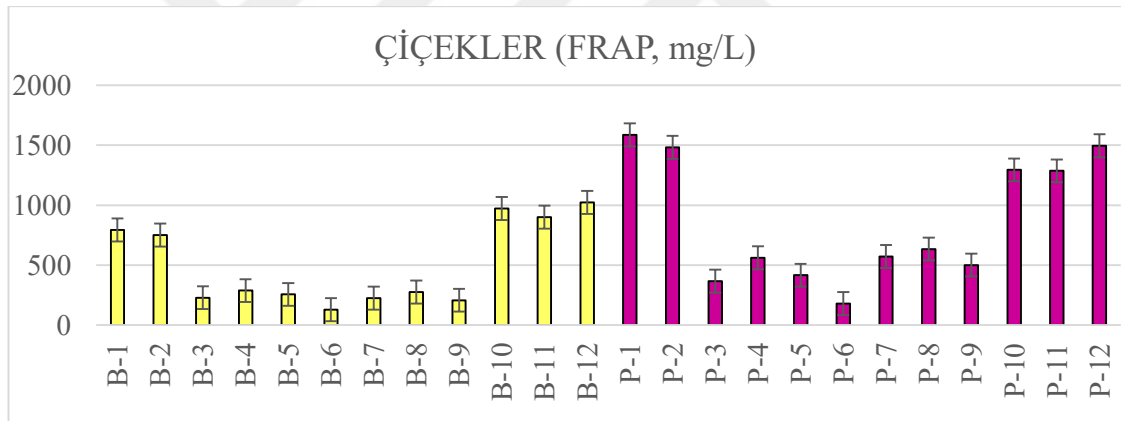
Bitki özütlerinin FRAP analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Absorbans değerlerinin kesinlik ve güvenilirliği açısından numunelerin analiz sonuçları grafiklendirilirken çiçeklerde 1:10; yapraklarda

1:50 ve 1:100 seyreltik konsantrasyonları kullanılmıştır. FRAP değerleri TEAC cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks® standardına ait absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 22’de verilmiştir.

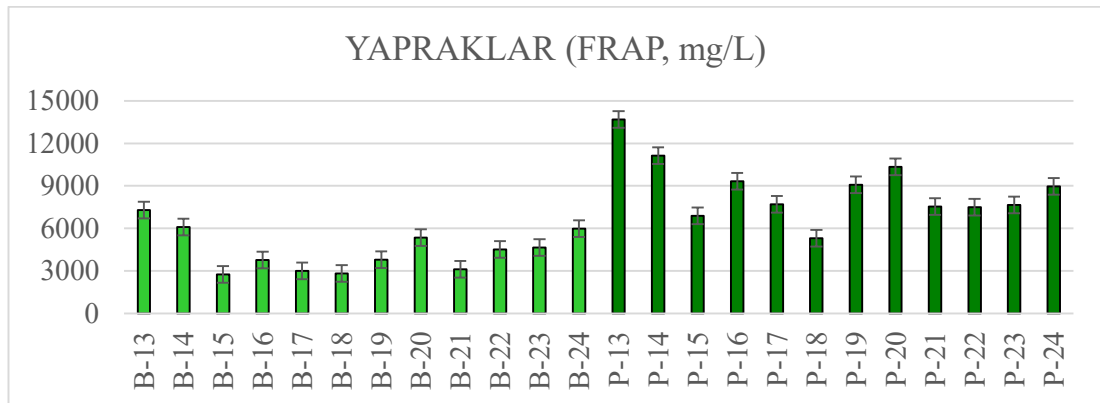


Şekil 22. FRAP aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği

Şekil 23 ve Şekil 24'te bulunan grafikler 595 nm'de farklı konsantrasyonlara karşılık gelen absorbans değerlerini göstermektedir.



Şekil 23. Bitkilerin çiçek özütlerinin 595 nm'deki FRAP değerleri (TEAC; mg/L)



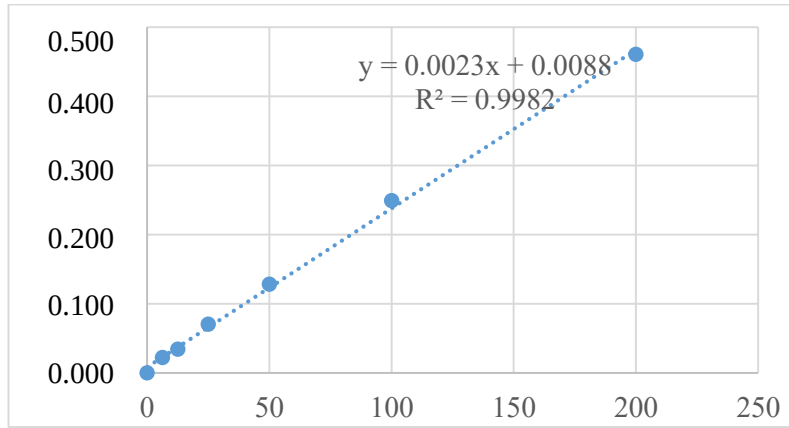
Şekil 24. Bitkilerin yaprak özütlerinin 595 nm'deki FRAP değerleri (TEAC; mg/L)

Bitki özütlerinin Fe^{+3} indirgeme antioksidan gücü değerleri (FRAP) Şekil 23 ve 24'te verilmiştir. Bitki özütlerinin yapraklarına ait FRAP değerleri çiçeklere oranla yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipi açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha yüksek FRAP değerlerine sahiptir. Çiçeklerde ve yapraklarda çözücü tipi etkisi karşılaştırıldığında; aseton ve DMSO çözücüler metanol ve etanolden daha etkilidir. Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonunun FRAP aktivitesine etkisine de bakılmıştır. Ancak özütlerde düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiştir.

Çiçeklerde %90 DMSO, yapraklarda ise %50 aseton FRAP aktivitesi açısından en iyi ekstraksiyon çözücüsü olarak değerlendirilebilir.

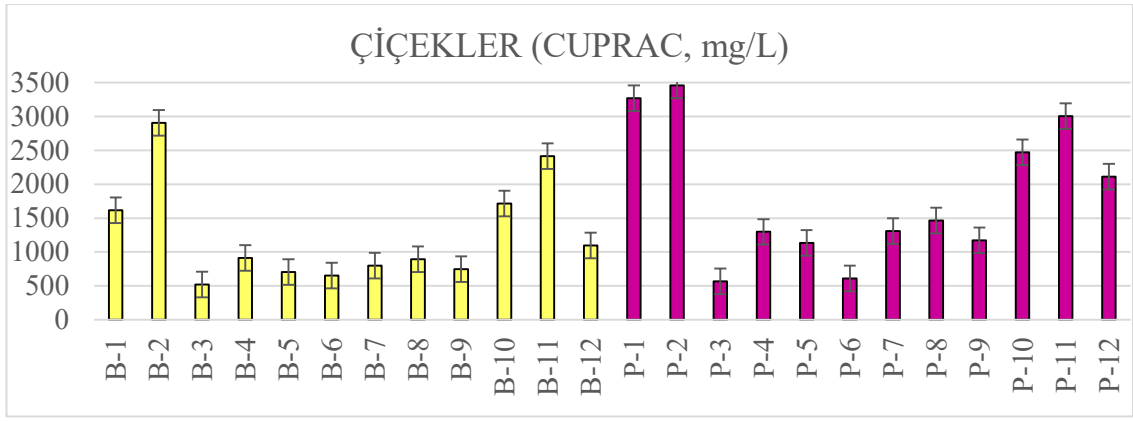
4.6. CUPRAC Analizi Bulguları

Bitki özütlerinin CUPRAC analizinde standart ve numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Absorbans değerlerinin kesinlik ve güvenilirliği açısından numunelerin analiz sonuçları grafiklendirilirken çiçekler için 1:20; yapraklar için 1:100 seyreltik konsantrasyonları kullanılmıştır. CUPRAC değerleri TEAC cinsinden bulunmuştur. Analizde kullanılan Troloks® standardına ait absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 25'te verilmiştir.

