

***Fagopyrum esculentum* MOENCH'İN DEĞİŞİK
KISIMLARININ UÇUCU BİLEŞİKLERİ, SABİT
YAĞ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

BİLGE KARA

Eskişehir, 2017

***Fagopyrum esculentum* MOENCH'İN DEĞİŞİK KISIMLARININ UÇUCU
BİLEŞİKLERİ, SABİT YAĞ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bilge KARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman:Doç. Dr. GÜlmira ÖZEK**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Mayıs, 2017**

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1504S165. no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bilge Kara'nın "*Fagopyrum esculentum* Moench'in Değişik Kısımlarının Uçucu Bileşikleri, Sabit Yağ ve Biyolojik Aktivite Açısından Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 24/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç Dr. Gülmira ÖZEK

Üye : Prof. Dr. Osman ÜSTÜN

Üye : Prof. Dr. Mine KÜRKÇÜOĞLU



*

ÖZET

Fagopyrum esculentum MOENCH'İN DEĞİŞİK KISIMLARININ UÇUCU BİLEŞİKLERİ, SABİT YAĞ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bilge KARA

Farmakognozi Anabilim Dalı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2017

Danışman: Doç.Dr. Gülmira ÖZEK

Fagopyrum esculentum Moench bitkisinin Eskişehir-Kütahya geçit iklimi koşullarında yetiştirilen Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin yaprak, çiçek, sap, tohum ve kavuz kısımlarının uçucu bileşenleri ve sabit yağ üzerinde kimyasal kompozisyon araştırması gerçekleştirildi. Her iki çeşidin yaprak ve çiçek uçucu yağ ve metanollü ekstraları biyolojik aktivite değerlendirilmesine tabi tutuldu. Proje kapsamında bitkilerin farklı kısımlarından hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağları elde edilerek kompozisyonları GC/FID ve GC-MS teknikleri ile araştırıldı.

Tüm uçucu yağların ortak özelliği, hegzadekanoik asidin (%32.7-83.6) yağların profilinde dominant olmasıdır. Dodekanoik ve tetradekanoik asitler de yüksek miktarda tespit edildi. Seskiterpen bileşiklerden hegzahidrofarnezil aseton tüm yağlarda saptanırken, trans-kalamenen (%8.3) sadece Güneş çeşidinin yaprağında tespit edildi. Yetiştirme sürecinde arazi şartlarında HS-SPME tekniği uygulanarak canlı bitkinin ürettiği uçucu bileşenleri incelenmiş olup, metil palmitat her iki çeşitte yüksek miktarda bulundu.

Bitkinin topraküstü kısmından Folch metodu ile sabit yağ asitleri elde edilerek kompozisyonları gaz kromatografi yöntemiyle araştırıldı. Palmitik (%25.5), linoleik (%17.6) ve linolenik (%25.4) asit ana bileşikler olarak saptandı. Her iki çeşidin çiçek ve yapraklarından metanol kullanılarak maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstralarda toplam fenolik ve toplam flavonoit bileşiklerin miktarları spektrofotometrik olarak tayin edildi. Uçucu yağ ve ekstraların *in vitro* deneylerde serbest radikal süpürme ve demir indirgenme etkileri araştırılarak antioksidan aktiviteleri değerlendirildi.

İnce Tabaka Kromatografisi- Otografi ve Ellman metotlarıyla uçucu yağ ve ekstraların asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkileri araştırıldı. Uçucu yağların serbest radikal süpürme etkisi zayıf olarak (%Inh 9.5-19.9) tespit edilirken, metanollü ekstraların yüksek aktivite (IC₅₀ 0.019-0.173 mg/mL) gösterdiği saptandı. Yaprak uçucu yağların en etkin (% Inh. 63.9-65.8) şekilde AChE enzimini inhibe ettiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: *Fagopyrum esculentum*, Uçucu yağ, Yağ asitleri, Aktivite, GC-MS.

ABSTRACT

INVESTIGATION of *Fagopyrum esculentum* Moench for ESSENTIAL OILS, FATTY ACIDS and BIOLOGICAL ACTIVITY

Bilge KARA

Department of Pharmacognosy

Institute of Health Sciences, May 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülmira ÖZEK

Chemical compositions of volatiles and fatty acids from leaf, flower, stem, seed and hull parts of Gunes and Sumcanka sorts of *Fagopyrum esculentum* Moench. grown in transition climate of Eskisehir-Kutahya region, were investigated. The leaf and flower oils and methanol extracts from the both plant sorts were subjected to evaluation for biological activity tests. In scope of the project, the essential oils were obtained with hydrodistillation method from different plant parts. GC/FID and GC-MS techniques were applied for investigation of the chemical compositions. Hexadecanoic acid (%32.7-83.6) predominated in the profile of all the oils tested.

Dodecanoic and tetradecanoic acids were also detected in high amounts. Sesquiterpene hexahydrofarnesyl acetone was detected in all the oils, while *trans*-calamenene was (%8.3) found only in the leaf oil of Gunes sort. During growing in field conditions the volatiles produced by the live plants were investigated with HS-SPME technique.

The fatty acids were obtained with Folch method from the plant aerial parts and investigated by gas chromatographic techniques. Palmitic (%25.5), linoleic (%17.6) and linolenic (%25.4) acids were found as the main constituents. The flower and the leaf extracts were obtained from two buckwheat sorts by maceration technique and the total phenolic and total flavonoid contents were evaluated spectrophotometrically. The essential oils and extracts were evaluated *in vitro* for antioxidant activity using free radical scavenging and ferric reducing antioxidant capacity assays.

The effects of the oils and extracts on AChE enzyme were investigated by using TLC-autography and Ellman's methods. Free radical scavenging effect of the oil was found as weak (%Inh 9.5-19.9), while the extracts demonstrated significant activity (IC₅₀ 0.019-0.173 mg/mL). The leaf oils were found to be the most effective inhibitors of AChE enzyme (% Inh. 63.9-65.8).

Keywords: *Fagopyrum esculentum*, Essential oil, Fatty acids, Activity, GC-MS.

ÖNSÖZ

Öncelikle, yüksek lisans eğitimim boyunca, yeri geldiğinde abla, yeri geldiğinde ekip arkadaşımız olarak her gün kendimi biraz daha geliştirmemde büyük katkısı olan hem bilimsel hem de manevi anlamda desteğini hissettiğim, danışmanım olduğu için kendimi şanslı hissettiğim, çok değerli hocam Doç. Dr. Gülmira Özek'e,

Çalışmalarımız boyunca teknik ve bilimsel bilgilerini hiç tereddüt etmeden bizlerle paylaşan, her zaman samimi yaklaşımıyla bizleri motive edip gelişmemizde ve öğrenmemizde büyük emekleri olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Temel Özek'e,

Çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz, her türlü öğrenme sürecini paylaştığım ekip arkadaşlarım Yeşim Haliloğlu ve Sülayman Yur'a,

Laboratuvar çalışmalarımızda her zaman ihtiyaç duyduğumuz, tecrübelerini ve bilgisini esirgemeyen hem ağabeyimiz hem de hocamız olan Yard. Doç. Dr. Fatih Göger'e,

Çalıştığımız bitkiyi temin eden Ahmet Güneş ve onun nazarında Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilimsel yaşam tarzı ve bakış açısını benimsememin ve bilimi sevmemin yegâne sebebi olan ve tez çalışma bitkimin yetiştirilmesinde üşenmeden emek veren, bilgi ve tecrübelerinden daima yararlandığım Ziraat Yüksek Mühendisi ve Araştırmacı olan babam İsmail Kara'ya,

Tez çalışmamın muhtelif kısımlarında yardımları dokunmuş olan ve hayatımdaki varlıkları için her zaman minnettar olacağım annem Sevgi Kara, ablam Nurcihan Güven ve kardeşim Yusuf Alper Kara'ya, tecrübelerinden faydalandığım Dr. Erdinç Savaşlı ve Öğr. Gör. Enver Güven'e

Teşekkür ediyorum.

24/05/2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalardan bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı"yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Bilge KARA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	4
2.1. Botanik Bilgiler.....	4
2.1.1. Polygonaceae familyası.....	4
2.1.2. <i>Fagopyrum</i> cinsi.....	5
2.1.3. <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench. türü.....	5
2.2. Kimyasal Bilgiler.....	6
2.3. Biyolojik Aktivite Bilgileri.....	10
2.3.1. <i>Fagopyrum</i> türlerinin halk arasındaki kullanımı.....	10
2.3.2. <i>Fagopyrum</i> türleri üzerine yapılan biyolojik aktivite araştırmaları.....	11
2.3.2.1. Antioksidan aktivite araştırmalarının önemi.....	13
2.3.2.2. Antikolinesteraz aktivite araştırmalarının önemi ve Alzheimer hastalığı.....	14
3. ARAÇ VE YÖNTEMLER.....	16
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	16
3.2. Kullanılan Cihaz ve Apareyler.....	17
3.3. Bitkisel Materyal.....	17

3.4. Uçucu Yağın Elde Edilmesi.....	19
3.5. HS-SPME Tekniği.....	20
3.6. Kombine MSD-SPME-GC/MS Tekniği.....	22
3.7. Sabit Yağ Asitlerin Elde Edilmesi.....	23
3.8. Gaz-Kromatografik Analiz.....	25
3.9. LC-MS Analizleri.....	26
3.10. Ekstraksiyon İşlemi.....	26
3.11. Antioksidan Aktivite Deneyleri.....	27
3.11.1. DPPH deney şartları.....	27
3.11.2. İndirgeme gücü: demiri indirgeme antioksidan kapasitesi (FRAP).....	28
3.11.3. Toplam fenolik bileşik miktar tayini.....	29
3.11.4. Toplam flavonoit miktar tayini.....	30
3.12. Antikolinesteraz Aktivite Deneyi.....	31
3.12.1. İTK-Otografi metodu.....	31
3.12.2. Ellman metodu.....	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Uçucu Bileşenler.....	35
4.1.1. Uçucu yağların verim ve kimyasal kompozisyonu.....	35
4.1.2. Kombine MSD-SPME analiz sonuçları.....	40
4.1.3. HS-SPME analiz sonuçları.....	43
4.2. LC-MS Analiz Sonuçları.....	45
4.3. Antioksidan Aktivite Deneyi Sonuçları.....	51
4.3.1. Serbest radikal süpürme etkisi (DPPH deneyi)	51
4.3.2. İndirgeme gücü aktivite sonuçları.....	52
4.4. Toplam Fenol Miktarı.....	53
4.5. Toplam Flavonoit Miktarı.....	53
4.6. Antikolinesteraz Aktivite.....	54
4.6.1. İTK-Otografi metodu.....	54
4.6.2. Ellman metodu.....	55

5. TARTIŞMA.....	57
5.1. Hidrodistilasyon Yöntemi ile Elde Edilen Uçucu Bileşenler.....	57
5.2. Tarla Şartlarında Gerçekleştirilen HS-SPME Çalışmaları.....	58
5.3. Laboratuvar Şartlarında Gerçekleştirilen MSD-SPME	
Çalışmaları	58
5.4. Sabit Yağ Asitleri Üzerinde Çalışmalar.....	59
5.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	59
5.5.1. Antioksidan aktivite çalışmaları	60
5.5.2. Antikolinesteraz enzim çalışmaları	63
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
KAYNAKÇA.....	67
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Karabuğday meyvesi.....	4
Şekil 2.2	Son 6 yıl içerisinde <i>F. esculentum</i> ile ilgili Yapılmış Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Araştırmalarının sayısı (a) ve Konu ile ilgili Yapılan Atıflar (b)	7
Şekil 2.3	Rutin AlCl ₃ ile Oluşturduğu Kompleks.....	10
Şekil 2.4	D- Fagomin Kimyasal Yapısı.....	10
Şekil 3.1	<i>Fagopyrum esculentum</i> 'un Tarladaki Durumu.....	18
Şekil 3.2	<i>Fagopyrum esculentum</i> 'un Çiçeklenme ve Meyvelenme Aşamalarındaki Durumu.....	18
Şekil 3.3	Tohumların Bitkiden Ayrılması	19
Şekil 3.4	Clevenger Apareyinde Hidrodistilasyon İşlemi.....	19
Şekil 3.5	Arazi Şartlarında Gerçekleştirilen HS-SPME İşlemi.....	20
Şekil 3.6	SPME İşlemi Sonucunda Elde Edilen Uçucu Bileşenlerin Adsorban Maddeden Elüe Edilme İşlemi.....	21
Şekil 3.7	MSD-SPME İşlemi İçin Kullanılan Düzenek.....	22
Şekil 3.8	Ekstrelerin Susuz Na ₂ SO ₄ 'den Geçirilerek Filtrasyon İşlemi	24
Şekil 3.9	Folch Metodu ile Elde Edilen Lipit Fraksiyonu	24
Şekil 3.10	Yağ Asitlerinin Potasyum Tuzlarından HCl ile Elde Edilmesi: pH Değerinin Değişimi	25
Şekil 3.11	Serbest Yağ Asidi ve Boron-Triflorür Reaktifi Arasında Gerçekleşen Tepkime	25
Şekil 3.12	Serbest Radikal DPPH• ve Antioksidan Arasındaki Tepkime.....	27

Şekil 3.13	Flavonoit ve AlCl ₃ Reaktifi Arasında Gerçekleşen Tepkime	30
Şekil 3.14	İTK-Otografide Kullanılan Renk Reaksiyonu	32
Şekil 3.15	Ellman Metodunda Gerçekleşen Renk Reaksiyonu	33
Şekil 4.1	<i>Fagopyrum esculentum</i> Uçucu Yağı	35
Şekil 4.2	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidi Yaprığı Uçucu Yağ Kromatografik Profili	38
Şekil 4.3	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidi Çiçeği Uçucu Yağ Kromatografik Profili	38
Şekil 4.4	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidi Sapının Uçucu Yağ Kromatografik Profili	38
Şekil 4.5	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidi Yaprak Uçucu Yağ Kromatografik Profili	39
Şekil 4.6	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidi Çiçeği Uçucu Yağ Kromatografik Profil	39
Şekil 4.7	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidi Sap Uçucu Yağ Kromatografik Profili	39
Şekil 4.8	MSD-SPME Düzenegi.....	40
Şekil 4.9	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidi Tohumu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)	42
Şekil 4.10	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidi Kavuzu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)	42
Şekil 4.11	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidi Tohumu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)	42
Şekil 4.12	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidi Kavuzu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)	43
Şekil 4.13	Güneş Çeşidinin Tarladaki Uçucu Bileşen Kromatogramı	44