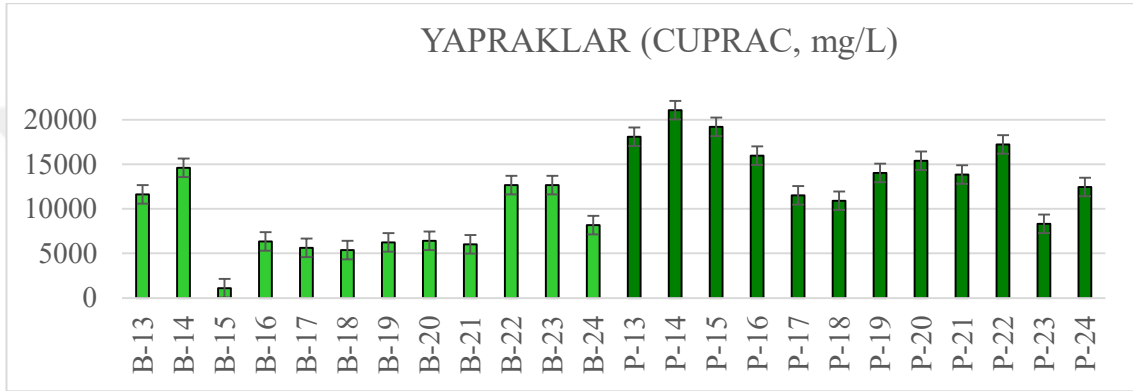


Şekil 25. CUPRAC aktivitesi yönteminde Troloks'un standart kalibrasyon grafiği

Şekil 26 ve Şekil 27'de bulunan grafikler bitki özütlerinin 450 nm'de farklı konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri gösterilmektedir.



Şekil 26. Bitkilerin çiçek özütlerinin 450 nm'deki CUPRAC değerleri (TEAC; mg/mL)



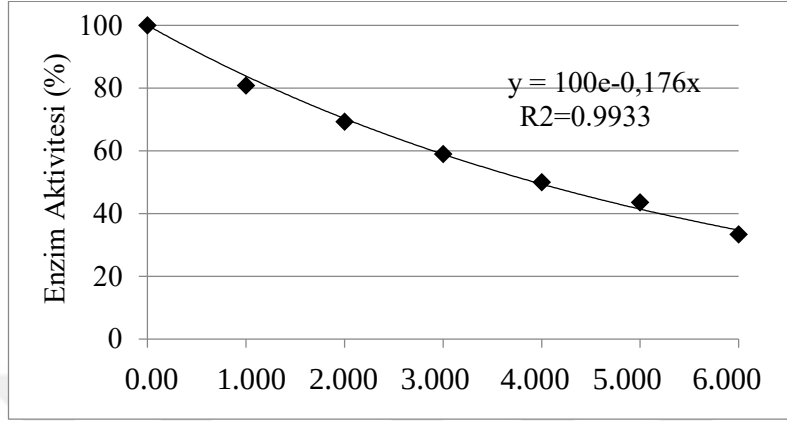
Şekil 27. Bitkilerin yaprak özütlerinin 450 nm'deki CUPRAC değerleri (TEAC; mg/mL)

Bitki özütlerinin Cu^{+2} indirgeme antioksidan kapasite değerleri (CUPRAC) etanol ve metanol çözücülerini açısından diğer antioksidan testlerle benzer sıralamaya sahiptir.

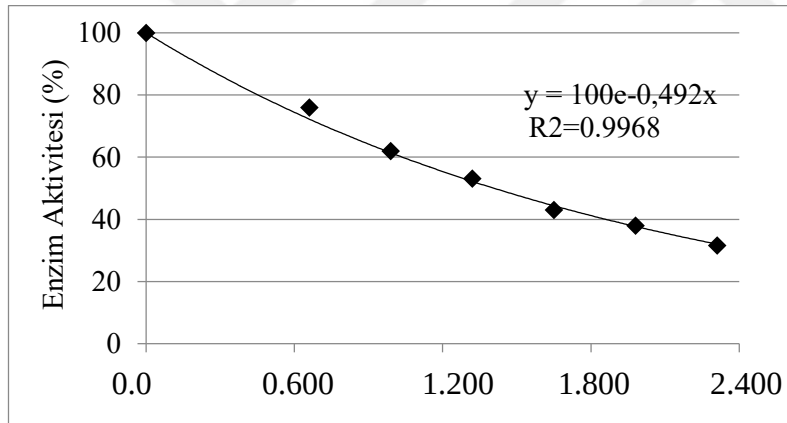
Bitki özütlerinin yapraklarına ait CUPRAC değerleri çiçeklere oranla 7 kat daha yüksektir. Aynı konsantrasyon ve çözücü tipi açısından karşılaştırıldığında genel olarak pembe akasya özütleri beyaz akasya özütlerinden daha yüksek CUPRAC değerlerine sahiptir. Ayrıca, çiçeklerde ve yapraklarda çözücü tipi etkisi karşılaştırıldığında; aseton ve DMSO çözücülerini metanol ve etanolden daha etkilidir. Çözücü tipinin yanı sıra çözücü konsantrasyonunun CUPRAC aktivitesine etkisine de bakılmıştır. Ancak özütlerde düzenli bir artma/azalma gözlemlenmemiştir. Çiçek ve yapraklarda %70 aseton CUPRAC aktivitesi açısından en iyi ekstraksiyon çözücüsü olarak değerlendirilebilir.

4.7. Alfa-glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Analizi Bulguları

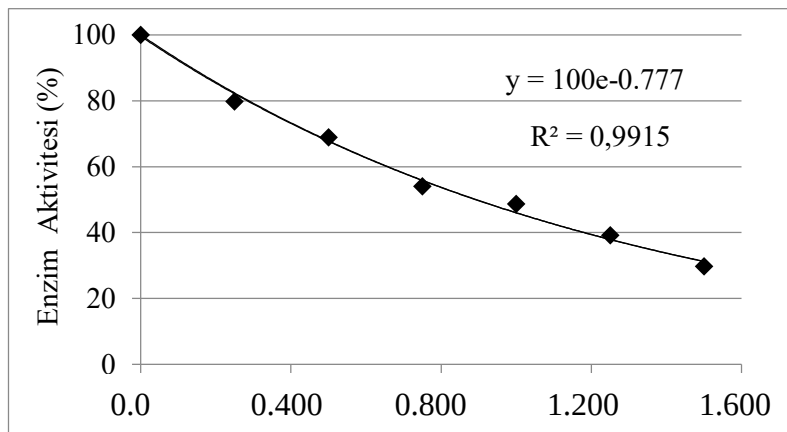
Bitki özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyonu aktivite analizi için etanollü (%100) özütler hazırlanmıştır. Numuneler farklı konsantrasyonlarda çalışılarak % enzim aktivitesine karşılık gelen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) grafikleri Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30 ve Şekil 31’de verilmiştir.



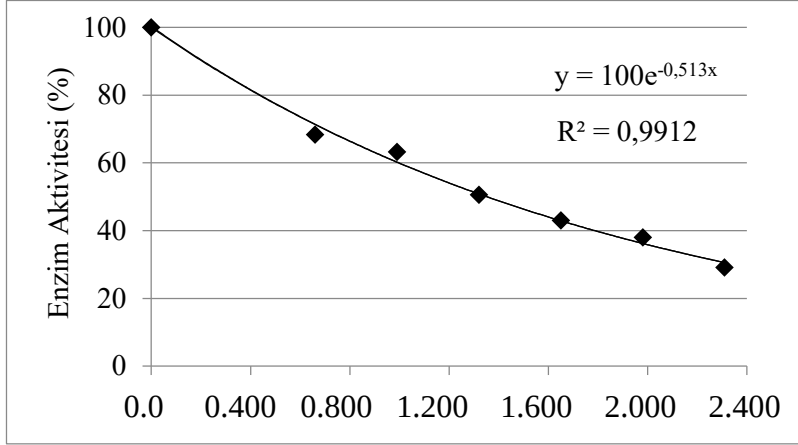
Şekil 28. α -Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan beyaz akasya çiçeğinin etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği



Şekil 29. α -Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan beyaz akasya yaprağının etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği



Şekil 30. α -Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan pembe akasya çiçeğinin etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği



Şekil 31. α -Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile çalışılan pembe akasya yaprağının etanol özütü için çizilen enzim aktivitesi-konsantrasyon grafiği

α -Glukozidaz enzim inhibisyon aktivitesi yöntemi ile elde edilen grafiklerden hesaplanan IC_{50} ve R^2 değerleri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Beyaz ve pembe akasya bitkilerinin çiçek ve yaprak özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) ve R^2 değerlerinin karşılaştırılması

Bitki etanol özütü	IC_{50} ($\mu g/mL$)	R^2
Beyaz Akasya-çiçek	3.938	0.9933
Beyaz Akasya-yaprak	1.409	0.9968
Pembe Akasya-çiçek	0.892	0.9915
Pembe Akasya-yaprak	1.351	0.9912

Bitkilerin etanol özütlerinin α -glukozidaz enzim inhibisyonu analizi sonucu elde edilen IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında pembe akasya çiçek özütü diğerlerine oranla oldukça düşük bulunmuştur. IC_{50} değerinin düşük olması inhibisyon aktivitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Dolayısıyla pembe akasya çiçek özütünün antidiyabetik aktivite potansiyeli diğerlerinden daha iyi olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte aynı kısımlar kendi aralarında karşılaştırıldığında (çiçek ve yaprak) pembe akasya etanol özütlerinin antidiyabetik enzim aktivitelerinin beyaz akasyaya kıyasla daha iyi olduğu söylenebilir. Bu farklılığın kaynağının pembe akasya çiçeklerinin kırmızı/mavi/mor renkli flavonoid grubu bileşiklerinden olan antosiyanin içeriğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

4.8. HPLC-MS/MS Analizi Bulguları

LC analizinde fenolik madde analizi için ters faz kolon kullanıldığından özütlerde çözücünün polar olması tercih edilir. Kullanılan çözücülerin polariteleri

karşılaştırıldığında suya en yakın olan metanoldür. Metanollü özütler arasından da TPC ve antioksidan analizlerde en iyi sonuç verenler %70 metanollü özütlerdir. Bu nedenle daha iyi sonuç vereceği düşünüldüğünden akasyaların çiçek ve yapraklarının %70 metanollü çözücülerine ait olanlar seçilmiş ve bu 4 özütte fenolik ve flavonoid bileşenler LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi/kütle spektrometresi) yöntemi ile hizmet alımı karşılığında TÜBİTAK-MAM tarafından gerçekleştirilmiştir. Beyaz ve pembe akasyanın çiçek ve yaprak ekstraktlarının LC/MS-MS ile fenolik ve flavonoid analizinde kullanılan çalışma parametreleri Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. LC/MS-MS analizi çalışma parametreleri

FENOLİK / FLAVONOİD	Ana iyon	Ürün iyon	Fragment gerilimi	Çarpışma enerjisi	Polarite
(+)-L-Alliin	178	88	60	16	Pozitif
4 Hidroksibenzoik Asit	137	93	100	22	Negatif
Apigenin	270	153	170	12	Pozitif
Kafeik Asit	179	135	80	22	Negatif
Kateşin	291	139	100	18	Pozitif
Klorojenik Asit	353	85	180	38	Negatif
Sinamik Asit	147	103	40	4	Negatif
Siyanidin Klorit	365	203	100	16	Pozitif
Siyanin Klorit	611	449	80	16	Pozitif
Ellagik Asit	303	257	100	24	Pozitif
Ferulik Asit	193	178	60	6	Negatif
Gallik Asit	169	125	40	6	Negatif
Gentisik Asit	153	108	70	18	Negatif
Kaempferol	287	153	80	34	Pozitif
Luteolin	287	153	100	28	Pozitif
M P Kumarik Asit 10-12	163	119	60	8	Negatif
Naringenin	273	153	110	24	Pozitif
Okzalik Asit	203	131	180	22	Negatif
Pelargonidin HCl	271	215	100	16	Pozitif
Pelargonin Klorit	595	433	100	16	Pozitif
Kuersetin 3 Beta D Glikozit	465	145	130	20	Pozitif
Kuersetin Dihidrat	304	230	100	20	Pozitif
Rozmarinik Asit	359	161	100	16	Negatif
Rutin	611	303	100	16	Pozitif
Salisilik Asit	139	121	100	16	Pozitif
Sinapik Asit	223	121	100	30	Negatif
Süksinik Asit	141	59	50	4	Negatif
Şiringik Asit	197	182	70	10	Negatif
T-3-OH Sinamik Asit	163	119	110	8	Negatif
Tartarik Asit	149	87	60	6	Negatif
Vanilik Asit	167	123	40	4	Negatif

Bitki özütlerinde LC/MS-MS analizi sonucu bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler ve miktarları (ppm) Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Bitki özütlerinin LC/MS-MS analizi sonuçları

Fenolik/Flavonoid Madde	Beyaz Akasya Çiçek **	Pembe Akasya Çiçek**	Beyaz Akasya Yaprak**	Pembe Akasya Yaprak**	LOD*/(ppm)
Apigenin	<LOD*	<LOD*	3895.6850	<LOD*	0.02
Kafeik Asit	0.0275	0.0480	0.0280	<LOD*	0.02
Kateşin	1.0400	4.6660	2.8340	16.1030	0.01
Sinamik Asit	0.1750	0.3125	0.1625	0.0460	0.02
Siyanidin Klorit	1.0810	0.0535	2.3345	0.3745	0.01
Ferulik Asit	0.0080	<LOD*	0.0170	<LOD*	0.01
Gallik Asit	0.0130	0.1090	0.0510	<LOD*	0.02
Kaempferol	0.5205	0.1100	0.2195	0.0895	0.01
Naringenin	0.1090	0.2425	1.0200	1.0840	0.01
Pelargonidin HCl	1015.6300	1209.1850	452.4200	995.7150	0.01
Kuersetin 3 Beta D Glikozit	4.3200	4.9650	6.8100	49.6900	0.02
Kuersetin Dihidrat	0.9340	1.5390	4.2980	26.8445	0.02
Rutin	4.1315	5.7180	5.2175	56.9265	0.01
Sinapik Asit	0.0325	<LOD*	<LOD*	<LOD*	0.02
Süksinik Asit	0.8740	0.4205	0.7575	1.1765	0.01
Tartarik Asit	0.0370	<LOD*	0.1650	0.0985	0.003

*Dedeksiyon limitinin (LOD) altında olduğundan miktarı belirlenememiştir.

**Hesaplamalar ppm cinsinden yapılmıştır.

Özütlerin fenolik madde miktarları farklı tür çiçeklerde farklılık göstermekle birlikte genellikle aynı fenolik bileşiklere rastlanmıştır. Bazı standartların miktarları tespit sınırının (LOD) altında kaldığından özütlerde bu standartların miktarları belirsiz olup tabloda “<LOD*” şeklinde verilmiştir. Apigenin bileşiği yalnız beyaz çiçekli akasya yaprağında bulunmuş olup miktarı çok yüksektir (3895.6850 ppm). Pelargonidin-HCl bileşiği ise tüm özütlerde mevcut olup özellikle çiçek özütlerinde yüksek miktarda bulunmuştur. Onu sırasıyla diğer bileşenlere göre miktarları yüksek olan kuersetin-3-beta D-glikozit ve rutin takip etmiştir. Çiçek ve yaprak özütleri kendi aralarında karşılaştırıldığında genellikle pembe akasyaya ait özütlerde standart bileşik miktarları beyaz akasya özütlerine oranla daha yüksek miktarlardadır. Bu veriler TPC, TFC ve antioksidan analiz sonuçlarıyla örtüşmektedir.

4.9. Renk Analizi Bulguları

Bitki ekstraktlarının renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) 3 paralel olarak ölçülmüş, ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 8 ve Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8. Beyaz akasya özütlerinin renk değerleri

NUMUNELER	L	a	b
B-1	46.33+0.108	-0.53+0.031	17.92+0.05
B-2	46.84+0.09	-1.13+0.04	17.42+0.04
B-3	47.64+0.25	-2.30+0.03	17.04+0.03
B-4	47.07+0.02	-0.20+0.04	16.44+0.01
B-5	47.02+0.04	-0.94+0.03	17.67+0.02
B-6	46.88+0.02	-3.46+0.03	18.29+0.03
B-7	47.50+0.04	-0.07+0.03	15.77+0.02
B-8	47.64+0.03	-0.39+0.02	16.02+0.02
B-9	46.52+0.03	-2.20+0.01	17.27+0.02
B-10	47.35+0.01	-0.06+0.03	22.16+0.03
B-11	47.74+0.02	-0.49+0.01	22.74+0.03
B-12	45.12+0.03	-4.44+0.01	27.72+0.04
B-13	40.71+0.02	-2.91+0.03	28.53+0.05
B-14	29.78+0.05	-8.79+0.03	24.78+0.04
B-15	38.02+0.03	-15.54+0.03	30.58+0.09
B-16	43.11+0.05	-1.81+0.06	24.14+0.15
B-17	32.45+0.01	-7.37+0.04	26.88+1.13
B-18	31.07+0.01	-16.44+0.01	25.53+0.03
B-19	47.10+0.03	0.11+0.06	14.09+0.03
B-20	41.88+0.02	-3.20+0.05	27.97+0.04
B-21	37.84+0.04	-12.72+0.04	31.98+0.05
B-22	36.29+0.02	-3.12+0.03	27.41+0.03
B-23	36.13+0.02	-7.08+0.01	26.25+0.01
B-24	26.24+0.01	-8.41+0.05	13.05+0.06

*Değerler ortalama $\pm$ standart sapmayı temsil eder (N=3).