Şekil 4.14	Sumçanka Çeşidinin Tarladaki Uçucu Bileşen Kromatogramı	44
Şekil 4.15	Çeşitlerin Yaprak ve Çiçeklerinin LC-MS Kromatogramları	45
Şekil 4.16	Standart Bileşiklerin LC-MS'te Elde Edilen Kütle Spektrumları	46
Şekil 4.17	Güneş Çeşidi Çiçekte Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı ...	49
Şekil 4.18	Güneş Çeşidi Tohumda Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı	49
Şekil 4.19	Güneş Çeşidi Kavuzda Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı	49
Şekil 4.20	Sumçanka Çeşidi Yaprak Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı	50
Şekil 4.21	Sumçanka Çeşidi Sap Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı ...	50
Şekil 4.22	Sumçanka Çeşidi Tohum Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı	50
Şekil 4.23	<i>F. esculentum</i> Uçucu Yağ ve Ekstrelerin DPPH Serbest Radikal Süpürme Etkisi	51
Şekil 4.24	Trolox Kalibrasyon Eğrisi	52
Şekil 4.25	<i>F. esculentum</i> Çiçek ve Yaprak Ekstrelerinde Toplam Fenol Miktarlarının Karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.26	<i>F. esculentum</i> Çiçek ve Yaprak Ekstrelerinde Toplam Flavanoit Miktarlarının Karşılaştırılması	54
Şekil 4.27	<i>F. esculentum</i> Uçucu Yağ ve Ekstreleri İçin İTK-Otografi Uygulama Sonuçları.....	55
Şekil 4.28	<i>F. esculentum</i> Bitkisinin Uçucu Yağ ve Ekstrelerin Etkisi ile AChE İnhibisyonu.....	55
Şekil 5.1	Güneş ve Sumçanka Çeşitlerine Ait DPPH Radikalini Süpürme Etkisinin Birbirleriyle ve Gallik Asitle Karşılaştırmalı Gösterimi.....	60

Şekil 5.2	<i>F. esculentum</i> Ekstrelerinin IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanmasında Kullanılan Grafikler.....	61
Şekil 5.3	Rutin Kalibrasyon Eğrisi.....	62
Şekil 5.4	Ekstrelerin İçerdiği Rutin Miktarlarının Karşılaştırılması.....	62
Şekil 5.5	<i>F. esculentum</i> Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Ellman Metodunda AChE İnhibisyonlarının Karşılaştırılması.....	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.1	Karabuğday Yetiştiriciliği Yapan İlk On Ülkeye Ait Veriler	2
Çizelge 2.1	<i>F. esculentum</i> Fitokimyasal Bilgileri	7
Çizelge 2.2	<i>Fagopyrum esculentum</i> Türünün Biyolojik Aktivite Çalışmaları	12
Çizelge 4.1	<i>F. esculentum</i> Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Yaprak, Çiçek ve Sap Kısımlarının Uçucu Yağ Verimleri	35
Çizelge 4.2	<i>Fagopyrum esculentum</i> Türünün Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Farklı Kısımlarına Ait Uçucu Yağlarının Kimyasal Kompozisyonu	36
Çizelge 4.3	Güneş Çeşidinin Tohumlarından MSD-SPME Yöntemi ile Elde Edilen Uçucu Bileşen Kompozisyonu	40
Çizelge 4.4	HS-SPME Metoduna göre Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Kimyasal Kompozisyonu	40
Çizelge 4.5	Çeşitlerin Yaprak ve Çiçek Ekstrelerinin Sıvı Kromatografik Verilere Göre Ana Maddeleri	45
Çizelge 4.6	Çeşitlerin Yaprak ve Çiçeklerinde Rutin Miktarları	46
Çizelge 4.7	<i>F. esculentum</i> Güneş Çeşidine Ait Sabit Yağ Kompozisyonu	47
Çizelge 4.8	<i>F. esculentum</i> Sumçanka Çeşidine Ait Sabit Yağ Kompozisyonu	48
Çizelge 4.9	<i>F. esculentum</i> Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Serbest Radikal Süpürme Etkileri	51
Çizelge 4.10	<i>F. esculentum</i> Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin İndirgeme Kapasitesi	52

Çizelge 4.11	<i>F. esculentum</i> Ekstrelerinin Toplam Fenol Miktarı	53
Çizelge 4.12	<i>F. esculentum</i> Ekstrelerinin Toplam Flavonoit Miktarı	54
Çizelge 4.13	<i>F. esculentum</i> Çeşitlerine Ait Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin AChE İnhibisyonunun Ellman Metoduna Göre Kantitatif Sonuçları	56

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer Hastalığı
ATCI	: Asetiltiyokolin iyodur
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BSA	: Bovin Serum Albumin
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikril hidrazil radikali
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit)
EDQM	: İlaç Kalitesi Avrupa Müdürlüğü
FCR	: Folin-Ciocalteu Reaktifi
FRAP	: Demir Redükleme Antioksidan Potansiyeli
g	: Gram
GAE	: Gallik Asit'e Eşdeğer Miktar
GC-FID	: Gaz Kromatografisi - Alev İyonlaşma Detektörü
GC/MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HS-SPME	: Tepe Boşluğu - Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
LC-MS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrumu
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon gösteren konsantrasyon
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
%İnh	: Yüzde İnhibisyon
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
uL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
MSD-SPME	: Mikro Buhar Distiasyonu – Katı Faz Mikro Ekstraksiyonu
nm	: Nanometre
RE	: Rutin'e Eşdeğer Miktar
RTI	: Relatif Tutunma İndisi
TCA	: Trikloroasetik Asit
TEAC, TEAK	: Trolox'a Eşdeğer Antioksidan Kapasite
U	: Ünite

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sentetik ilaçların insan vücudunda bırakmış olduğu yan etkiler ve vücutta meydana gelen birikimi göz önünde bulundurularak Dünya çapında bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyolojik, doğal kaynaklı etken maddelere ilgi duyulmaya başlanmıştır [1]. Günümüzde diyetle birlikte alınan bitkilerin içerdiği sekonder metabolitlerin de sağlığımızı etkilediği artık bilinmektedir. Hem insan vücuduna faydalı etken maddeleri içeren, hem de gıda olarak kullanılabilen bitkilerin arasında mısır [2], soya fasulyesi [3], yeşil çay [4], üzüm, karadut [5] ve nar [6] gibi bitkiler örnek teşkil etmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucunda karabuğday da bu listede yer almaya hak kazanmıştır [7].

Fagopyrum esculentum Moench. türü 18'inci yüzyıldan beri kültüre alınan bir bitki olmasına rağmen zamanla beslenme alışkanlıklarının, yerini patates ve pirince bırakmasıyla ünü azalmıştır [8]. O dönemde kültüre alınan türler arasında, karabuğdayın bir Kuzukulağıgiller (Polygonaceae) familyası üyesi olarak insan beslenmesinde büyük ölçüde yer aldığı görülür [9]. Bir tahıl gibi gıda olarak kullanılmasına rağmen tahıl familyasına (Poaceae/ Gramineae) ait değildir [10]. Tahıl grupları tek çenekli bir yapıya sahipken, karabuğday çift çenekli bir bitkidir [11].

F. esculentum genellikle Japonya, Kore, Çin'in kuzey ve merkezi bölgeleri gibi Asya ülkelerinde daha fazla yetiştirilirken, Avrupa, ABD, Kanada, Brezilya, Güney Afrika ve Avusturalya gibi geniş bir coğrafyada da tarımı yapılmaktadır [12].

Türkiye'de ise 2014 yılında Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde yapılan kültüre alma çalışmalarıyla "Güneş" çeşidi ıslah edilmiştir. Bu çeşit, çok fazla sulama gerektirmeyen, diğer bitkilere göre soğuğa nispeten toleranslı olsa da donmaya karşı hassas ve her türlü toprakta kolayca yetişebilecek özelliklere sahiptir [13]. Birçok ülkede karabuğday temel besin listesinde yer almaktadır. FAO (Food and Agriculture Organization, Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre karabuğdayın tarımı başta Rusya olmak üzere pek çok ülkede yapılmaktadır [14]. En fazla ekimi yapılan ilk 10 ülkenin listesi Çizelge 1.1'de verilmiştir. Orijinini Güney Çin'in dağlık

kesimlerinden alan bu cins dünyanın çeşitli bölgelerinde de yetiştirilmekte ve gıda olarak tüketilmektedir [15].

Çizelge 1.1. *Karabuğday yetiştiriciliği yapan ilk on ülkeye ait veriler*

No	Ülke	Ekim alanı (ha)	Verim (ton)
1	Rusya	712,047	700,000
2	Çin Halk Cumhuriyeti	708,000	661,764
3	Ukrayna	136,700	167,440
4	Fransa	30,100	111,300
5	Polonya	62,710	83,499
6	ABD	78,000	83,000
7	Brezilya	49,000	64,000
8	Kazakistan	64,600	46,500
9	Litvanya	37,400	35,600
10	Japan	59,900	31,100

Glutensiz bir gıda kaynağı olması, son zamanlarda karabuğdayı gündeme taşımıştır. Gluten bir proteindir ve gliadin adlı alt bir fraksiyonu, çölyak hastalığına sebep olmaktadır. Bu hastalıkta ince bağırsak glutene karşı ömür boyu hassasiyet göstermekte, villusların tahribi sonucu vitamin ve minerallerin emilimi sağlanamamaktadır. Tek tedavisi glutensiz beslenmedir. Bu sebeple karabuğday danesi ve unundan yapılmış gıdalar Çölyak hastalığı tanısı konmuş kişiler için vazgeçilmez bir beslenme kaynağıdır. Türkiye’de Çölyak hastalarının sayısı yaklaşık 700.000 kişidir [16, 17].

Şeker hastalığı (diyabet) da dünyanın bütün bölgelerinde yanlış beslenme alışkanlığının yaygınlaşması sonucu hızla artış gösteren ve insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturan hastalıklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Diyabet ve ona ait komplikasyonların kontrol ve tedavisinin çoğunlukla kimyasal ya da biyokimyasal ajanlara bağlı olduğu belirtilmektedir [18]. İnsüline bağlı olmayan diyabet hastalığının tedavisinde önem arz eden fagopiritoller grubu sebebiyle, diyetle kullanılan bazı buğday unlarının karabuğday unu ile değiştirilmesi önem taşımaktadır [19].

Çalışmanın amacı, Türkiye'nin tescilli Güneş çeşidi ile Kazakistan'ın tescilli Sumçanka çeşidini Eskişehir şartlarında yetiştirilip, içerdiği sabit yağ ve uçucu bileşenlerinin kompozisyonunun incelenmesi ve uçucu bileşenlerinin antioksidan ve antikolinesteraz etkilerinin araştırılmasıdır. Bundan yola çıkarak,

- Eskişehir Çamlıca köyü bölgesinde Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin yetiştirilmesi,
- Bu iki çeşide ait bitkilerin çiçek açma aşamasında tarladayken tepe boşluğu katı faz mikro ekstraksiyon (HS-SPME) tekniği ile uçucu bileşenlerinin araştırılması,
- Hasat edilmiş bitkilerin uçucu bileşenlerinin mikro buhar distilasyon-katı faz mikroekstraksiyon (MSD-SPME) tekniği ile araştırılması,
- Hasat edilmiş bitkilerin uçucu bileşenlerinin konvansiyonel hidrodistilasyon tekniği ile araştırılması,
- Her iki çeşidin değişik organlarının içerdiği sabit yağ profilinin araştırılması,
- Her iki çeşidin değişik organlarından elde edilen uçucu yağların antioksidan etkilerinin araştırılması,
- Her iki çeşidin değişik organlarından elde edilen uçucu yağların antikolinesteraz etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmada çeşitlerin farklı kısımları araştırma kapsamına alınmıştır. Bu çalışma Güneş çeşidinin uçucu ve sabit yağları üzerinde yapılmış ilk fitokimyasal çalışma niteliğini taşımaktadır. Araştırma kapsamında, ana ürün olan tohumun dışında yaprak, çiçek, sap ve kavuz gibi atık materyal olarak görülen kısımların da katma değer sağlayabilecek niteliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Polygonaceae familyası

Günümüzde yaklaşık 1000 kadar türü içeren ağırlıklı olarak ılıman iklimde yetişen bir familyadır [20]. Polygonaceae familyası tıbbi olarak kullanılan ravent (*Rheum officinale* Baill., *R. coreanum* Nakai ve *R. palmatum* L.) ve boya maddesi olarak kullanılan Japon çivit otu (*Polygonum tinctorum* Ait.) gibi pek çok faydalı bitkiyi içermektedir [21]. Polygonaceae, 49 cins ve yaklaşık 1200 tür içeren, kozmopolit bir dağılıma sahip, ağırlıklı olarak otsu bitkilerden oluşan bir familyadır. Familyanın önemli bir bölümü ılıman Kuzey Amerika, Avrupa ve Güneydoğu Asya'da iken az bir kısmı da Güney Amerika, Karayipler, Afrika ve Avustralya'da temsil edilir. Tropikal bölgelerdeki üyeleri de çoğunlukla odunsu çalılar, ağaçlar veya sarmaşıklardan oluşur [22].

Türkiye'de 8 cins ve 70 türle temsil edilen Polygonaceae familyasının endemizm oranı Türkiye için %18.9'dur [23, 24].

Polygonaceae bitkileri, bir veya iki evcikli otsular, çalılar, tırmanıcılar, nadiren ağaçlardan oluşmaktadır. Bazı türleri süs bitkisi, bazı türleri ise sebze olarak kullanılmaktadır [24].

Polygonaceae genellikle "okrea" denilen yapılarla diğer familyalardan ayırt edilmektedir [25]. Polygonaceae çiçekleri, birleşmiş beş veya altı çanak yaprağa sahiptir. Stamenler genellikle sekiz ya da dokuz tane olup, meyve merceksi veya üç köşeli aken (Şekil 2.1) şeklindedir ve endosperm mevcuttur. Düz ya da eğri olabilen embriyonun kökçüğü tohumun merkezden uzak ucunda bağlanmıştır [26].



Şekil 2.1. Karabuğday Meyvesi

2.1.2. *Fagopyrum* cinsi

Karabuğday bitkisi “*cymosum*” ve “*urophyllum*” adlı iki gruptan oluşan *Fagopyrum* cinsine (Polygonaceae familyası) aittir [27]. Çin ve Orta Asya kökenli tek yıllık otsu bir bitkidir ve yaklaşık 19 türden oluşur. Küçük, rüzgarla tozlaşan karabuğday çiçekleri, kümeler halinde taşınır. Genellikle çiçek iki eşeyli olup, 3 ila 5 adet sepal ve tepal, 6-9 stamen ve tek bir pistil olmak üzere değişken sayıda parçalardan oluşur. Birleşmiş karpellerin oluşturduğu üst durumlu ovaryum, daha sonra aken tipi meyveyi verecek olan tek bir ovül ile bir çember (lokül) oluşturur [28].

2.1.3. *Fagopyrum esculentum* Moench türü

Bitkinin herbası tek yıllık, sap kısmı yeşil veya kırmızı (olgun haldeyken), dik ve 30-90 cm uzunluğundadır. Meyvesi, içinde tek bir tohum barındıran, koyu kahverengi veya siyah renkteki sert bir kavuzla kaplı akendir [29].

Bazı araştırmalar [30, 31] kültüre alınan karabuğdayın güney-batı Çin kaynaklı olduğunu ileri sürmüşlerdir, ancak bu konuda anlaşmazlıklar yaşanmış ve ortaya 3 adet hipotez çıkmıştır.

Bunlardan ilki iki yıllık *F. cymosum*'un kültüre alınmış karabuğdayın atası olduğunu ve *F. cymosum*'un taksonomik olarak *F. esculentum* ve *F. tataricum*'la çok yakın akraba olduğunu savunur [32]. Bu hipotez morfolojik bulgularla da desteklenmektedir.

İkinci hipoteze göre; *F. cymosum* ve *F. esculentum*'daki heterostili ve gelişmiş nektar salgı bezi yapısı avantajlı karakterlerdir. Bu sebeple evrim sürecinde şu an nesli tükenmiş olan, bu iki türün kökeni olabilecek homostil ilkel bir türden doğal seçilim yoluyla seçilerek günümüze gelmiş olabilir [31].

Üçüncü hipoteze göre de *F. cymosum*, *F. esculentum* ve *F. tataricum*, kültüre alınmış karabuğdayın atası olamayacak kadar uzak akrabadırlar. Bununla birlikte *F. esculentum*'un yabani formunun bahsedilen ilkel ata olabileceği [30] teorisi mevcuttur. Karabuğdayın ilkel formu ve kültüre alınmış formu arasında büyük bir yakınlık vardır fakat kültüre alınmış günümüz karabuğdayınının daha ilkel, bir başka yabani atası olma ihtimali de vardır.

F. esculentum, nemli, serin iklimi seven tek yıllık bir bitkidir. Orta Asya kökenli bir bitki olup, Çin ve diğer Doğu ülkelerinde ekmeklik un yapımında kullanılmak üzere kültüre alınmıştır. İyi toprakta diğer tahıl ürünlerine göre daha az verimlidir fakat çok zayıf ve kötü sürülmüş topraklara bile adapte olabilme yeteneğine sahiptir. Tohumdan çiçeklenme evresine geçişi sadece 4-5 hafta alır ve bu özelliğiyle en hızlı gelişen yeşil gübre bitkilerinden biridir. Yabancı otları baskılamak için kullanıldığı gibi toprağın bağlanmasına yardımcı olarak erozyonu engeller [33].

İyi bir yeşil gübre bitkisidir ve toprak dokusunu geliştirir. Karabuğday ayrıca kök bölgesindeki fosfor ve mikrobesein kullanılabilirliğini artırarak toprağa ekilecek bir sonraki ürün için de toprağı hazırlar. Çabuk olgunlaşan bir bitki olduğu için geç sezon bitkisi olarak yetiştirilebilir [34].

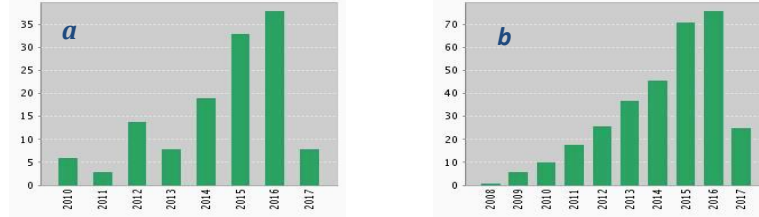
2.2. Kimyasal Bilgiler

F. esculentum bitkisi içerdiği bitkisel lif, B₁, B₂, B₆ ve E vitaminleri ile besin değeri yüksek bir psödotahıldır. Karabuğdaydaki proteinlerin profili zengin ve dengeli aminoasitlerden oluşmaktadır. Diğer bitkisel kaynaklı aminoasitler içinde sınırlı olan lizin ve arginin aminoasitleri bakımından zengindir. Mineral profili bakımından da zengin bir içeriğe sahip olan karabuğdayda insan metabolizmasında önemli işlevlere sahip olan fosfor, demir, çinko, potasyum, selenyum ve magnezyum bulunmaktadır [35]. İçeriğindeki fitokimyasallar (rutin ve kersetin) ile de önemli bir besin kaynağıdır. Antienflamatuar, antikarsinojenik etkileri yanında kan damarlarına etki ederek hemorajik sorunları ve ödem oluşumunu engellediği ve yüksek kan basıncını düşürdüğü rapor edilmiştir [36].

Tohum kılıfı, karabuğday ununun rengini koyulaştıran yeşil ya da bronz renktedir. Tohum unlu bir endosperm içerir. Ham protein içeriği %18'dir ve bu proteinlerin biyolojik değeri %90'ın üzerindedir [37]. Başta lizin, treonin, triptofan ve sülfür içeren aminoasitler olmak üzere tüm temel aminoasitleri yüksek konsantrasyonda içerir [38]. Demir (60-100 ppm) ve çinko (20-30 ppm) bakımından zengindir [39]. Bitki ayrıca rutin (10-200 ppm) ve tanen (%0.1-2)

gibi antioksidan etkili fenolik bileşikleri içerir [19]. Genç yapraklar sebze olarak yenir ve sapsarı sığır beslemek için kullanılır.

Web of Science veritabanına göre, Dünya’da *F. esculentum* üzerinde yapılmış fitokimyasal ve biyolojik aktivite araştırmalarının sayısı belirgin artış göstermiştir [40, 41] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Son 10 yıl içerisinde *F. esculentum* ile ilgili Yapılmış Fitokimyasal (a) ve Biyolojik Aktivite (b) Araştırmalarının Sayısı

Dünya’da ve ülkemizde *F. esculentum* türü üzerine birçok kimyasal aydınlatma çalışması rapor edilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmı bitkinin çeşidi, çalışılan kısmı, yetiştirildiği ülke ve içerdiği madde grubu dikkate alınarak Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. *F. esculentum* Fitokimyasal Bilgileri

Varyete/ Çeşit	Çalışılan Bitki Kısmı	Ana Bileşikler (%)	Toplama Yeri (Ülke)	K
-	Üst çiçekler	UB: <i>cis</i> -3- Hekzenil asetat	Saksı bitkisi	[42]
-	Tohum	UB: Salisil aldehit, fenilasetaldehit, decadienal, nonenal, dimetilhidroksifuranon	Slovenya	[43]
Dawon	Filiz	AA: dl-Alanil-l-lösin (%9,92)	Kore	[15]
		UB: 1-Hekzadekanol (%9,83), fitol (%6,85)		
Sewon		AA: (2-Aziridiniletil) amin (%35,8), dl-alanil-l-lösin		
Yangjeol		UB: 1-Hekzadekanol (%10,8)		
Yangjeol 2		AA: (2-Aziridiniletil) amin (28,5), dl-alanil-l-lösin (12)		
	UB: Fitol (16), 1-hekzadekanol (9,1)			

Çizelge 2.1. (Devam) *F. esculentum* Fitokimyasal Bilgileri

Varyete/ Çeşit	Çalışılan Bitki Kısım	Ana Bileşikler (%)	Toplama Yeri (Ülke)	K
Kitawase	Filiz	UB: Fitol (15), 1- hegzadekanol (11)	Japonya	[15]
Commercial Asia		AA: <i>dl</i> -Alanil-l-lösin (13)	Seul, Kore	
		S: Etiliso-alloşolat (13)		
		UB: Fitol (11),1- hegzadekanol (19)		
Pyra	Kök, Sap ve Yapraklar	UB: Öjenol, koniferil alkol, 3,4,5-trimetoksifenol	Çek Cumhuriyeti	[44]
-	Un	SYA: Palmitik asit, stearik asit, oleik asit, Linoleik asit	Leskofça	[45]
Güneş	Tohum, Sap ve Herba	SYA: Oleik asit, linoleik asit, palmitik asit	Konya, Türkiye	[46]
Lileija	Çiçek, Yaprak, Sap ve Tohum	F: Rutin	Winterthur , İsviçre	[47]
Siva	Tohum	AA: Glutamik asit (17,65), arginin (8,55), aspartik asit (8,22)	Kuzey Ljubljana	[37]
Bednja 4n		AA: Glutamik asit (17,77), arginin (9,00), aspartik asit (8,50),	Slovenya/ Hırvatistan	
-	Tohum	UB: Oktanal, (<i>E,E</i>)-2,4-heptadienal, (<i>E</i>)-2- desenal, (<i>E,E</i>)-2,4-dekadial	-	[48]
	Kavuz	UB: (<i>E</i>)-2-hekzenal, heptanal, (<i>E,E</i>)-2,4- hegzadienal, fenilasetaldehit α -bisabolol		
-	Un	F: Kateşin (0.23), epikateşin (0.86), epikateşin gallat (0.52), rutin (0.68)	Nagano, Japonya	[49]
-	Un	P: Globulin	Japonya	[50]
-	Un ve Kepek	SYA: Linoleik asit (39), oleik asit (37), palmitik asit (15.6) AA: Glutamin, arjinin, asparajin, lizin V: Tiamin (B1), riboflavin (B2), piridoksin (B6)	Dolenjska Slovenya	[38]
Pyra Emka ve Krupinka	Tohum	F: Skualen, α -tokoferol, epikateşin, rutin	Prag, Çek Cumh.	[51]
-	Kavuz, Kepek, Un, Yaprak	D: D-fagomin ve onun diastereomeri olan 3,4- di-epi-fagomin	İspanya	[52]
Koto	Un	F: Rutin (0.017)	Kanada	[53]
Mancan		F: Rutin (0.025)		
Manizoba		F: Rutin (0.018)		
Koban		F: Rutin (0.020)		
Siva	Un	F: Rutin (0.006)	Ljubljana, Slovenya	[54]
Hruszowska	Kavuz	F: Rutin, orientin, viteksin, kersetin, isoviteksin ve isoorientin	Palikije, Polonya	[55]
	Tohum	F: Rutin, isoviteksin		

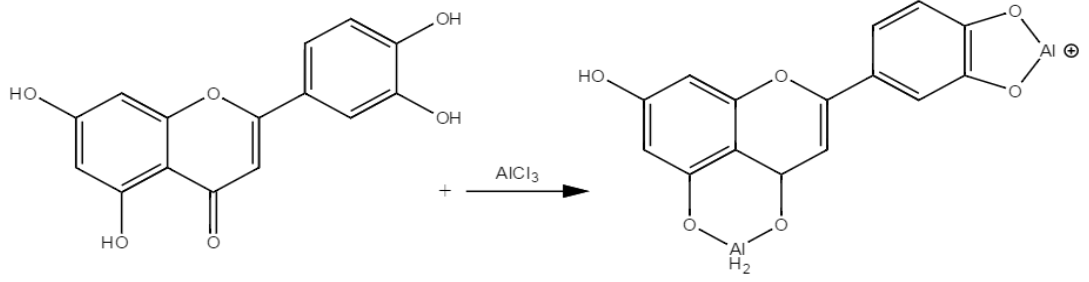
Çizelge 2.1. (Devam) *F. esculentum* Fitokimyasal Bilgileri

Varyete/ Çeşit	Çalışılan Bitki Kısmı	Ana Bileşikler (%)	Toplama Yeri (Ülke)	K
Iwate zairai	Kavuz	D: Aromadendrin-3-O-D-galaktosid ve taksifolin-3-O-D-ksilosid	Japonya	[56]
	Filiz	F: (-)-Epikateşin , (-)-epikateşin-3-O-p-hidroksibenzoat, (-)-epikateşin-3-O-(3,4-di-O-metil)-gallat, (+)-kateşin-7-O-glukosid		[21]
Manor	Kepek	V: Fagopiritol A1 ve B1, B2 ve B3 (D-şiro-inositol türevi)	Hollanda	[57]
		V: Fagopiritol A2, A3, B2 ve B3 (D-şiro-inositol türevi)		[58]
-	Tohum	UB: Olean-12-en-3-ol ve urs-12-an-3-ol, SYA: 6-hidroksistigmasta-4,22-dien-3-on, 23S-metilkolesterol, stigmast-5-en-3-ol, stigmast-5,24-dien-3-ol ve <i>trans</i> -stigmast-5,22-dien-3-ol S: 6-Hidroksistigmasta-4,22-dien-3-on, 23S-Metilkolesterol, stigmast-5-en-3-ol, stigmast-5,24-dien-3-ol ve <i>trans</i> -stigmast-5,22-dien-3-ol	Çin	[59]
-	Tohum	UB: 2,5-Dimetil-4-hidroksi-3(2H)-furanon, (E, E)-2,4-dekadienal, fenilasetaldehit, 2-metoksi-4-vinilfenol, (E)-2-nonenal, decanal, heksanal ve salisilaldehit	Slovenya	[43]
-	Bal	UB: 3-Metilbütanal, 3-hidroksi-4,5-dimetil-2(5H)-furanon, (<i>E</i>)- β -damassenon ve 3-metilbütanal	İngiltere	[60]
-	Kavuz	SYA: 6,7-Dihidroksi-3,7-dimetil-okta-2(Z),4(E)-dienoik asit, 6,7-dihidroksi-3,7-dimetil-okta-2(E), 4(E)-dienoik asit, 4,7-dihidroksi-3,7-dimetil-okta-2(E),5(E)-dienoik asit	Kore	[61]

AA: Aminoasit; **F:** Fenolik Bileşik; **S:** Steroid; **SYA:** Sabit Yağ Asidi; **UB:** Uçucu Bileşik, **V:** Vitamin **D:** Diğer

Karabuğdayla ilgili, Avrupa farmakopesi ve İngiliz farmakopesinde monograflar mevcuttur [62-64]. Drog olarak herba ve çiçekleri kullanılmaktadır. Kalite analizi için drogtan hazırlanmış tentür (veya alkollü ekstre) üzerinde ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulanır.