Renk analizinde; L^* değeri açıklık (lightness) koordinatı olup $L^*=0$ siyahı ve $L^*=100$ beyazı ifade eder. a^* değeri kırmızı/yeşil koordinatı olup $+a^*$ kırmızıyı, $-a^*$ ise yeşili ifade eder. b^* değeri sarı/mavi koordinatı olup $+b^*$ sarıyı, $-b^*$ ise maviyi ifade eder. Bu bilgiler ışığında, renk değerleri sıralandığında; bitkilerin çiçek özütlerinin açıklık değerleri (L) yapraklardan daha yüksektir. Çiçek özütlerinde açıklık değerleri çözücü tipine bağlı olmaksızın birbirine oldukça yakındır. Yaprak özütlerinde ise açıklık değerleri sıralaması şu şekildedir: metanol > etanol > aseton > DMSO. Çözücü konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında ise, çözücü miktarı suya oranla arttıkça açıklık değeri azalmaktadır.

Tablo 9. Pembe akasya özütlerinin renk değerleri

NUMUNELER	L	a	b
P-1	42.86+0.03	1.80+0.02	16.68+0.01
P-2	45.57+0.06	0.31+0.01	15.34+0.07
P-3	47.05+0.19	-1.03+0.02	15.37+0.03
P-4	42.35+0.02	4.36+0.03	13.18+0.04
P-5	43.73+0.02	2.92+0.07	12.64+0.03
P-6	45.12+0.02	0.88+0.03	13.74+0.01
P-7	44.67+0.02	2.43+0.03	12.69+0.01
P-8	43.99+0.01	2.39+0.03	14.48+0.01
P-9	44.54+0.07	-0.53+0.05	17.44+0.06
P-10	44.78+0.01	2.06+0.04	19.98+0.01
P-11	45.54+0.02	1.54+0.03	20.32+0.03
P-12	39.97+0.02	1.31+0.05	26.12+0.07
P-13	40.52+0.02	-2.66+0.03	27.23+0.05
P-14	33.77+0.06	-8.89+0.03	28.81+0.18
P-15	35.51+0.03	-16.87+0.03	30.94+0.07
P-16	44.75+0.05	-0.83+0.05	21.06+0.02
P-17	34.33+0.02	-7.90+0.02	29.54+0.02
P-18	28.87+0.00	-15.85+0.07	23.17+0.11
P-19	46.15+0.02	0.13+0.02	17.26+0.01
P-20	41.94+0.01	-2.20+0.05	26.52+0.07
P-21	39.89+0.03	-10.00+0.04	38.78+0.09
P-22	41.07+0.01	-1.65+0.03	25.93+0.04
P-23	37.65+0.02	-3.59+0.03	28.79+0.08
P-24	31.14+0.02	-7.23+0.05	21.52+0.04

*Değerler ortalama $\pm$ standart sapmayı temsil eder (N=3).

Bitkilerde çiçek özütlerinin a değerleri birbirine oldukça yakındır. Yaprak özütlerinde ise çözücü konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında yeşillik değerleri sıralaması beklenildiği gibi çözücü konsantrasyonunun artışına bağlı olarak yeşillik değerleri de artmıştır: %90 çözücü > %70 çözücü > %50 çözücü.

Bitkilerde b değerleri pozitif olduğundan sarı/mavi rengi ifade eder. Yaprak özütlerinin b değerleri çiçek özütlerinden oldukça yüksektir.

Genellikle çözücü konsantrasyonu arttıkça bu değerde de artış gözlemlenmiştir.

4.10. ICP-MS Analizi Bulguları

Analizde standart olarak kullanılan minerallerin kalibrasyon parametleri Tablo 10'da verilmiştir. *Robinia pseudoacacia* ve *Robinia hispida* bitkilerinin çiçek ve yaprak özütlerinin mineral içerikleri Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10. Analizde standart olarak kullanılan minerallerin kalibrasyon parametreleri

Element	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	Geri Kazanım (%)	R ²
Li	0.0488	0.1626	99	0.9998
Na	0.0336	0.112	106	0.9997
Mg	0.03	0.1001	112	0.9996
Al	0.0335	0.1118	104	0.9996
K	0.0426	0.142	111	0.9999
Ca	0.0432	0.1442	95	1.0000
V	0.0344	0.1149	105	0.9999
Cr	0.0311	0.1038	106	0.9998
Mn	0.0298	0.0994	107	0.9998
Fe	0.0328	0.1095	107	0.9995
Co	0.0296	0.0987	106	0.9998
Ni	0.0377	0.1257	109	0.9998
Cu	0.0262	0.0875	104	0.9999
Zn	0.0662	0.2207	115	0.9997
As	0.0289	0.0965	100	0.9995
Se	0.0289	0.0966	100	0.9998
Rb	0.0285	0.0952	101	0.9997
Sr	0.0322	0.1074	107	0.9998
Ag	0.0577	0.1925	107	0.9995
Cd	0.0953	0.3179	101	0.9995
Cs	0.0299	0.0997	102	0.9997
Ba	0.0265	0.0883	110	0.9994
Pb	0.031	0.1033	102	0.9994
Bi	0.0437	0.1457	103	0.9994

*LOD: tespit sınırı (Limit of detection), LOQ: miktar sınırı (Limit of quantification)

ICP-MS metodu ile gerçekleştirilen mineral analizi sonuçlarına göre bitki özütlerinde yüksek oranda potasyum elementi saptanmıştır. Onu sırasıyla kalsiyum ve magnezyum elementleri takip etmektedir. *Robinia pseudoacacia* ve *Robinia hispida* bitkilerinin çiçek ve yaprak özütlerinin mineral içerikleri Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. *Robinia pseudoacacia* ve *Robinia hispida* bitkilerinin çiçek ve yapraklarının mineral içerikleri (mg/kg)

Element	Pembe Akasya (çiçek)	Beyaz Akasya (çiçek)	Pembe Akasya (yaprak)	Beyaz Akasya (yaprak)
Li	1.496 ± 0.154	0.704 ± 0.101	0.229 ± 0.034	0.209 ± 0.047
Na	24.200 ± 1.094	34.450 ± 0.686	12.675 ± 0.143	22.527 ± 0.815
Mg	2287.289 ± 32.268	1676.136 ± 16.236	2803.725 ± 27.435	3115.169 ± 45.334
Al	161.975 ± 6.865	160.228 ± 0.603	50.410 ± 0.276	95.289 ± 1.847
K	22712.215 ± 128.924	26078.072 ± 38.657	12886.784 ± 64.472	15867.926 ± 105.077
Ca	2447.926 ± 16.423	1550.508 ± 13.395	6011.032 ± 38.121	5463.151 ± 11.171

Tablo 11. (Devamı)

V	0.397 ± 0.014	0.377 ± 0.006	0.108 ± 0.002	0.234 ± 0.001
Cr	0.617 ± 0.016	0.584 ± 0.002	0.293 ± 0.001	0.489 ± 0.015
Mn	39.925 ± 1.241	28.382 ± 0.059	62.161 ± 0.458	40.953 ± 1.556
Fe	185.277 ± 7.524	201.893 ± 1.180	7.702 ± 0.376	154.554 ± 5.999
Co	0.130 ± 0.005	0.102 ± 0.001	0.101 ± 0.002	0.116 ± 0.006
Ni	4.593 ± 0.135	5.913 ± 0.030	1.338 ± 0.009	2.876 ± 0.074
Cu	6.061 ± 0.186	9.707 ± 0.045	4.369 ± 0.022	10.074 ± 0.278
Zn	23.254 ± 0.599	31.064 ± 0.261	16.395 ± 0.130	30.619 ± 0.892
As	0.053 ± 0.000	0.109 ± 0.001	0.035 ± 0.001	0.098 ± 0.03
Se	0.018 ± 0.005	0.020 ± 0.004	0.016 ± 0.004	0.032 ± 0.002
Rb	14.225 ± 0.289	5.867 ± 0.073	6.482 ± 0.029	3.077 ± 0.047
Sr	24.300 ± 0.725	7.415 ± 0.053	50.909 ± 0.295	28.145 ± 0.850
Ag	0.010 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.018 ± 0.002	0.008 ± 0.002
Cd	0.012 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.013 ± 0.001
Cs	0.166 ± 0.007	0.151 ± 0.007	0.081 ± 0.005	0.040 ± 0.001
Ba	15.432 ± 0.369	5.249 ± 0.042	29.085 ± 0.228	14.534 ± 0.279
Pb	0.366 ± 0.009	1.443 ± 0.037	0.158 ± 0.006	0.992 ± 0.025
Bi	0.061 ± 0.000	0.040 ± 0.004	0.024 ± 0.003	0.013 ± 0.001

5. TARTIŞMA

İnsanların beslenme şekilleri, hayat şartları ve teknolojinin de hızla gelişimi sonucu ortaya çıkan stres faktörleri, organizmada serbest radikallerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Çevresel faktörler ve vücutta gerçekleşen metabolizma olayları sonucunda oluşan serbest radikallerin miktarı, dengeyi bozacak şekilde arttığında oksidatif stres ortaya çıkar (Kisaoglu vd., 2013). Serbest radikal süpürücü olarak tanınan antioksidanlar, güçlü aktiviteleri sayesinde serbest radikallerin neden olduğu, metabolizma faaliyetleri sonucu ortaya çıkan olumsuz durumları ve hastalıkları büyük oranda engelleyerek bağışıklık sistemine yardımcı olurlar (Burdock, 1998). Bitkiler ve bitkisel ilaçlar içerdikleri fenolik bileşikler sayesinde oksidatif stresin neden olduğu birçok hastalığın tedavisinde kullanılırlar (Grassi vd., 2010).