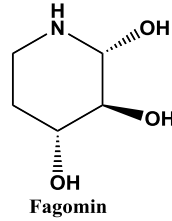
Miktar tayini olarak toplam flavonoit miktar tayini yapılır ve sonuçlar rutin ekivalanı olarak hesaplanır. Bu yöntemde flavonoitlerin aliminyum klorür (AlCl₃) ile oluşturduğu kompleksin (sarı renkli) absorbanısı spektrofotometrik olarak ölçülür. Oluşan kompleks Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Rutin'in $AlCl_3$ ile Oluşturduğu Kompleks

D-Fagomin, bir gıda takviyesi veya fonksiyonel gıda bileşeni olarak kullanıldığında insülin direnci geliştirme, aşırı kilo alma ve potansiyel olarak patojenik bakterilere karşı dirençsizlik risklerini azaltabilen bir iminoşekerdir ve bu şekere ilk olarak karabuğdayda rastlanmıştır [52]. İminoşekerler, şeker halkasındaki endosiklik bir oksijen atomunun yerine bir azot atomunun geçmesiyle oluşan, biyolojik öneme sahip moleküllerdir [65].

D-Fagomin iminoşekerinin kimyasal yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. D- Fagomin'in Kimyasal Yapısı

2.3. Biyolojik Aktivite Bilgileri

2.3.1. Fagopyrum türlerinin halk arasındaki kullanımı

F. esculentum bitkisi yaygın bir halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Yapraklarının demir kaplarda kaynatılarak anemi hastalarına verildiği bildirilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış yapraklar kronik kabızlık şikayetlerinde de iyileştirici olduğu düşünülerek tüketilmiştir [66]. Toprak üstü kısımları hemorajik şikâyetlerin tedavisinde ve hipertansif hastalar için kullanılmıştır [67].

Bununla birlikte, *F. esculentum* büyük ve kabuğu kolay ayrılan bir meyvesi olması ve hoş tadı sebebiyle gıda olarak en çok tüketilen karabuğday türüdür

[68]. Genellikle Hint alt kıtasının birçok bölgesinde yapraklı bir sebze olarak yetiştirilmektedir [69]. Yaprakları ve genç sürgünleri haşlanır ve ıspanak gibi tüketilmektedir. Perispermli, gaz tesislerinde yakıt olarak kullanılabilir. Gövdesinden hazırlanan bir boya, tekstil kumaşlarında kullanılır [70]. Düşük verimli toprakların yenilenmesi için yeşil bir gübre mahsulü olarak yararlıdır çünkü bu topraklarda iyi yetişerek kısa sürede bir yeşil gübre mahsulü üretir. Yetiştirildiği toprak dokusunu gelişmeye teşvik eder ve nadas mahsulünün üretimini arttırır, aynı zamanda biyolojik mücadelede yabancı bitkilerin gelişimini engelleyici bir mahsul olarak da kullanılır [69, 71].

Farklı ülkelerde çok sayıda farklı preparatlar içinde tüketilir. Japonya'da çoğunlukla "soba" adında bir erişte olarak tüketilir [69]. Yaprak unu, bazı gıda ürünlerine (dondurma) katkı maddesi olarak Japonya'da kullanılır [72]. Rusya ve Polonya'da kabuksuz yemişleri ve unu, püre ve çorba yapmak için kullanılırken, İsveç'te çoğunlukla balığın yanında tüketildiği, Çin'de ise karabuğdayın sirke üretimi için kullanıldığı bildirilmiştir. Güneydoğu Asya'da karabuğday, birçok engebeli alanda vazgeçilmez bir besin haline gelmiştir. Avrupa ve Kuzey Amerika'da karabuğday unu genellikle krep, bisküvi, erişte hazırlamak için buğday unu ile karıştırılır ve bir et dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır [69].

Doğu Avrupa'da "kasha" adında bir çeşit karabuğday pilavı hazırlanmaktadır. Kabuksuz meyveleri Amerika Birleşik Devletlerde kahvaltılık mısır gevreği olarak tüketilmektedir [73]. Karabuğday çiçeklerinden hazırlanan çay, en yüksek rutin içeriğini göstermiştir [74]. Karabuğdayda nektar genellikle bolca üretilerek ya çiçek tabanı, salgı bezleri ya da papilla yoluyla dışarı verilmekte ya da dişi organdan salgılanmaktadır [26, 75]. Bu sebeple Polygonaceae'nin pek çok türü bal üretimi için değerlendirilmektedir [76, 77].

2.3.2. *Fagopyrum* türleri üzerine yapılan biyolojik aktivite araştırmaları

Fagopyrum türlerine ait yapılmış çalışmalardaki biyolojik aktiviteler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. *Fagopyrum esculentum* Türünün Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Tür	Ekstre tipi	Kullanılan kısmı	Aktivite	Kaynak
FE	Distile Su	Tohum	Hipokolesterolemik, Antitümör, Antiobez ve Kabızlık giderici	[78]
FE	%30 Etanol	Herba	Antioksidan, Fotoprotektif	[79]
FE	%50 Etanol	Tohum	Antidiyabetik	[80]
FE	%80 Etanol	Kök, Sap, Yaprak, Herba	Antioksidan	[81]
FE, FT	Metanol	Un	Antigenotoksik	[82]
FE	%100 Soğuk Metanol	Un	Anti-alerjik	[83]
FE	%90 Metanol	Çiçek, Sap Yaprak ve Kök	Antioksidan	[84]
FT	<i>n</i> -Hekzan	Un	Anti-tümör	[85]
FT	%70 Etanol	Un	Antifatik	[86]
FE	Etil Asetat ve Etanol	Tohum, Sap ve Herba	Nöroprotektif, Antitirozinaz ve Antioksidan, Radikal süpürücü	[46]
FE, FT ve FH	%80 Metanol	Tohum	Antioksidan, Antikolesterol, Antihipertansif, Antihemorajik	[53]
FE, FT	Su ve Sodyum Lauril Sülfat (SDS)	Un, Yaprak, Çiçek, Tohum, Sap, Filizler, Makarnası	Antihipertansif	[87]
FE	Su	Tohum	Antikanser	[88]
FE	Etil asetat, Bütanol	Filiz	Antikanser	[89]
FE	Aseton, Bütanol, 96% Etanol, Etil asetat, Metanol	Un	Antioksidan	[90]
FE	%70 Etanol	Filizler	Antienflamatuar, Antikanser	[91]
FE	%70 Etanol	Filizler	Hepatoprotektif	[92]

FE: *F. esculentum*, FH: *F. homotropicum*, FT: *F. tataricum*

İnsülin bağımlı olmayan (Tip II) diyabet semptomlarının azaltılmasında D-şiro-inositol ile diyet uygulanması etkili olmaktadır [93]. Karabuğday D-şiro-inositolü doğal olarak üretmektedir. Karabuğday ununun ya da karabuğday unuyla yapılmış yiyeceklerin gıda olarak tüketilmesinin, kan ve idrar şekerini düşürerek hipoglisemik etki oluşturduğu belirtilmiştir [94, 95].

Tahıl içeren besinlerden kaynaklanan bir hastalık olan çölyak hastalığının tedavisinde glutensiz gıdalar hayati bir önem taşımaktadır. Hastalığın klasik semptomları yetersiz büyüme, kilo kaybı, malnütrisyon, diyare, steatore (yağın sindirimi ve emiliminde bozukluk) ve bireye özgü olarak gelişebilen davranış

bozuklukları, anemi ve soğuk algınlığı gibi diğer belirtilerdir [96]. Hastalığın asıl sebebi; bir protein olan gluteni meydana getiren amino asit gruplarından biri olan “gliadin”i, kişinin ince bağırsaklarındaki villusların yabancı madde olarak görerek bir çeşit alerji meydana getirmesidir. Glutenli yiyecekler tüketildiğinde bağırsak mukozasında meydana gelen bu alerjik reaksiyon villusların tahrip olmasına ve azalıp küçülmesine sebep olmaktadır. Böylece bağırsak yüzölçümü gittikçe azalmakta ve alınan gıdalar emilemez hale gelmektedir. Beslenme yetersizliği sonucunda hastalık belirtileri ortaya çıkmaktadır. 2014 yılı itibariyle bilinen tek tedavi yöntemi glutensiz diyetdir. Bu konuda da karabuğday ve ondan imal edilen ürünler büyük önem taşımaktadır [16, 17].

Karabuğday ayrıca tarımsal alanda da önemli bir bitkidir. Allelopatik etkileri sayesinde tarlalarda ayırık otu (*Agropyron repens* L.)'nun gelişimini baskılar [97]. Karabuğdayda bulunan allelopatik yönden aktivite gösteren muhtemel bileşikler arasında palmitik, stearik, araşidik ve behenik asitler [98] ile fagomin, 4-piperidon, 2-piperidin metanol [99], ferulik, kafeik, klorojenik ve gallik asit, kateşin [99, 100], rutin [97, 101] ve kaprolaktam [102] olduğu belirtilmiştir.

2.3.2.1. Antioksidan aktivite araştırmalarının önemi

İnsan vücudu, serbest radikallerin ve diğer oksidanların zararlı etkilerine karşı koruyan, doğal enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Serbest radikallerin kanser [103], kardiyovasküler hastalıklar [104], sinirsel bozukluklar [105], Alzheimer hastalığı [106], hafif kognitif bozukluklar [107], Parkinson hastalığı [108], yaşlanma [109] ve ateroskleroz [110] gibi çok sayıda hastalığa neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir.

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipit, protein, karbonhidrat ve nükleik asitler iç ve dış etkenler sebebi ile oksidasyona uğrayabilir. Meydana gelen oksidasyon sonucunda canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünlerinin oluşmasına “oksidatif stres” denilmektedir. Oksidatif stresin sebebinin reaktif oksijen ve azot türleri olduğu bilinmektedir [111].

Oksidatif stres altında, vücudumuz enzimatik antioksidanlardan (süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi) ve enzimatik olmayan antioksidanlardan (askorbik asit (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E gibi) daha fazla reaktif oksijen türü (ROT) (süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit vs.) üretmektedir. Bu dengesizlik, hücre hasarına ve sağlık sorunlarına yol açmaktadır [112, 113].

Bu sorunun bir çözümü doğal bitki kaynaklarında bulunan antioksidan bileşikler olabilir [114]. Her ne kadar bütilatlanmış hidroksitoluen (BHT) ve butile hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlar gıda endüstrisinde antioksidan olarak yaygın şekilde kullanılmaktaysa da bu tip sentetik antioksidanların karaciğer hasarından ve kanserojenezden sorumlu olabileceği tespit edildiği için doğal antioksidan kullanımına olan ilgi artmıştır [115, 116].

Antioksidan grubu altında kaynak, yapısal ve fonksiyonel olarak çok çeşitli bileşikler bilinmektedir. Endojenik ve ekzojenik, hayvansal ve bitkisel, serbest radikal süpürücü, zincir kırıcı, peroksitleri inaktif hale getiren, ağır metallere şelat oluşturan birçok antioksidan madde grubu bildirilmiştir. Diyet antioksidanlarının bol miktarda alınmasıyla serbest radikallere karşı koruma sağlanabilecektir. Antioksidan içeren gıdaların tüketilmesinin, hastalıkların önlenmesinde büyük önem taşıdığını gösteren araştırma sonuçları yayımlanmıştır [117].

2.3.2.2. Antikolinesteraz aktivite araştırmalarının önemi ve Alzheimer hastalığı

Alzheimer hastalığı genellikle yaşlı insanları etkileyen demansın en yaygın nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalık ilerledikçe insanlar hatırlama, iletişim kurma, açık düşünme ve her zamanki günlük faaliyetleri yapma olanağını kaybetmektedirler. Davranışları veya kişilikleri de değişebilmektedir. Şiddetli Alzheimer hastalığında, hastalar kendi bakımlarını yapma olanağını kaybedebilmekte ve tam zamanlı bakım desteği gerektirmektedirler. Belirtiler, kolinerjik nöron adı verilen beynin sinir hücrelerinin kaybedilmesinden kaynaklanmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri, sinaptik yarıklara salınan

asetilkolinin parçalanmasını geciktirerek ve kolinerjik sinir iletimini artırmaktadır. Rivastigmin, galantamin ve donepezil dahil olmak üzere birçok başka asetilkolinesteraz inhibitörü etki alanlarının daha geniş ve yan etkilerin görülme sıklığının az olması açısından Alzheimer tedavisinde önem arz etmektedir [118].

Asetilkolin, bilişsel işlev ve akıl yürütmede anahtar rol oynayan bir nörotransmitterdir. Hafif ve orta düzeyde seyreden Alzheimer hastalarındaki asetilkolin konsantrasyonlarında anormal düşüş gözlenmiştir. Bu durum, beyindeki kolinerjik sistemi güçlendiren herhangi bir bileşiğin Alzheimer hastalığının ve benzer nörolojik sorunların tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir [119].

Bitkiler üzerinde bir çok bilimsel çalışma yürütülmüş ve Alman papatyası (*Matricaria chamomilla*), ginseng (*Panax ginseng*), meyan kökü (*Glycyrrhiza glabra*), zerdeçal (*Curcuma longa*) ve beyaz söğüt kabuğu (*Salix alba*) gibi antiinflamatuvar etkili bitkilerin beyin dokusunda meydana gelen iltihaplanmaları azaltabileceği ortaya konmuştur [119].

Farmakolojik aktiviteleri olan bitkiler ve bunların bileşenleri merkezi sinir sisteminde (MSS) antiinflamatuvar ve antioksidan etki göstererek, kolinerjik fonksiyonun arttırılması ile birlikte bilişsel bozuklukların tedavisi için de uygun olabilir. Ayurveda ve Çin tıbbında MSS bozukluklarını tedavi etmek için sayısız bitki kullanılmış olup Alzheimer hastalığı, Parkinson ve diğer bazı hastalıklar gibi nörodejeneratif hastalıklarda bitkiler terapötik kullanım için önemli bir potansiyel göstermektedir [120].

3. ARAÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- *n*-Hekzan
- Kloroform, Merck, Almanya
- Metanol
- Dietyl Eter
- Asetonitril, Merck, Almanya
- Formik asit, Merck, Almanya
- CaCl₂
- NaOH
- HCl (%15)
- Trikloroasetik Asit (TCA) (%10), Sigma-Aldrich, USA
- Boron triflorür, Sigma, Almanya
- Difenil Pikril Hidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich, USA
- Gallik asit, Sigma-Aldrich, USA
- Na₂SO₄ (susuz)
- NaH₂PO₄
- K₃Fe(CN)₆
- FeCl₃
- Asetilkolinesteraz (*Electrophorus electricus*), Sigma-Aldrich, USA
- Naftil asetat, Sigma-Aldrich, USA
- Fast Blue B salt, Sigma-Aldrich, USA
- Tris-HCl, Sigma-Aldrich, USA
- BSA Bovin Serum Albumin
- Galantamin, Sigma-Aldrich, USA
- DTNB (Ditiyobisnitrobenzoik asit), Sigma-Aldrich, USA
- ATCl (Asetiltiyokolin iyodür), Sigma-Aldrich, USA
- MgCl₂, Sigma-Aldrich, USA
- NaCl, yerli
- Folin-Ciocalteu reaktifi, Sigma-Aldrich, USA
- Absolü Etanol, Sigma-Aldrich, Almanya
- AlCl₃, Merck, Almanya
- Asetik asit, Sigma-Aldrich, Almanya
- Na₂CO₃ (%20)
- Rutin hidrat, Sigma-Aldrich, USA

3.2. Kullanılan Cihaz ve Apareyler

- Clevenger apareyi
- Çalkalayıcı su banyosu, GFL
- ELISA mikroplak okuyucusu (Biotek Powerwave XS)
- Etüv, WTB Binder
- GC/FID Agilent 6890N (SEM A.Ş., İstanbul, Türkiye)
- GC/MS, Agilent 5975 (SEM A.Ş. İstanbul, Türkiye)
- LC-MS/MS, Shimadzu, Japan
- Hassas Terazı, Metler Toledo, NewClassic MS
- HS-SPME Düzeneği
- İTK Reaktif Püskürtücü, BioStep Desaga Technology SG e1
- İTK Uygulama Sistemi (HP-TLC) CAMAG YP
- Manyetik karıştırıcı, Heidolph MR 3001
- MSD-SPME Düzeneği
- pH Metre, WTW series, InoLab, pH720
- Rotavapor sistemi, Heidolph Instrument, Laborota 4010-Digital
- Santrifüj, Eppendorf, 5804
- Spektrofotometre, Shimadzu, UV-PharmaSpec 1700
- Ultrasonik su banyosu, Elma, S100H

3.3. Bitkisel Materyal

Çalışma konusunu oluşturan *F. esculentum* bitkisinin tescilli iki çeşidi (Güneş ve Sumçanka) Çamlıca köyü mevkiinde yetiştirildi. Güneş çeşidi tohumları Dr. Ahmet Güneş (Bahri Dağdaş Uluslararası Araştırma Enstitüsü)'ten, Sumçanka çeşidi tohumları ise Kazakistan Bitki Fizyolojisi Enstitüsü'nden (Almaty) temin edildi.

Tohumlar 12 Mayıs 2015 tarihinde, 5-6 cm'lik derinliğe ekilmiş olup, bitkinin filizlenme tarihi 23 Mayıs 2015'tir. Çiçeklenme 23 Haziran 2015'te gerçekleşmiş ve 1 Ağustos 2015'te de bitkilerin hasadı gerçekleştirildi.

Bitkinin yetiştirilme sırasında tarladaki görünümü Şekil 3.1'deki gibidir.



Şekil 3.1. *Fagopyrum esculentum*'un Tarladaki Durumu

Bitkisel materyalin hasadı bitkinin çiçeklenme ve meyvelenme dönemlerinde yapıldı (Şekil 3.2). Hasadı yapılan bitkisel materyal gölgeli, serin ve havadar bir alanda kurutuldu. Kuru bitki materyali kuru ve serin ortamda muhafaza edildi.



Şekil 3.2. *Fagopyrum esculentum*'un Çiçeklenme ve Meyvelenme Aşamalarındaki Durumu

Tohumlardan kavuz ayırım işlemi için özel düzenek kullanıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Tohumlardan Kavuzun Ayırım İşlemi*

3.4. Uçucu Yağın Elde Edilmesi

Bitkisel materyalin yaprak, çiçek ve sap kısımları ayrı ayrı Clevenger aparatına konularak (Şekil 3.4) hidrodistilasyon işlemine (3 saat) tabi tutularak uçucu yağ elde edildi [121].



Şekil 3.4. *Clevenger Aparatında Hidrodistilasyon İşlemi*

3.5. HS-SPME Tekniği

F. esculentum bitkisinin çiçeklenme döneminde (11.08.2015) çiçeklerin salgıladığı uçucu bileşenleri tespit etmek amacıyla HS-SPME (Head Space Solid Phase Microextraction/ Tepe Boşluğu Katı Faz Mikroekstraksiyon) işlemi canlı bitki üzerinde arazi şartlarında gerçekleştirildi. Bu amaçla, güneşli hava durumunda bitkinin çiçekli dalın üzerine bir fanus yerleştirilerek fanusun bir tarafına adsorban madde içeren insert takıldı. Sorbent olarak Small Activated Coconut Charcoal (20/40) kullanıldı (Sigma, SUPELCO ORBO 32SM) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Arazi Şartlarında Gerçekleştirilen HS-SPME İşlemi

HS-SPME işlemi süresi olarak 30 dak uygulandı. Süre sonunda adsorban madde fanustan çıkarılarak her iki ucu kapatıldı. Laboratuvar koşullarında adsorban maddeye tutunan uçucu bileşikler hekzan yardımı ile elüe edildi. Elde

edilen elüent azot gazı altında yoğunlaştırılarak kimyasal kompozisyonu aydınlatılmak üzere GC-FID ve GC/MS sistemine enjekte edildi (Şekil 3.6).



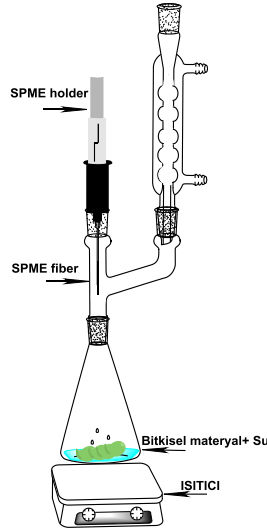
Şekil 3.6. *SPME İşlemi Sonucunda Elde Edilen Uçucu Bileşenlerin Adsorban Maddeden Elüe Edilme İşlemi*

Aynı zamanda çiçeğin salgıladığı uçucu bileşenlerin sirkülasyonu için fanusun içinde pompa ile hava akımı sağlandı (1,5 lt/saniye). HS-SPME işlemin süresi 30 dk. olarak belirlendi. Süre sonunda adsorban üzerine trap edilen uçucu bileşenler daha sonra gaz-kromatografik sistemine enjekte edilmek üzere hekzanla elüe edildi. Eluat koyu renkli vialde buzdolabında muhafaza edildi. Bu işlem her çeşit için tarlanın değişik bölgelerinde yetişmiş 3 bitki üzerinde gerçekleştirildi.

3.6. Kombine MSD-SPME-GC/MS Tekniği

Kavuz ve tohumlardaki uçucu bileşenler mikro buhar distilasyonu- katı faz mikroekstraksiyon (MSD-SPME) tekniği ile tespit edildi. Klaisen distilasyon başlığı, bu sistemde geri çeviren soğutucuya bağlı bir cam balona oturtulmuştur. SPME fiberinin sisteme girişı için vidalı bir kapak kullanıldı. Bu çalışmada analiz için mavi SPME ucu (65 µm, PDMS-DVB) (Supelco, ABD) kullanıldı. Analiz öncesi SPME ucunun temiz olmasını sağlanması için adsorban uç 250°C de 15 dak termal desorbsiyona tabi tutuldu. Bitkinin farklı kısımları için optimum zaman koşulları belirlendi. Kavuz ve tohum kısımlarından uçucu bileşiklerin izolasyonu için 3, 5, 8 ve 10 dak'lık zaman periyotları uygulandı.

Deney sürecinde 0.3 g drog toz hale getirilerek 25 ml'lik balona konuldu. Üzerine 5 mL distile su ilave edilerek MSD-SPME düzeneğine bağlanarak ısıtıldı. Kaynamanın başlangıç noktasında SPME ucu açılarak ekstraksiyon işleminin başlatıldı (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. MSD-SPME İşlemi İçin Kullanılan Düzenek

Belirlenen süre sonunda SPME ucu Gaz Kromatografi sisteminin enjeksiyon portuna takılarak termal desorbsiyona tabi tutuldu. *F. esculentum* tohum ve kavuz kısımlarından MSD-SPME yöntemi ile uçucu bileşikler elde edildikten sonra HP-Innowax FSC kolonu (60 m × 0.25 mm, 0.25µm film kalınlığı) ve taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılarak analiz edildi. Fırın 60°C'de 10 dakika kalarak 220°C'ye dakikada 4°C ile çıkacak şekilde ve 220°C'de 10 dakika kalıp, 240°C'ye

dakikada 1°C ile çıkmak üzere programlandı. Splitsiz mod kullanıldı. Alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250°C sıcaklıkta sabit tutuldu. Kütle spektrumu 70 eV, kütle aralığı 35-450 m/z olarak seçildi.

3.7. Sabit Yağ Asitlerin Elde Edilmesi

Bitkisel materyale ait farklı kısımlar (yaprak, çiçek, sap, kavuz ve tohum) toz haline getirilerek 10.0 gr tartıldı. Bitkideki lipitleri ekstre etmek amacıyla Folch metodu kullanıldı [122]. Bu amaçla, bitkisel materyal üzerine kloroform ve metanol gibi farklı polaritelerdeki çözücüler eklendi. Drogda bulunan proteinlere ve karbonhidratlara bağlı lipitlerin ekstraksiyonu bu şekilde sağlandı. Her bir bitki kısmına, çözücü miktarı, erlen içinde bitki seviyesini 1 cm geçecek şekilde kloroform: metanol (2:1) karışımı eklendi. Drog, 24 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda maserasyona tabi tutuldu. Süre sonunda elde edilen ekstre pileli süzgeç kağıdından süzüldü. Filtre üzerinde kalan bitkisel materyal taze çözücü karışımı (kloroform: metanol (2:1) ile iki kez 30'ar dakika süreyle masere edildi ve süzüldü. Süzüntüler birleştirildi ve yoğunlaştırıldı.

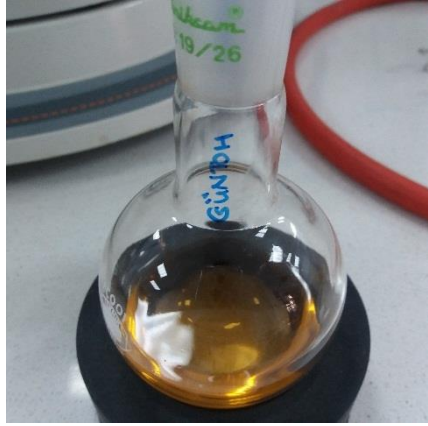
Süzüntüler birleştirildiğinde meydana gelen toplam hacmin yarısı kalana kadar çözücü rotavaporda uzaklaştırıldı ve kalan materyal hacminde saf kloroform ekstre üzerine ilave edildi. Ekstre içinde ayrılmış halde bulunan lipitlerden, protein ve karbonhidrat gibi kirlilikleri uzaklaştırmak için ekstre hacmince %0.4'lük $CaCl_2$ çözeltisi hazırlandı. Elde edilen ekstre ayırma hunisinde 3 kez $CaCl_2$ çözeltisi ile yıkandı. Kloroformlu ekstrenin içinde eser miktarda kalmış olan suyun uzaklaştırılması amacıyla, ekstre susuz Na_2SO_4 'tan geçirildi.