Hallman ve arkadaşlarının (2020) yaptığı bir çalışmada *Robinia hispida* ve *Robinia pseudoacacia* türlerinin sadece çiçeklerine ait %80 metanollü özütlerinde toplam polifenol ve toplam flavonoid testleri HPLC yöntemi ile ölçülmüştür. Toplam polifenol miktar analizinde değerler sırasıyla; 11.08 ± 0.07 mg/g ve 4.31 ± 0.06 mg/g'dır. Toplam flavonoid miktar analizinde ise değerleri; 7.81 ± 0.01 mg/g ve 1.92 ± 0.01 mg/g'dır. Bu değerler iki türün çiçeklerine ait özütlerin fenolik asitler bakımından zengin olduğunu, önemli ölçüde polifenol içeriğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca sonuçların çoğuna göre *Robinia hispida*'nın *Robinia pseudoacacia*'ya göre oldukça daha fazla kuru madde içerdiği sonuçlarda bildirilmiştir (Hallman, 2020). Aynı çalışmada *Robinia hispida* ve *Robinia pseudoacacia*'nın çiçek özütlerinden ABTS radikali temizleme yöntemi ile antioksidan aktivite testi yapılmıştır. Sonuçlar sırasıyla; 4.51 ± 0.03 mM/g ve 1.75 ± 0.03 mM/g olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre *Robinia hispida*'nın *Robinia pseudoacacia* türüne göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır (Hallman, 2020). Jia ve arkadaşlarının (2017) *Robinia pseudoacacia* L. ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada %70 etanollü ekstraktlarının flavonoid içeriklerinin önemli ölçüde yüksek olduğu bildirilmiştir (Jia vd., 2017).

Katiki ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu bir çalışmada *Robinia pseudoacacia* L.'nin çözücü olarak metanol kullanılarak ve ultrasonik banyoda ekstrakte edilerek elde edilen özütleri ile yapılan analizlerde fenolik içeriği tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 209.9 ± 7.0 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada *Robinia pseudoacacia* L.'nin antioksidan aktivite ölçüm analizlerinden biri olan ORAC testi ile yüksek antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Değer trolox eşdeğeri olarak 1940 µmol TEAC/g olarak hesaplanmıştır (Katiki vd., 2013).

Dokularda serbest radikallerin miktarının artmasıyla oluşan oksidatif stresin yol açtığı hastalıklar arasında diyabet hastalığı da bulunmaktadır (Sezer ve Keskin, 2014). Diyabet hastalığının tedavi yöntemlerinde birden fazla bitkinin kullanılabildiği ve bu bitkilerin kandaki glukoz seviyesini azaltarak antidiyabetik etki gösterdiğini kanıtlayan örnek çalışma bulunmaktadır (Alqahtani, vd., 2020). Bir çalışma da *Robinia pseudoacacia* L.'nin metanol içinde çözölmüş özütlerinin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimlerini inhibisyon aktivitesi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *Robinia pseudoacacia* L.'nin bütirilkolinesteraz daha yüksek olmak üzere iki enzimde de inhibisyon aktivitesi gösterdiğini ve detaylı çalışmalar sonucunda alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Orhan vd., 2004).

Ma ve arkadaşlarının yapmış olduğı bir çalışmada çiçeklerde glikozillenmiş flavonoidlerin karakterize edilmesi için bir LC-Q-TOF-MS metodu geliştirilmiş, glikozillenmiş flavonoidleri tespit edilmiştir (Ma vd., 2021).

Mineral analizi çalışmaları ICP-MS metodu kullanılmaktadır. Bir çalışmada beyaz çiçekli yalancı akasya bitki özütlerindeki mineral içeriğı ICP-MS metodu ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre ekstraktlarda en yüksek oranda bulunan element potasyumdur ve onu sırasıyla magnezyum, sodyum ve kalsiyum takip etmektedir (Ivana vd., 2021).

Yapılan araştırmalar sonucunda *Robinia hispida* ve *Robinia pseudoacacia* türlerine ait toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı analizi ve diğeri antioksidan aktivite analizlerinin literatürde yeterli çalışması olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte *Robinia hispida* türüne ait bir enzim inhibisyonu çalışmasına rastlanmamıştır. Farklı yöntemler kullanılarak antioksidan aktivite ölçüm analizleri gerçekleştirilmiştir. Literatüre kazandırılmak üzere yapılan bu çalışmada iki bitki türünün toplam fenolik madde miktarı analiz sonuçlarına göre çiçek özütleri arasında bulunan en yüksek değer; 967 mg/100g özüt olarak %50 asetonda çözölmüş *Robinia hispida* (P-1) türüne aittir. Çiçek özütlerindeki en düşük değer ise; 342 mg/100g özüt ile %90 asetonda çözölmüş *Robinia pseudoacacia* (B-3) türüne aittir. Yapraklar arasındaki en yüksek değer; 97219mg/100g özüt ile %50 DMSO'da çözölmüş *Robinia hispida* (P-22) ve en düşük değer; 21457mg/100g özüt olarak %90 metanolde çözölmüş *Robinia pseudoacacia* (B-21) türüne aittir. Sonuçlara göre aynı çözöcöü tipi ve konsantrasyonu olarak bakıldığında yaprak özütleri çiçek özütlerine göre oldukça fazla miktarda fenolik madde bulundurmaktadır. İki tür karşılaştırıldığında ise *Robinia hispida* türü *Robinia*

pseudoacacia türüne göre daha fazla fenolik madde içermektedir. Özütler için kullanılan dört farklı çözücü tipi (aseton, etanol, metanol ve DMSO) ve konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar arasında düzenli bir ilişki bulunmamaktadır.

Toplam flavonoid madde miktarı analizinde standart olarak kateşin kullanılmıştır ve en yüksek aktiviteye sahip özüt %70 aseton ile çözülmüş *Robinia hispida* (P-2) özütüdür. Kateşin eşdeğeri cinsinden 63.93 mg/100g olarak hesaplanmıştır. Çiçek özütlerindeki en düşük değer ise; 6,19 mg/100g olarak %90 metanolde çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-9) özütüne aittir. Yaprak özütlerindeki değerlerine bakıldığında en yüksek değer; 344.89 mg/100g %90 DMSO'da çözülmüş *Robinia hispida* (P-24), en düşük değer; 47.85 mg/100g ile %70 DMSO ile çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-23) özütüne aittir.

ABTS analizi sonuçlarına bakıldığında çiçek özütleri arasında en yüksek aktiviteye sahip özüt %50 DMSO'da çözülmüş *Robinia hispida* (P-10) özütü olup TEAC cinsinden değeri 2434 mg/L olarak hesaplanmıştır. Çiçek özütlerindeki en düşük değer ise; 261 mg/L olarak %90 etanolde çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-6) özütüne aittir. Yaprak özütlerindeki TEAC değerlerine bakıldığında en yüksek değer; 13524 mg/L %90 DMSO'da çözülmüş *Robinia hispida* (P-24), en düşük değer; 3412 mg/L ile %90 asetonunda çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-15) özütüne aittir. Elde edilen sonuçlar toplam fenolik madde miktarı analizinin sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

DPPH analizlerinde standart olarak Troloks kullanılmıştır ve değerler TEAC (mg/L) cinsinden hesaplanmıştır. Çiçek özütlerindeki en yüksek değer; 1448 mg/L ile %90 DMSO'da çözülmüş *Robinia hispida* (P-12) özütüne aittir. En düşük değer ise; 124 mg/L ile %90 etanolde çözülmüş *Robinia hispida* (P-6) özütü olarak hesaplanmıştır. Yaprak özütlerindeki en yüksek değer; 8854 mg/L olarak yine çiçeklerde en yüksek değeri veren %90 DMSO'da çözülmüş *Robinia hispida* (P-12) özütüne aittir. En düşük değer ise 1934 mg/L ile %90 etanolde çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-18) özütüne aittir.