Susuz Na_2SO_4 ekstre içindeki suyu tutarak süzgeç kâğıdı üzerinde sert bir form aldığında taze susuz Na_2SO_4 ilavesi yapılarak suyun tamamının elimine edilmesi sağlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ekstrelerin Susuz Na_2SO_4 'den Geçirildiği Filtrasyon İşlemi

Son olarak elde edilen, içinde bağlı ve serbest haldeki yağ asitlerinin bulunduğu kloroformlu kısım rotavaporda kurutuldu (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Folch Metodu ile Elde Edilen Lipit Fraksiyonu

Elde edilen kuru ekstre sabunlaştırma (saponifikasyon) işlemine tabi tutuldu. Bu amaçla $\text{KOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (1:1:8) çözeltisinde ekstrenin çözünmesi sağlanarak geri dönüştüren soğutucu takılan balon içinde 2 saat kaynatıldı. Bağlı ve serbest haldeki yağ asitleri, KOH ' in oluşturduğu bazik ortamda yağ asitlerinin tuzlarına dönüşür. Sabunlaşmamış kirlilikleri uzaklaştırmak için hekzan kullanıldı. Yağ asitlerinin tuzlarından yeniden yağ asidi elde etmek için %15'lik HCl çözeltisi hazırlandı ve ekstre üzerine pH değeri 1-2 arasında oluncaya kadar eklendi (Şekil 3.10).

240°C'ye dakikada 1°C ile çıkmak üzere programlandı. Split oranı 40:1 olarak seçilerek alev iyonlaşma detektörü ve enjektör 250°C'de tutuldu. Kütle spektrumu 70 eV, kütle aralığı 35-450 m/z olarak seçildi. Maddelerin tanımlanması; tutunma zamanları, kütle spektrumları standartlara ve literatür bilgilerine göre değerlendirildi. Wiley GC/MS kütüphanesi (Wiley, New York, NY, USA), MassFinder 4.0 yazılımı (Dr. Hochmuth Scientific Consulting, Hamburg), Adams kütüphanesi, NIST kütüphanesi ve Başer Uçucu Bileşikler kütüphanesi kaynak olarak kullanıldı. Madde miktarlarının belirlenmesinde alev iyonlaşma detektöründen elde edilen piklerin yüzde alanları kullanıldı.

3.9. LC-MS Analizleri

Sıvı kromatografi analizi aşağıda belirtilen şartlarda gerçekleştirildi.

Sistem	: Shimadzu 20A HPLC - ABSciex 3200 Q trap MS/MS
Metod	: Negatif İyonlaşma Metodu
Kolon	: GL Science Intersil ODS 4.6 X 250 5 μ
Kolon Sıcaklığı	: 40C°
Hareketli Faz	: (A) Su: Asetonitril: Formik asit (89:10:1) (B) Asetonitril: Su: Formik asit (89:10:1)
Akış Hızı	: 0.5ml /dk

B çözücüsünün konsantrasyonu %10'dan başlanarak 40 dk.'da %100 olacak şekilde gradient olarak ayarlandı.

3.10. Ekstraksiyon İşlemi

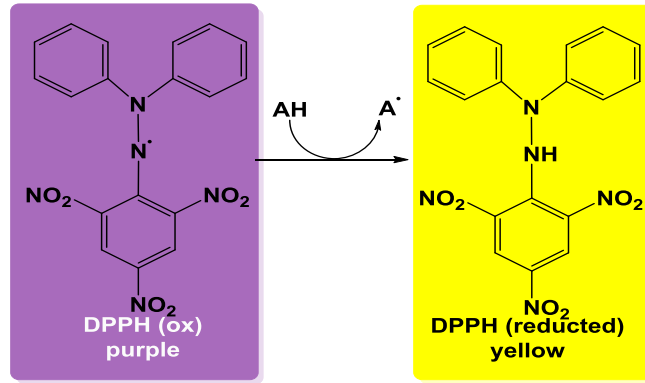
Fagopyrum esculentum türünün Türkiye'de ve Kazakistan'da tescil edilen iki çeşidi olan Güneş ve Sumçanka' ya ait çiçek ve yaprak kısımları (3-5 gr) metanol ile oda sıcaklığında 24 saat süre ile masere edildi. Süre sonunda ekstreler süzülerek, metanol düşük basınç altında uzaklaştırıldı. Kuru ekstreler buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

3.11. Antioksidan Aktivite DeneYleri

3.11.1. DPPH deney şartları

1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH) radikal süpürme deneyi, ilk kez 1958'de Blois tarafından keşfedildi. Daha sonra çok sayıda araştırmacı bu yöntemde yorum katarak değişiklikler yaptı. Elektron transferine dayalı olan antioksidan testlerden biridir. DPPH, bir hidrojen atomu verebilen bileşiklerle reaksiyona giren kararlı bir serbest radikaldir. Bu yöntem, DPPH çözeltisini renksizleştiren bir radikal tür veya bir antioksidanın eklenmesiyle DPPH'in indirgenmesine dayanır. Antioksidan aktivite daha sonra 517 nm'de absorpsiyon azalmasıyla ölçülür [124].

Yöntemde yer alan tepkime şematik olarak Şekil 3.12'de gösterilmiştir:



Şekil 3.12. Serbest Radikal DPPH• ve Antioksidan Arasındaki Tepkime

Bu yöntemde, 96-kuyucuklu plak kuyularının ilk sırasına 100 µL numune (yağ/ekstre/standart) çözeltisi konularak metanol ile seyreltme yapıldı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µL metanollü DPPH çözeltisi (%0.008) eklendi ve 30 dk. karanlıkta inkübe edildikten sonra absorbans değerleri 517 nm'de ölçüldü. Reaksiyon sonunda absorbanstaki bir azalma, bileşiğin serbest radikal süpürme aktivitesini gösterdi [124]. Numunelerin serbest radikal süpürme etkisi inhibisyon yüzdesi olarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% Inh = \frac{Abs\ kör - Abs\ numune}{Abs\ kör} \times 100$$

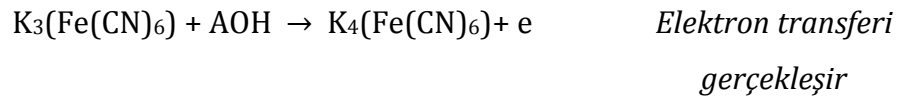
Daha sonra IC₅₀ denilen, DPPH inhibisyonunu yarıya indiren numunenin miktarına ait IC₅₀ değeri *SigmaPlot 12.0* programı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar µg/mL cinsinden belirlendi [125].

3.11.2. İndirgeme gücü: demiri indirgeme antioksidan kapasitesi (FRAP)

İndirgeme gücü, elektron transferine dayalı test yöntemlerdendir. Uçucu yağ ve ekstrelerin antioksidan aktivitesi, demirin Fe⁺³ (ferric) formunu Fe⁺² (ferrous) formuna indirgeme özelliği kullanılarak ölçmek mümkündür. Ancak, bu yöntemle büyük oranda polar çözücülerde çözünen ekstrelerin antioksidan aktivitesi tespit edilebilir. Bu sebeple deneyde uçucu yağların çözünmesini kolaylaştırmak amacıyla çözücü olarak %10 DMSO içeren metanol kullanılarak Oyaizu metodu modifiye edilmiştir. Ayrıca yöntemde, deney tüpleri yerine “deep-well plaklar” kullanılarak deney pratik hale getirildi.

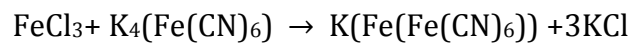
Deep-well plaklarda her bir numuneye ait altı dilüsyon (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 ve kör) ve bunların 4 tekrarı hazırlandı ve NaH₂PO₄-NaOH (pH 6.6) buffer olarak eklendi. Daha sonra demirin Fe⁺³(ferric) formunu içeren potasyum ferrisiyanid K₃(Fe(CN)₆) ilave edildi. Karışım bu haliyle 50°C’de 30 dakika inkübe edildi. Süre sonunda %10’luk trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve üzerine %0.1’lik ferrik klorit (FeCl₃) ilave edildi. Elde edilen çözeltiler Eliza plaklarına aktarılarak 700 nm’de mikropalak okuyucuda okutularak değerler kaydedildi.

Teste tabi tutulan numunede indirgeyici güce sahip antioksidanlar varsa, potasyum ferrisiyanid K₃(Fe(CN)₆) içindeki Fe⁺³’ü Fe⁺² ‘ye indirger ve potasyum ferrosiyanid K₄(Fe(CN)₆) oluşur:



*AOH- antioksidan etkili bileşikler (polifenoller, vb.)

Oluşan potasyum ferrosiyanid üzerine daha sonra FeCl₃ eklendiğinde yeni bir kompleks oluşur:



Test edilen numunedeki bileşiklerin (antioksidanların) indirgeyici gücü ne kadar yüksek ise, o kadar çok $K(Fe(Fe(CN)_6))$ kompleksi oluşur. Elde edilen absorbans değerleri indirgene gücü hesaplamasında kullanıldı.

Reaktiflerin Hazırlanması:

Sodyum hidroksit 1 mol/L (NaOH): 4 gr NaOH, 100 ml'lik bir balon jojeye alınarak bir miktar suyla çözüldü. Çözündükten sonra balon jojede 100 ml'ye tamamlandı.

NaH_2PO_4 -NaOH buffer 0.2 mol/L (pH 6.6): 5.52 gr $NaH_2PO_4 \times H_2O$ tartılarak 200-250 ml'lik bir erlene aktarıldı. 100 ml kadar distile su eklenerek çözünmesi sağlandı. Hazırlanan NaOH çözeltisi eklenerek pH 6.6 olana kadar pH metrede ölçümü yapıldı. Daha sonra çözelti distile su ile 200 ml'ye tamamlandı.

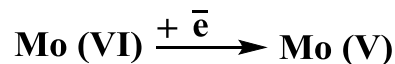
Potasyum ferrisiyanid %1.0 [$K_3Fe(CN)_6$]: 1 gr potasyum ferrisiyanid tartılır, bir erlene alınır ve üzerine distile su koyularak 100 ml'ye tamamlandı.

Trikloroasetik Asit %10 (TCA): 10 gr TCA tartılarak bir erlene alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Ferrik klorit %0.1 ($FeCl_3$): 0.1 gr $FeCl_3$ tartılır, bir erlene aktarıldı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Bu çözelti taze hazırlanır ve stabilitesini sağlamak amacıyla 0.25 ml H_2SO_4 (derişik) ilave edildi.

3.11.3. Toplam Fenolik Bileşik Miktar Tayini

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarı Folin Ciocalteu metoduna göre ölçüldü [126, 127]. Folin-Ciocalteu reaktifindeki fosfomolibdik ve fosfotungustik asitler bazik ortamda (%20 Na_2CO_3) antioksidan etkili bileşikler ile indirgenmektedir. Ekstrelerin indirgeme kapasitesi spektrofotometrik olarak 760 nm'de ölçüldü. Sonuçlar gallik aside eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyde yer alan reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir:



96-deep well tipindeki plak kuyucuklarına 20 µl numune üzerine 1.56 mL saf su ve 100 µl Folin Ciocalteu reaktifi eklenerek karıştırıldı. Karışım 1-8 dakika karanlıkta bekletildi. Süre sonunda 300 µL Na_2CO_3 çözeltisi (%20'lik) ilave edilerek 25°C de 2 saat bekletildi. Daha sonra karışımdan 300 µL alınarak 96-kuyucuklu mikroplağa aktarıldı ve absorbans değerlerinin okuması 760 nm'de

yapıldı. Sonuçlar 3×3 tekrar üzerinden hesaplandı. Gallik asit için kalibrasyon eğrisi çizilerek denklem ve R² değerleri elde edildi.

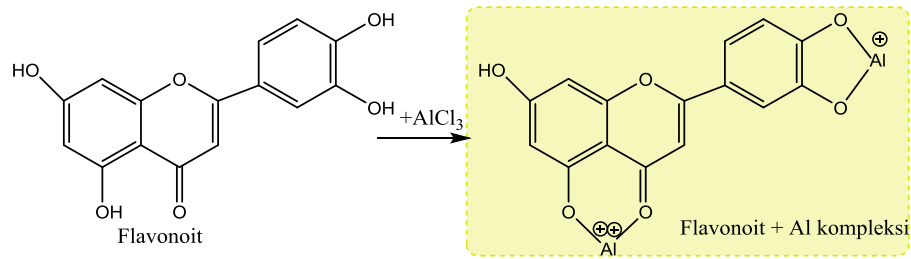
Deneye ilişkin reaktiflerin hazırlanışı şu şekildedir;

Sodyum karbonat (Na₂CO₃): 20 gr Na₂CO₃ tartılıp 100 mL suda çözüldü.

Gallik asit: Maddenin 1 mg/mL'lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilti.

3.11.4. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerdeki toplam flavonoit miktarı rutine eşdeğer miktarları üzerinden AlCl₃ reaktifi kullanılarak tayin edildi. 96-deep well tipindeki plak kuyucuklarına 50 µl numune (ekstre/rutin), 50 µl AlCl₃ çözeltisi ve 1.15 mL absolü etanol ilave edilerek karıştırıldı. Kör deneyde 50 µl numune üzerine birkaç damla asetik asit (%15) ve 1.2 mL absolü etanol ilave edildi. Plaklar karanlıkta 25°C de 40 dk bekletildi. Daha sonra kuyucuktaki karışımdan 300 µl alınarak 96-kuyucuklu mikroplağa aktarıldı ve plak okuyucuda absorbans değerlerinin 415 nm'de okuması yapıldı (Şekil 13). Rutin için kalibrasyon eğrisi çizilerek denklem ve R² değerleri elde edildi. Deney 3 x 3 tekrar yapılarak sonuçlar rutine eşdeğer olarak hesaplandı [126]. Deneyde yer alan tepkime mekanizması Şekil 3.15'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Flavonoit ve AlCl₃ Reaktifi Arasında Gerçekleşen Tepkime

Reaktiflerin hazırlanması:

Aluminyum klorür: 2.0 gr AlCl₃ susuz tartılarak 100 mL suda çözüldü.

Rutin hidrat: Maddenin 1 mg/mL'lik konsantrasyonda çözeltisi hazırlanıp 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mg/mL'lik konsantrasyonlara seyreltilti.

3.12. Antikolinesteraz Aktivite Deneyi

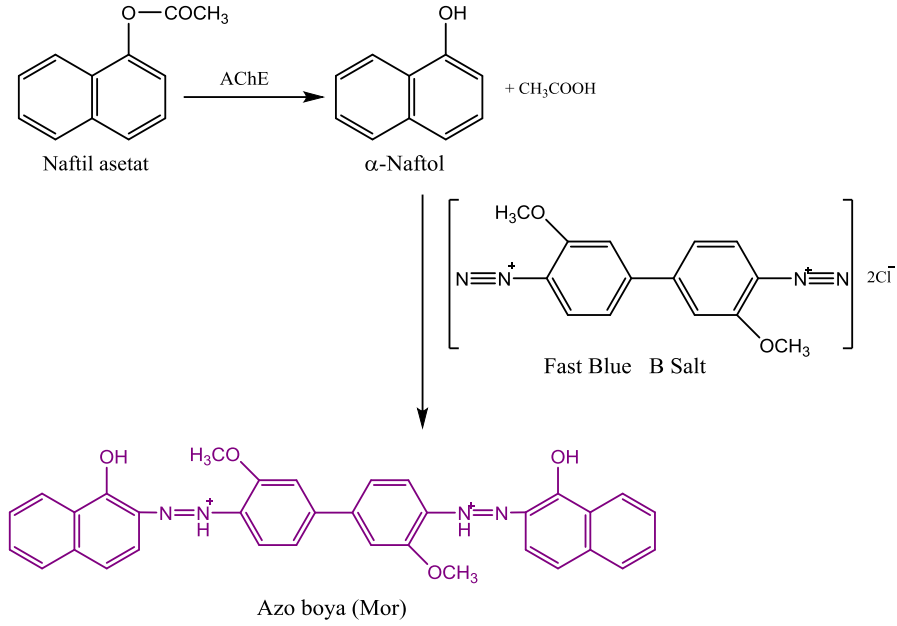
F. esculentum uçucu yağ ve ekstrelerin antikolinesteraz aktivitesinin belirlenmesinde iki farklı yaklaşım uygulandı. Bu metotlar, nitel bir ölçüm olan İTK-otografi ve spektroskopik niceliksel sonuç almayı sağlayan mikroplak titerdir.

3.12.1. İTK-otografi metodu

Uçucu yağ ve ekstrelerin AChE enzimi üzerinde inhibisyonu etkisi İTK-Otografi tekniği ile tespit edildi. Bu amaçla Silicagel F₂₅₄ İTK plağı uygun boyutta kesildi ve asetonla yıkanarak kurutuldu. Kuru plak üzerine 1x1 cetvel çizildi ve her karenin içine uçucu yağ (10, 2 ve 0.5 µl) ve ekstrelerin (5, 2 ve 0.5 µl) çözeltileri spot şeklinde uygulandı. Standart olarak galantamin (15, 10 ve 5 µl) kullanıldı.

Uygulanan numuneler kuruduktan sonra (oda sıcaklığında) plak üzerine 2 mL 3.33 U/mL AChE çözeltisi püskürtüldü. Daha sonra plak, enzim ile numunelerin tepkimeye geçebilmesi için 37°C'de nemli ortamda 20 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda taze hazırlanmış 1-Naftil asetat: Fast Blue B Salt (1:4) karışımı plak üzerine püskürtülerek 30 dakika kurumaya bırakıldı. Plak üzerinde oluşan mor-mavi zemin üzerindeki beyaz alan alanlar inhibisyonu etkisinin göstergesi olarak kabul edildi. Açık renkli alan ne kadar büyükse o bölgedeki etken madde grubunun o kadar AChE üzerinde etkili olarak yorumlandı [128].

Deneyde gerçekleşen reaksiyon Şekil 3.13’de gösterilmiştir.



Şekil 3.14. İTK-Otografide Kullanılan Renk Reaksiyonu

Deney için reaktiflerin hazırlanışı şu şekildedir;

Asetilkolinesteraz: 0.67 mg AChE (500 U) 50 mL tampon A çözeltisi (pH=8.0) içinde çözüldü ve 1'er mL'lik alikvot olarak cryo tüplere paylaştırıldı. Her biri için 10 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. Alikvotlar daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda (-80 °C) muhafaza edildi. Stok çözeltiden 660 uL alınarak 2 mL'ye tampon B çözeltisi ile son konsantrasyon 3.33 U/mL olacak şekilde tamamlandı.

Naftil asetat: 2.5 mg 1-naftil asetat tartılıp 1.0 mL absolü etanolde çözüldü (Taze hazırlanmalı).

Fast Blue B salt: 10.0 mg Fast Blue B Salt tartılıp 4 mL ultra saf suda çözüldü (Taze hazırlanmalı).

Tampon A: 1.514 gr Tris tartılıp 250 mL ultra saf suda çözüldü. pH değeri (8.0) derişik HCl ile ayarlandı.

Tampon B: 25 mg BSA tartılıp 25 mL tampon A içerisinde çözüldü.

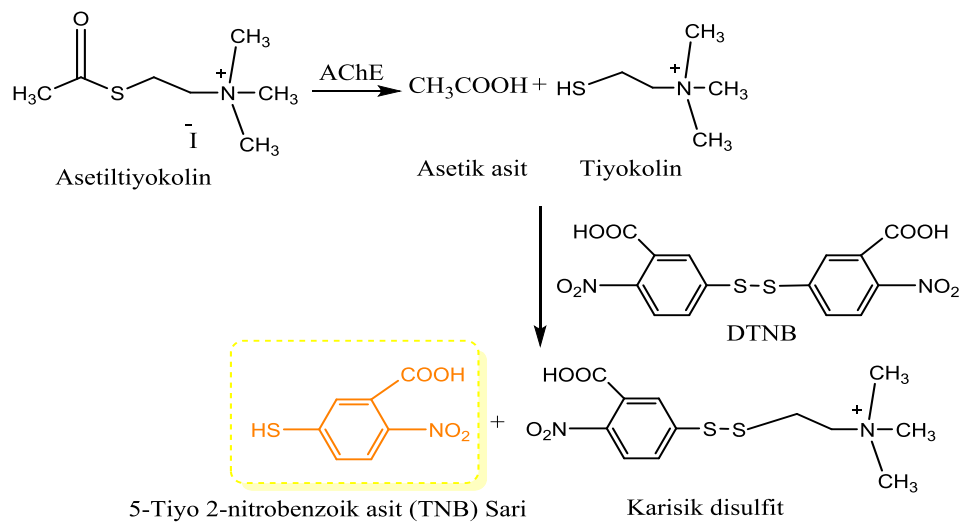
Galantamin: Maddenin 2 mg/mL çözeltisi metanolde hazırlandı.

3.12.2. Ellman metodu

Antikolinesteraz aktivitenin İTK “dot-blot” tekniği ile tespit edilmesi sonucunda etkiye sahip olan uçucu yağ ve ekstraler seçilerek aktivitenin niceliksel ölçümü mikropalak titer yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla Ellman metodu kullanıldı. 96- kuyucuklu mikropalağın her bir kuyucuk içine 25 µl numune, BSA (Bovin Serum Albumin) içeren 50 µl B tamponu ve 25 µl AChE çözeltisi ilave edilerek 25°C’de 15 dakika boyunca inkübasyona tabi tutuldu. Süre sonunda 125 µl DTNB (Ditiyobisnitrobenzoik asit) ve 25 µl ATCl (Asetiltiyokolin iyodür) substratı da eklendikten hemen sonraki 15’inci dakikada 412 nm’de plak okuyucuda okuma yapılarak absorbans değerleri kaydedildi. Numune kaynaklı renk oluşumunu elimine edebilmek için tampon, numune ve substrat ile bir deney daha yapılarak, enzimin olduğu deney sonuçlarından çıkarıldı ve yüzde inhibisyon değerleri hesaplandı [129, 130]. Kontrole göre numunelerin AChE enzimini inhibe etme etkileri yüzde inhibisyonu olarak hesaplandı.

$$\%Inh = \left[\frac{(Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank}) - (Abs_{numune} - Abs_{numune\ blank})}{Abs_{kontrol} - Abs_{kontrol\ blank}} \right] \times 100$$

Deney 3x3 tekrar yapılarak ortalama değerleri elde edildi. Deneyde yer alan tepkime Şekil 3.14’de gösterilmiştir.



Şekil 3.15. Ellman Metodunda Gerçekleşen Renk Reaksiyonu

Reaktiflerin hazırlanması:

Asetilkolinesteraz: 0.67 mg AChE (500 U) 50 mL tampon A çözeltisi (pH:8.0) içinde çözüldü ve 1'er mL'lik alikvot olarak cryo tüplere paylaştırıldı. Her biri için 10 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. Alikvotlar daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda (-80 C) bekletildi. Stok çözeltiden 1 mL alınarak üzerine 44.5 mL A tamponu eklendi. Böylece 0.22 U/mL konsantrasyonda enzim çözeltisi elde edildi.

Tampon A ve tampon B: İTK-otografi metodunda açıklanan şekilde hazırlandı.

Tampon C: 0.29 gr NaCl ve 0.2 gr MgCl₂×6H₂O tartılarak 50 mL A tamponu içerisinde çözüldü.

DTNB: 60.0 mg madde tartıldı ve 50 mL tampon C içerisinde çözümlenerek 3 mM'lık çözeltisi hazırlandı.

ATCl: 43.0 mg substrat tartıldı ve 10 mL ultra saf su içerisinde çözümlenerek 15 mM'lık çözeltisi hazırlandı.

Galantamin: Maddenin 0.1 mg/mL çözeltisi metanolde hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1. Uçucu Bileşenler

4.1.1. Uçucu yağların verim ve kimyasal kompozisyonu

F. esculentum bitkisinin iki farklı çeşidinin (Güneş ve Sumçanka) yaprak, çiçek ve sap kısımlarından hidrodistilasyon yoluyla uçucu yağlar elde edilmiştir. Distilasyon sonucunda açık sarı renkli ve topraksı kokulu uçucu yağlar elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Fagopyrum esculentum* Uçucu Yağı

Elde edilen uçucu yağların verimi kuru bitki üzerinde hesaplanarak Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *F. esculentum* Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Yaprak, Çiçek ve Sap Kısımlarının Uçucu Yağ Verimleri

	% Verim (h/a)		
	Yaprak	Çiçek	Sap
Güneş	0.033	0.022	0.037
Sumçanka	0.026	0.065	0.044

F. esculentum Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin Eskişehir-Kütahya geçit iklimi koşullarında yetiştirilmiş örneklerine ait yaprak, çiçek ve sap kısımlarının uçucu yağ kimyasal kompozisyonu gaz kromatografisi (GC) ile aydınlatılmıştır. Uçucu bileşenlerin kalitatif analizi GC/MS ile kantitatif analizi ise GC-FID cihazı ile gerçekleştirilmiştir İki çeşide ait uçucu yağ bileşiklerinin HP-Inowax kolondan

çıkış sırasına göre hazırlanmış olan liste Çizelge 4.2’de gösterilmektedir. Bu uçucu bileşenlerin kromatografik profilleri Şekil 4.2-4.7’de gösterilmiştir.

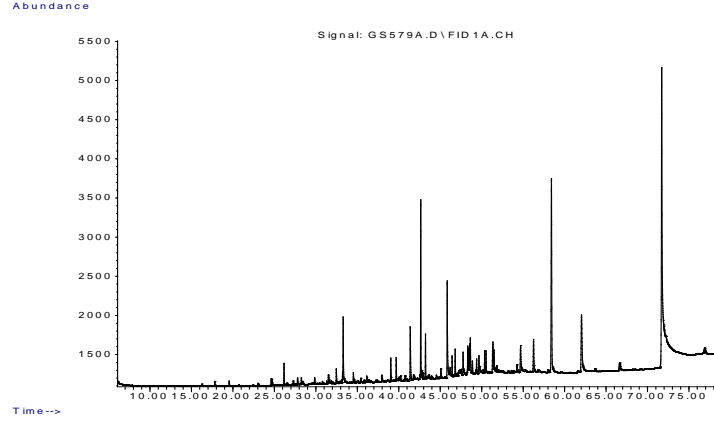
Çizelge 4.2. *Fagopyrum esculentum* Türünün Güneş ve Sumçanka Çesitlerinin Farklı Kısımlarına Ait Uçucu Yağlarının Kimyasal Kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%					
			Güneş			Sumçanka		
			Y	Ç	S	Y	Ç	S
1	1280	<i>p</i> -Simen		1.3				
2	1343	2- Metiltridekan					0.4	
3	1382	Tetradekan					0.5	
4	1400	Nonanal	0.4	2.2			0.5	
5	1422	Dimetil tetradekan	1					
6	1467	2-Nonen-4-on				1.5		
7	1475	Menton	0.3					
8	1506	Dekanal	0.4					
9	1548	(<i>E</i>)-2-Nonenal			e			
10	1553	Linalool	0.1		0.6	0.4		0.4
11	1562	Oktanöl	0.5		e			
12	1598	<i>trans</i> - İzopulegon	0.8					
13	1604	β -Siklositral				0.5		
14	1612	β -Karyofillen		1.1			0.4	
15	1614	Terpinen-4-öl		e				
16	1620	β -Bisabolen				e	e	
17	1630	Safranal				0.3		
18	1655	(<i>E</i>)-2-Desenal			0.2			
19	1662	Pulegon	4	4				
20	1664	1-Nonanol			e			
21	1715	(<i>E,E</i>)-2,4-Nonadienal			e			
22	1764	(<i>E</i>)-2-Undesenal			0.7			
23	1779	Metil dodekanoat (=M, laurat)				0.2		
24	1827	(<i>E,E</i>)-2,4-Dekadienal			e			
25	1830	Tridekanal		1			0.5	
26	1834	(<i>E</i>)-Geranilaseton	1.2			1	e	
27	1958	(<i>E</i>)- β -Iyonon	3.3	1.4	e	3.7	0.5	0.3
28	1973	1-Dodekanöl		0.8	e	0.4		e
29	1974	<i>trans</i> - Kalamenen	8.3					