FRAP analizinde TEAC (mg/L) cinsinden hesaplanan sonuçlara göre çiçeklerde en yüksek değeri veren özüt 1586 mg/L olarak hesaplanmış ve %50 asetonunda çözülmüş *Robinia hispida* (P-1) türüne aittir. En düşük değer ise; 129 mg/L %90 ile etanolde çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-6) özütüne aittir. Yaprak özütlerinin FRAP analizi sonuçlarında en yüksek değer; 13675 mg/L olarak hesaplandı ve %50 asetonunda çözülmüş *Robinia hispida* (P-13) özütüdür. En düşük değer ise 2748 mg/L ve %90 asetonunda çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-15) özütü olarak bulunmuştur.

CUPRAC analizi sonuçlarında çiçek özütlerine ait TEAC cinsinden hesaplanan en yüksek değer; 3455 mg/L ile %70 asetonda çözülmüş *Robinia hispida* (P-2) özütüdür. En düşük değer ise; 520 mg/L olarak %90 asetonda çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-3) özütüne aittir. Yapraklarda çıkan sonuçlara göre en yüksek değer; 21042 mg/L olarak %70 asetonda çözülmüş *Robinia hispida* (P-14) özütüne aittir. En düşük değer ise 1104 mg/L ile %90 asetonda çözülmüş *Robinia pseudoacacia* (B-15) özütlerine aittir. Antioksidan aktivite analizleri için sonuçlar karşılaştırıldığında hemen hemen hepsi benzerlik göstermektedir. Özellikle *Robinia hispida* türüne ait yaprak özütlerinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır. Literatürde bulunan diğer sınırlı sayıdaki çalışmalar ile karşılaştırıldığında yine benzer sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Çalışmalarda elde edilen antioksidan aktivite ölçüm değerleri, bitkilerin toplandığı bölgenin coğrafi farklılıklarına, deneylerde kullanılan standart bileşik türlerine ve kullanılan ekstraksiyon yöntemlerine göre farklılık gösterebilir.

Bu çalışmada iki bitki türünün de yaprak ve çiçek kısımlarının %100 etanolü ekstraktlarından yapılan analizlerle IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Antioksidan analizlerden farklı olarak *Robinia hispida* çiçek özütü 0.892µg/mL IC₅₀ değeri ile diğer numunelere göre daha çok aktivite göstermiştir. Onu sırasıyla *Robinia hispida* yaprak (1.351µg/mL), *Robinia pseudoacacia* yaprak (1.409µg/mL) ve çiçek (3.938µg/mL) özütleri takip etmiştir. Antioksidan analizlerle benzer şekilde en düşük antidiyabetik aktiviteyi *Robinia pseudoacacia*'nın çiçek özütü göstermiştir. Sonuçlara göre *Robinia hispida* başta olmak üzere iki bitki türünün de önemli oranda antidiyabetik etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Gerçekleştirilen LC-MS/MS analizi ile bitki özütlerinde bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler belirlenmiştir. İki bitki türünün de genellikle aynı fenolik bileşiklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle Pelargonidin-HCl bileşiği miktarı her iki çiçekte de yüksek miktarda bulunmuştur. Onu sırasıyla diğer bileşenlere göre miktarları yüksek olan kuersetin-3-beta D-glikozit ve rutin takip etmektedir.

Renk analizi sonuçlarında renk değerleri sıralandığında; bitkilerin çiçek özütlerinin açıklık değerleri (L) yapraklardan daha yüksektir. En yüksek L değerini; %70 DMSO ile hazırlanan *Robinia pseudoacacia* çiçek özütleri göstermiştir. Yaprak özütlerinde çözücü konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında; çözücü miktarı suya oranla arttıkça açıklık değeri azalmaktadır. Bitkilerde çiçek özütlerinin a değerleri birbirine oldukça yakındır. Yaprak özütlerinde ise çözücü konsantrasyonları açısından karşılaştırıldığında yeşillik değerleri sıralaması beklenildiği gibi çözücü konsantrasyonunun artışına bağlı olarak yeşillik değerleri de artmıştır. Yeşillik değerleri

olarak bakıldığında en yüksek değeri %90 aseton ile hazırlanan *Robinia hispida* yaprak özütleri göstermektedir. Bitkilerde yaprak özütlerinin b değerleri çiçek özütlerinden oldukça yüksektir. En yüksek değeri %90 metanol ile hazırlanan *Robinia pseudoacacia* yaprak özütleri göstermiştir. Genellikle çözücü konsantrasyonu arttıkça bu değerde de artış gözlemlenmiştir.

ICP-MS metodu ile gerçekleştirilen mineral analizi sonuçlarına göre bitki özütlerinde yüksek oranda potasyum elementi saptanmıştır. Onu sırasıyla kalsiyum ve magnezyum elementleri takip etmektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada beyaz ve pembe akasyanın toprak üstü (çiçek ve yaprak) kısımlarından elde edilen özütlerinde biyoaktif bileşen (fenolik-flavonoid) içerikleri, renk özellikleri, antioksidan ve antidiyabetik aktiviteleri araştırılmıştır. Ayrıca, bitki özütlerinde farklı çözücü tipi ve konsantrasyonları kullanılarak antioksidan aktiviteye etkisi araştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda; bitkilerin farklı kısımlarından elde edilen özütlerin içeriğinin fenolik ve flavonoid madde açısından farklılık göstermekle birlikte, çözücü tipi ve konsantrasyonunun bu içeriğin belirlenmesinde önemli bir etken olduğu görülmüştür. İki bitki türüne ait sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- Toplam fenolik madde miktarları çiçeklerde 341,71 mg/100g ile 966,95 mg/100g arasında; yapraklarda 97219 mg/100g ile 21457 mg/100g arasındadır. TPC tayininde en yüksek değere *Robinia hispida* yaprak özütlerinin sahip olduğu görülmüştür. Her iki bitkiye ait yaprak numuneleri karşılaştırıldığında, en yüksek fenolik madde içeriği DMSO çözücüsünün %50 konsantrasyonu ile hazırlanan özütlerinde tespit edilmiştir.

- Toplam flavonoid madde miktarı çiçeklerde 6,19 mg/100g ile 61,93 mg/100g arasında; yapraklarda 344,89 mg/100g ile 47,85 mg/100g arasındadır. TFC tayininde yine yaprak özütleri daha yüksek flavonoid içeriğine sahiptir. En yüksek flavonoid içeriği %90 konsantrasyonunda hazırlanan DMSO'lu pembe yaprakta bulunmasına rağmen, diğer çözücü ve konsantrasyonlarda birbirine yakın değerler almışlardır. Çiçek özütlerinde aseton çözücüsünün %50 ve 70'lik konsantrasyonunda hazırlanmış özütler diğerlerine oranla daha yüksek miktarda flavonoid içeriğine sahiptirler.

- ABTS radikali temizleme yönteminde en yüksek aktiviteyi yine *Robinia hispida* yaprak ekstraktlarının gösterdiği tespit edilmiştir. ABTS yöntemi için özellikle DMSO çözücüsünün radikal temizleme açısından iyi bir seçenek olduğu söylenebilir. Onu aseton takip etmekte olup, etanol ve metanol çözücülerinin çözücü tipi ve konsantrasyonu açısından ABTS radikalini temizlemede benzer özellik sergilediği bulunmuştur.

- DPPH radikali temizleme yönteminde TEAC değerleri çiçeklerde 124 mg/L ile 1448 mg/L arasında; yapraklarda 1934 mg/L ile 8854 mg/L arasındadır. Özütlerin

DPPH radikali temizleme yöntemine ilişkin özellikleri ABTS radikali temizleme yöntemi ile aynıdır. DPPH yöntemi için de DMSO çözücüsü radikal temizleme açısından en iyi seçenektir. En yüksek DPPH temizleme aktivitesi değerleri her iki bitkinin yaprak özütlerinde yüksek bulunmuş olup pembe akasyanın temizleme aktivitesi daha yüksektir.

- FRAP tayininde TEAC değerleri çiçeklerde 129 mg/L ile 1586 mg/L arasında; yapraklarda 2748 mg/L ile 13675 mg/L arasındadır. Bu tayinde de benzer şekilde en yüksek aktiviteyi *Robinia hispida* yaprak ekstraktlarının gösterdiği tespit edilmiştir. Yapraklarda aseton, çiçeklerde ise hem DMSO hem de aseton iyi birer özütleme çözücüsüdür.

- CUPRAC tayininde TEAC değerleri çiçeklerde 520 mg/L ile 3455 mg/L arasında; yapraklarda 1104 mg/L ile 21042 mg/L arasındadır. Bu yöntemde de en yüksek aktiviteyi *Robinia hispida* yaprak ekstraktlarının gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle asetonlu özütlerde genel olarak aktivite değerleri daha yüksektir. Onu DMSO takip etmekte olup, etanol ve metanol çözücülerinin çözücü tipi ve konsantrasyonu açısından CUPRAC tayininde benzer özellik sergilediği bulunmuştur.

- Alfa-glukozidaz enzim inhibisyonunda en yüksek aktiviteyi en düşük IC₅₀ değerine sahip olan *Robinia hispida* çiçek özütlerinin gösterdiği tespit edilmiştir. En düşük aktiviteyi ise antioksidan aktivitelerle benzer şekilde *Robinia pseudoacacia* çiçek özütleri göstermiştir. Bu farklılığın kaynağının pembe akasya çiçeklerinin antosiyanidin içeriğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu açıdan antosiyanin içeriklerinin araştırılması bu sonuca katkı sağlayacaktır.

- HPLC-MS/MS analizinde her iki türe ait çiçek ve yaprak kısımlarındaki fenolik bileşikler karşılaştırılmıştır. Özütlerin fenolik madde miktarları türler arasında farklılık göstermekle birlikte genellikle aynı fenolik bileşiklere rastlanmıştır. Özellikle Pelargonidin-HCl bileşiği miktarı her iki çiçekte de yüksek miktarda bulunmuştur. Onu sırasıyla diğer bileşenlere göre miktarları yüksek olan kuersetin-3-beta D-glikozid ve rutin takip etmiştir. Beyaz akasya yaprağında yüksek miktarda (3895.6850 ppm) apigenin tespit edilmiştir. Pembe akasya yaprağında ise diğer özütlere oranla oldukça yüksek miktarlarda (yaklaşık 10 katı) Quercetin 3 beta D glycoside (49,6900 ppm), Quercetin dihydrate (26.8445 ppm) ve Rutin (56.9265 ppm) tespit edilmiştir.

- Renk analizinde en yüksek L değerini; %70 DMSO ile hazırlanan *Robinia pseudoacacia* çiçek özütleri göstermiştir. a* değeri kırmızı/yeşil koordinatı olup +a* kırmızıyı, – a* ise yeşili ifade eder. Bitkilerde yeşillik değerleri olarak bakıldığında en

yüksek değeri %90 aseton ile hazırlanan *Robinia hispida* yaprak özütleridir. Bitkilerde b değerleri pozitif olduğundan sarı/mavi rengi ifade eder ve en yüksek değeri %90 metanol ile hazırlanan *Robinia pseudoacacia* yaprak özütleri göstermiştir.

- ICP-MS metodu ile gerçekleştirilen mineral analizi sonuçlarına göre bitki özütlerinde en yüksek oranda bulunan element potasyumdur. Özütler arasında en yüksek potasyum miktarı değeri mg/kg cinsinden 26078.072 ± 38.657 ile beyaz akasya çiçek özütlerine aittir. Onu sırasıyla kalsiyum ve magnezyum elementi takip etmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *Robinia hispida*'nın *Robinia pseudoacacia* türüne göre daha yüksek olmak üzere her iki bitki türünün de iyi seviyede antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir. Özellikle yaprak özütlerinin çiçek özütlerine göre oldukça fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bitki türlerinin yüksek oranda içermiş olduğu fenolik bileşikler sayesinde α -glukozidaz enzimini inhibe ederek antidiyabetik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Böylelikle bu çalışmanın her iki bitki türü açısından diyabet ve oksidatif stresin yol açtığı diğer hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek, sentetik ilaçlara göre daha az yan etkiye sahip bitkisel kaynaklı doğal ilaçların üretimi konusunda ileride yapılacak çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development*, 2, 225-231.
- Acıbuca, V. ve Budak, D. B. (2018). Dünya’da ve Türkiye’de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. *Çukurova Tarım Gıda Bilimleri Dergisi*, 33(1), 37-44.
- Akyol, M. A. (2007). *Tavşan modelinde laparoskopik iskemik prekondisyon manevrasının oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Afyonkarahisar.*
- Akyurt, B. (2014). *Ülkemizde tüketilen bazı yaprakların antioksidan ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.*
- Albert, K. ve Zimmet, P. (1998). Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications part 1, diagnosis and classification of Diabetes mellitus provisional report of a who consultation. *Diabet Medicine*, 15, 539–553.
- Al-Dabbas, M. M., Kıtahara, K., Suganuma, T., Hashimoto, F. ve Tadera, K. (2006). Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of varthemia iphionoides boiss. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70, 2178-2184.
- Alqahtani, A. S., Hidayathulla, S., Rehman, M. T., Elgamal, A. A., Al-Massarani, S., Razmovski-Naumovski, V. ve Alajmi, M. F. (2020). Alpha-amylase and alpha-glucosidase enzyme inhibition and antioxidant potential of 3-oxolupenal and katononic acid isolated from nuxia oppositifolia. *Biomolecules*, 10(1), 61.
- Altemimi, A., Choudhary, R., Watson, D. G. ve Lightfoot, D. A. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 247-255.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Arkan, T. (2011). *Daphne oleoides subsp. oleoides ve Daphne sericea’nın farklı çözücülerle antioksidan özellikleri. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.*

- Arunkumar, S. ve Muthuselvam, M. (2009). Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of aloe vera l. against clinical pathogens. *World Journal of Agricultural*, 5,572-576.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M. ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Atabek, E. (1973). *Kapadokyalı Aretaeus monografi, Diyabet Günleri*, Kayseri, 16s.
- Atasoy, N. (2019). Melatonin ve antioksidan etkileri. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9, 196-201.
- Aydemir, S. ve Sarı, E. (2009). Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2, 56-60.
- Bağrıaçık, N. (1997). Diabetes mellitus: tanımı, tarihçesi, sınıflaması ve sıklığı.
- Bahçesel. (t.y.). 21 Aralık 2021 tarihinde, <https://www.bahcesel.net/2223-robinia-yalanci-akasya-cinsi.html> adresinden erişildi.
- Bast, A., Haenen, G. ve Goelmen, JA. (1991). Oxidants and antioxidants: State of the art. *American Journal of Medicine*, 91(3 Suppl 3), 2-13.
- Benzie, I. F. ve Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bourne, Y. and Henrissat, B. (2001). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules. *Current Opinion in Structural Biology*, 11: 593-60015.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. ve Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
- Büyüköztürk, K. (1992). Diabetes Mellitus (Şekerli Diyabet), B. S. Hastalıkları. *İstanbul Tıp Fakültesi Vakfı*, İstanbul. 190-207.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. ve Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 3.
- Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C. ve Mecocci, C. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 841 – 852.

- Coman, C., Rugina, O. D. ve Socaciu, C. (2012). Plants and Natural Compounds with Antidiabetic Action. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1), 314-325.
- Çakatay, U. ve Kayalı, R. (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.
- Çekül (t.y.). 20 Haziran 2022 tarihinde, <https://7agac.cekulvakfi.org.tr/agaclar/yalanci-akasya-robinia-pseudo-acacia-l> adresinden erişildi.
- Çolak, Ö. (2014). *Sakkaroz tayini için biyosensör hazırlanması. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Çöleri, A. (2007). *Bazı termofilik bacillus türlerinin termostabil α -glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. Yayımlanmamış doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.*
- Demir, S. (2010). *Propolis ekstraktlarının fibroblast hücre serilerinde H_2O_2 ile uyarılmış DNA hasarı (genotoksisite) üzerine etkisinin comet assay yöntemi ile araştırılması. Yayımlanmamış yüksek lisans tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.*
- Diabetes Mellitus Sempozyumu, İstanbul, 9-18.
- Emecen, Ö. (2009). *Astımlı hastalarda serum total oksidan/antioksidan status ve ECP düzeylerinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Biyokimya Araştırma Laboratuvarı, İstanbul.*
- Eminağaoğlu, Ö., Beğen, H. ve Aksu, G. (2014). Türkiye'nin Vejetasyon Yapısı (Ü. Akkemik, Çev.). *Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağaç ve Çalıları. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara*, pp. 54-68.
- Fogarty, W. M., ve Kelly, C. T. (1979). *Developments in microbial extracellular enzymes. (A. Wisemann, Çev.). Topics in Enzyme and fermentation biotechnology, Wiley, New York*, 45-108.
- Freeman, B. A. ve Crapo, J. D. (1982). Biology of disease free radicals and tissue injury. *Laboraty Investigation*, 47, 412-426.
- Gavin, L. (1998). New classification and diagnostic criteria for Diabetes mellitus. *Clinical Cornerstone*, 1(3), 1-12.
- Gibbons, B. (2013, 12 Mayıs). 20 Aralık 2021 tarihinde, <https://fineartamerica.com/featured/2-rose-acacia-robinia-hispida-bob-gibbons.html> adresinden erişildi.
- Giles, G. I. ve Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383:375-88.

- Gökpınar, S., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. (2006). Algal antioksidanlar. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 85-89.
- Grassi, D., Desideri, G. ve Ferri, C. (2010). Flavonoids: Antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients*, 2(8), 889-902.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. ve Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases, a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 1-18.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects Medicine*, 8(2), 89-193.
- Hallmann, E. (2020). Quantitative and qualitative identification of bioactive compounds in edible flowers of black and bristly locust and their antioxidant activity. *Biomolecules*, 10, 1603-1617.
- Hartling, L., Dryden, D., Guthrie, A., Muise, M., Vandermeer, B. ve Donovan, L. (2013). Benefits and harms of treating gestational Diabetes mellitus, a systematic review and meta- analysis for the U.S. preventive services task force and the National Institutes of Health Office of Medical Applications of Research. *Annals of Internal Medicine*, 159(2), 123-124.
- Hazar, D., İçöz, A. İ. ve Baktır, İ. (2020). Yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) tohumlarının çimlenmesi üzerine bazı giberellik asit ve skarifikasyon uygulamalarının etkileri. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34, 159-172.
- Himsworth, H. P. (1936). Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive type. *The Lancet*, 127-130.
- Inzucchi, S. E. (2003). Classification and diagnosis of diabetes mellitus, in: Ellenberg & Rifkin's diabetes mellitus. *McGraw-Hill*, New York, 265-277.
- Ivana, A. B., Ivana, M. S. G., Ivan, M. S., Boban, R. S. ve Nada, D. S. (2021). Black locust flowers: Antioxidant extraction kinetics, reducing capacity, mineral composition and antioxidant activity. *Chemical Engineering Communications*.
- Ivorna, M. D., Paya, M. ve Villar, A. (1989). A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. *Journal of Ethnopharmacol*, 27(3), 243-275.
- Jerang, G., Swamy, B. M. V., Kotagiri, S., Dey, T. ve Fariyazl, S. M. (2013). Indian medicinal plants with antidiabetic and related beneficial effects: a review. *Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences*, 2(3): 44-51.

- Jia, X., Zhao, Y. H., Liu, T. ve He, Y. H. (2017). Leaf defense system of *Robinia pseudoacacia* L. seedlings exposed to 3 years of elevated atmospheric CO₂ and cd-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 605-606, 48-57, 52-53.
- Jomova, K. (2011). Valko Madvances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 65-87.
- Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 65-76.
- Karakan, M. ve Nazlıkul, H. (2017). Oksidatif stres ve serbest radikallerin vücut üzerindeki etkisi. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp, Regülasyon ve Nöralterapi Dergisi*, 11(2)
- Karaman, Ö. ve Elgin Cebe, G. (2016). Diabetes and antidiabetic plants used in Turkey, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 40(3), 47-61.
- Kasnak, C. ve Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırması ve insan sağlığına etkileri, *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 3, 226-234.
- Katiki, L. M., Ferreira, J. F. S., Gonzalez, J. M., Zajacc, A. M., Lindsay, D. S., Chagas, A. C. S. ve Amarante, A. F. T. (2013). Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on caenorhabditis elegans, and their antioxidant capacity. *Veterinary Parasitology*, 192, 218-227.
- Kisaoglu, A., Borekci, B., Yapca, O. E., Bilen, H. ve Suleyman, H. (2013). Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *The Eurasian Journal of Medicine*, 45(1), 47.
- Li, A., Li, S., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y. ve Li, H. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6, 6020-6047.
- Ma, X. L., Chen, J. Z., Lu, X., Zhe, Y. T. ve Jiang, Z. B. (2021). HPLC coupled with quadrupole time of flight tandem mass spectrometry for analysis of glycosylated components from the fresh flowers of two congeneric species: *Robinia hispida* L. and *Robinia pseudoacacia* L. *Journal of Separation Science*, 44(7), 1537-1551.
- Mai, T. T., Thu, N. N., Tien, PG. ve Chuyen, V. (2007). Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of vietnamase edible plants and their relation ships with polyphenol contents. *Journal of Nutritional Science and Vitaminolgy*, 53, 267-276.
- Medvei. (1993). *History of Clinical Endocrinology*, 23-34.
- Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.

- Memişoğulları, R. ve Bakan, E. (2004). Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 18, 193– 197.
- Memişoğulları, R., (2003). *Plazma homosistein düzeyleri ile tip 2 diyabet, komplikasyonları, kontrolü ve süresi arasındaki ilişkinin araştırılması. Uzmanlık tezi, Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Erzurum.*
- Menevşeoğlu, A. (2012). *Çilek suyu konsantresi üretim aşamalarında ve depolama sürecinde polifenoller, askorbik asit ve antioksidan aktivitedeki değişimler. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.*
- Meral, R., Doğan, İ. S. ve Kanberoğlu, G. S. (2012). Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2, 45-50.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2005). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. (N. Kılıç, Çev.). Palme Yayıncılık, 183.
- Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M.I. ve Khalid, A. (2004). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 57–60, 59.
- Özcan O, Erdal, H. Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3) 331-336.
- Öztürk, İ. Ç., Öztürk, F., Gül, M., Ateş, B. ve Çetin, A. (2009). Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function*, 27, 309-315.
- Padmavathi, M. (2013). Drug delivery system in nano greens. *International Journal Herbal Medicines*, 1, 56-60.
- Pandey, K. B. ve Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.
- Pitkanen, O. M., Martin, J. M., Hallman, M., Akerblom, H. K., Sariola, H. ve Andersson, S. M. (1992). Free radical activity during development of insülin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sciences*, 50(5), 335-339.
- Price, N. ve Stevens, L. (1982). *Fundamentals of Enzymology*. Oxford University, Press. 33.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O. ve Poitout, V. (2004). B- cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, 119-124.
- Salehi, B., Ata, A., Kumar, N. V. A., Sharopov, F., Ramirez-Alarcon, K., Ruiz-Ortega, A., ... Sharifi-Rad, J. (2019). Antidiabetic Potential of Medicinal Plants and Their Active Components. *Biomolecules*, 9(10), 551.
- Serapark. (t.y.). 20 Aralık 2021 tarihinde, <http://serapark.com.tr/wp-content/uploads/Robinia-pseudoacacia.jpg> adresinden erişildi.
- Sezer, K. ve Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28(1), 49-56.
- Sies, H. (2014). Petroleum Products in Soil Mediated Oxidative Stress in Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Maize (*Zea mays*) Seedlings. *Open Journal of Soil Science*, 4(12).
- Siti, H. N., Kamisah, Y. ve Kamsiah, J. (2015). The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascular Pharmacology*, 71, 40-56.
- Slinkard, K. ve Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Sözmen, E. Y., Emerk, K. ve Sözmen, E. Y. (2002). *İnsan Biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara, pp: 665-674.
- T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. (2016). *Gıdalardaki pigmentler ve fenolik bileşikler*. Ankara, Türkiye.
- Tao, Y., Zhang, Y., Cheng, Y., ve Wang, Y. (2013). Rapid screening and identification of α -glucosidase inhibitors from mulberry leaves using enzyme-immobilized magnetic beads coupled with HPLC/MS and NMR. *Biomedical Chromatography*, 27(2), 148-155.
- Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sarı, R. A. ve Bakan, E. (2002). Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International*, 21(5), 200–204.
- Tokaç, D. (2007). *Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri*. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Turna, İ. ve Turna, H. (2000). Yalancı akasya (*Robinia pseudoacacia* L.) orjinlerinde fidan kalite sınıflarının belirlenmesi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 1(1): 18-26.

- Uzunboy, S. (2015). *Reaktif oksijen türleri kaynaklı dna hasarının modifiye CUPRAC yöntemi kullanılarak incelenmesi. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.*
- Vantyghem, M. C., Mention, C., Dobbelaere, D. ve Douillard, C. (2009). Hypoglycemia and endocrine effects of adults' inborn errors of metabolism. *Annales d'Endocrinologie*, 70, 25–42.
- Vincent, A. M., Russell, J. W., Low, P. ve Feldman, E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews*, 25, 612–628.
- Von-Mehring, J. ve Minkowski, O. (1890). Diabetes mellitus nach pankreasextirpation. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmacologie*, 26, 371-387.
- Wang, Z., Tang, C., Dai, F., Xiao, G. ve Luo, G. (2021). HPLC determination of phenolic compounds in different solvent extracts of mulberry leaves and antioxidant capacity of extracts. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 544-552.
- Yaltırık, F. (2000). *Dendroloji. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 382 s.*
- Yazıcı, Y. T. (2018). *Farklı tohum ekim yöntemlerinin orman gülü (Rhododendron ssp.) tohumlarının çıkış sıklıkları ve fide gelişimi üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Kırşehir, 47s.*
- Yılmaz, İ. (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(2), 143-153.
- Young, I. S. ve Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176-186.
- Zimmet, P., Alberti, K. G. M. M. ve Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414, 782– 787.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimini Fatih İlköğretim okulunda, ortaöğretimini 15 Temmuz Şehitleri Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2014 yılında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik bölümünde lisans eğitimine başladı. 2018 yılında Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