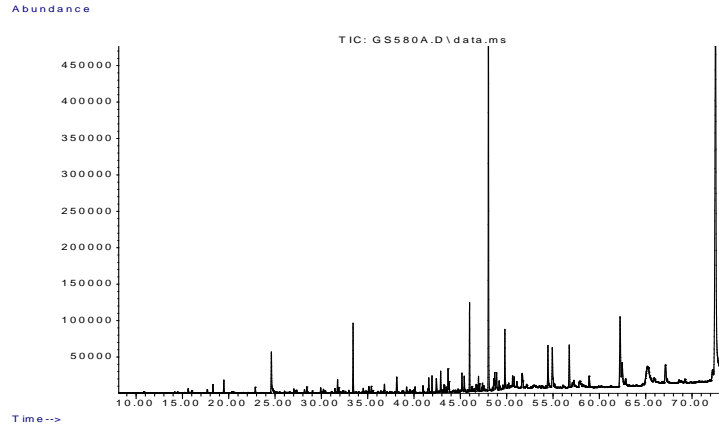
Çizelge 4.2. (Devam) *Fagopyrum esculentum* Türünün Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Farklı Kısımlarının Uçucu Yağları Kimyasal Kompozisyonu

No	RRI	Bileşik	%					
			Güneş			Sumçanka		
			Y	Ç	S	Y	Ç	S
30	1980	<i>trans</i> -β-İyonon-5,6-epoksit	0.3			0.5		
31	1995	Metil tetradekanoat (=M. miristat)				0.6		
32	1998	(<i>E</i>)-Nerolidol				0.4		
33	2008	Karyofillen oksit		2.2			1	
34	2041	Pentadekanal		1.3			0.6	
35	2100	Heneikosan		2.3			1.2	
36	2110	Hekzahidro-farnesilaseton	5.8	4.6	2.8	4.2	1.8	0.4
37	2127	(<i>E</i>)-2-Hekzenil benzoat				0.3		
38	2143	2,6-Diizopropilnaftalen				0.4		
39	2179	3,4-Dimetil-5-pentiliden-2(5H)-furanon	1.3			0.3		
40	2179	1-Tetradekanol		0.9			0.5	0.1
41	2180	Timol						0.2
42	2182	3,4-Dimetil-5-pentil-5H-furan-2-on	0.5					
43	2189	Metil hegzadekanoat (=M. palmitat)				2.7		0.1
44	2192	Nonanoik asit			0.1			
45	2239	Karvakrol	1.4					
46	2259	İzofitol	0.9					
47	2298	Dekanoik asit			0.2			0.1
48	2300	Trikosan	1	6.2		0.7	4.2	1
49	2305	Galaksolit (I)	1.1	0.8				
50	2310	Galaksolit (II)	1	0.9				
51	2342	Hekzil sinnamik aldehit	2.8		0.2			
52	2346	Farnesilaseton	1.9			1.4		0.5
53	2500	Pentakosan		3.7	0.9		12.7	0.7
54	2503	Dodekanoik asit (=Laurik asit)	2.8	6.4	1.4	0.5	0.3	2
55	2509	Metil linoleat	0.7			3.2		
56	2538	Metil linolenat				6.1	1.6	
57	2573	1- Oktadekanol						0.4
58	2574	Hekzakosan					1.4	
59	2622	Fitol	16.7			9.4	1.5	0.5
60	2670	Tetradekanoik asit	6.9	5.5	4.4	2.1	2.2	6.8
61	2675	(<i>Z</i>)-Oktades-9-en-18-olit	e					
62	2700	Heptakosan			4.1	4.9	13.6	1.9
63	2822	Pentadekanoik asit			1.6		1.9	0.9
64	2900	Nonakosan	0.4				49.8	
65	2931	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit)	32	53.5	82.7	51.5		83.1
TOPLAM:			97.8	99.9	99.9	97.2	97.1	99.4

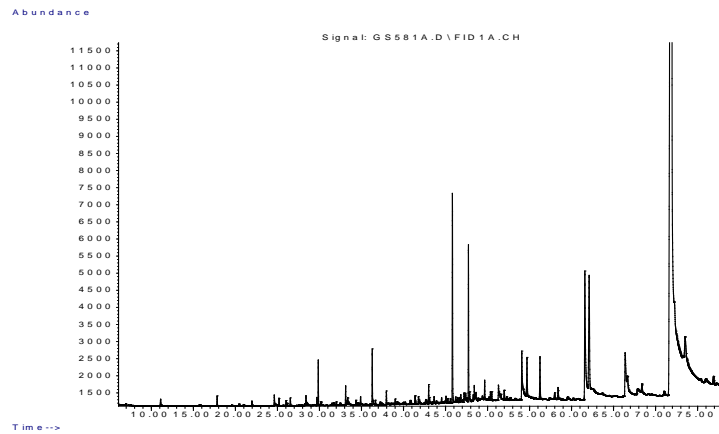
Ç: Çiçek, S: Sap, Y: Yaprak, e: Eser miktar



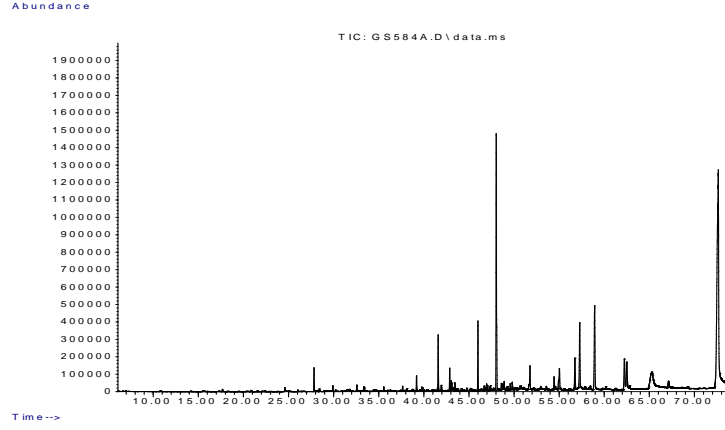
Şekil 4.2. *F. esculentum* Güneş Çeşidi Yaprığı Uçucu Yağ Kromatografik Profili



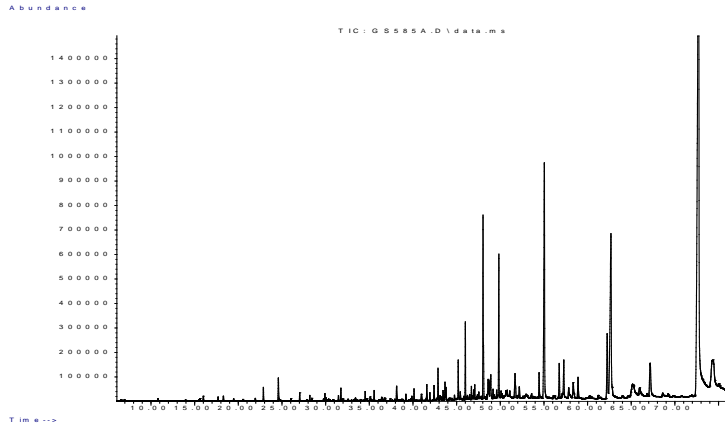
Şekil 4.3. *F. esculentum* Güneş Çeşidi Çiçeği Uçucu Yağ Kromatografik Profili



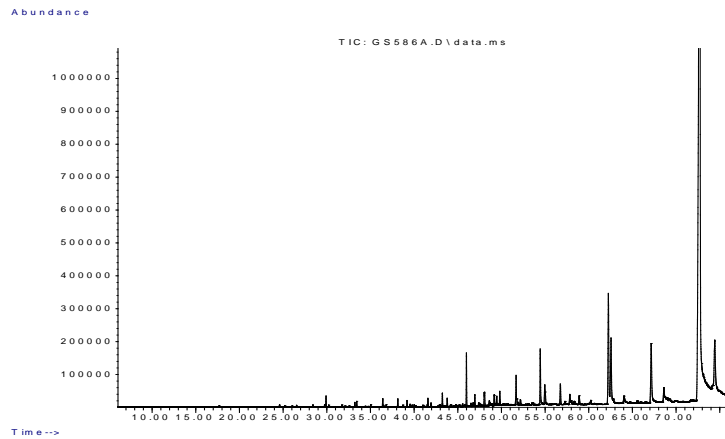
Şekil 4.4. *F. esculentum* Güneş Çeşidi Sapının Uçucu Yağ Kromatografik Profili



Şekil 4.5. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidi Yaprak Uçucu Yağ Kromatografik Profili



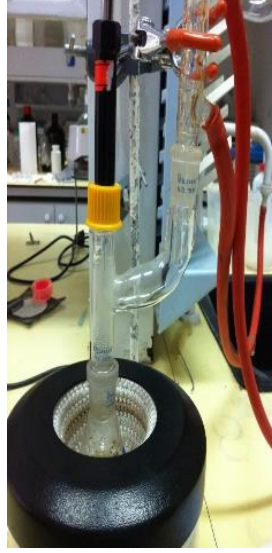
Şekil 4.6. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidi Çiçeği Uçucu Yağ Kromatografik Profili



Şekil 4.7. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidi Sap Uçucu Yağ Kromatografik Profili

4.1.2. Kombine MSD-SPME analiz sonuçları

F. esculentum meyveleri (tohum) uçucu bileşen kompozisyonu kombine MSD-SPME yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu amaçla Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin her birinin tohum ve kavuzları ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. MSD-SPME Düzenegi

Çizelge 4.3'te de GC/MS sisteminde analiz edilen maddeler HP Innowax kolondan çıkış sırasına göre sıralanmıştır. Analizi yapılan uçucu bileşenlere ait kromatogramlar da Şekil 4.9-4.12'de gösterilmektedir.

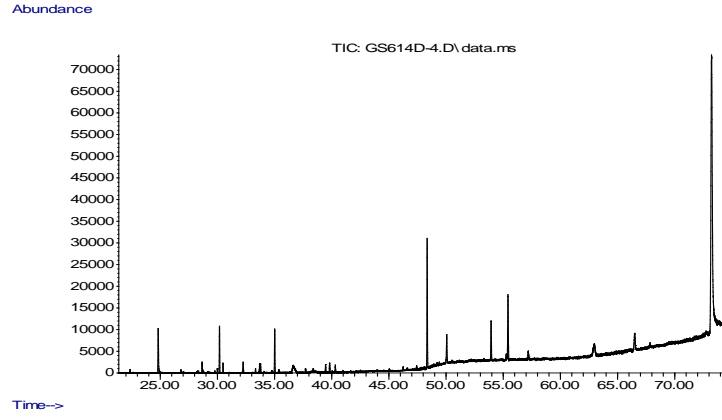
Çizelge 4.3. Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Tohum ve Kavuzlarının MSD-SPME Yöntemi ile Elde Edilen Uçucu Bileşenleri

No	RRI	Bileşen	%			
			Güneş		Sumçanka	
			T	K	T	K
1	1400	Nonanal	5.0		3.3	
2	1553	Linalool	3.9		0.5	
3	1562	Oktanöl			0.3	
4	1587	β -Funebren			2.7	
5	1709	α -Terpinil asetat				2.3
6	1726	Germakren D	4.2			

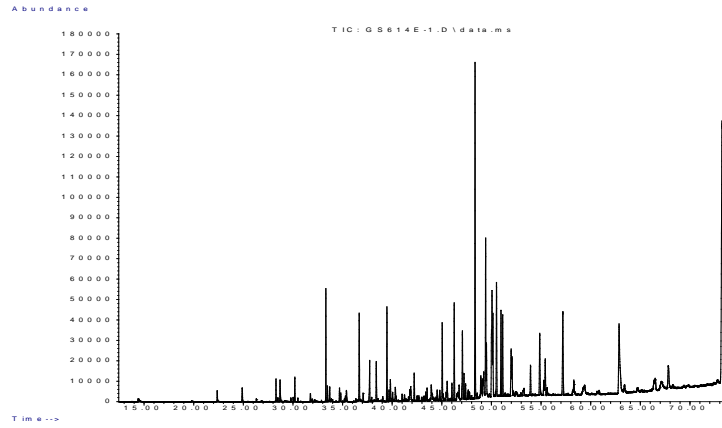
Çizelge 4.3. (Devam) *Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Tohum ve Kavuzlarının MSD-SPME Yöntemi ile Elde Edilen Uçucu Bileşenleri*

7	1764	(E)-2-Undesenal		4.1		4.1
8	1779	(E,Z)-2,4-Dekadienal				e
9	1827	(E,E)-2,4-Dekadienal		1.9		2.3
10	1868	(E)-Geranilaseton		4.1		5.9
11	1958	(E)- β -İyonon				5.0
12	1973	1-Dodekanol		1.3		
13	2131	Hekzahidro-farnesilaseton		4.4		3.0
14	2144	Spatulenol				2.4
15	2187	T-Kadinol				2.5
16	2192	Nonanoik asit		3.8		
17	2287	(2Z, 2Z)- Farnesol		2.7		
18	2298	Dekanoik asit		2.2		
19	2300	Trikosan	3.5	5.6		
20	2302	n-Hekzil salisilat		4.4		
21	2302	(Z)-3-Hekzenil salisilat				14.2
22	2305	Galaksolit (I)		4.4		1.9
23	2310	Galaksolit (II)		4.1		1.6
24	2342	Hekzil sinnamik aldehit		3.3		
25	2384	1- Hekzadekanol				2.8
26	2456	(Z)-9- Metil oktadesenoat (=M. oleat)		1.7		
27	2482	(Z)-7-Oktadesenoik asit metil ester	4.5			
28	2503	Dodekanoik asit (=Laurik asit)		2.2		4.3
29	2509	Metil linoleat	7.8			
30	2509	(Z,Z)-9,12-Metil oktadekadienoat		2.3		
31	2607	1-Oktadekanol				6.3
32	2670	Tetradekanoik asit		8.9		6.1
33	2931	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit)	67.7	33.2	93.1	35.1
TOPLAM:			96.7	94.6	99.9	99.8

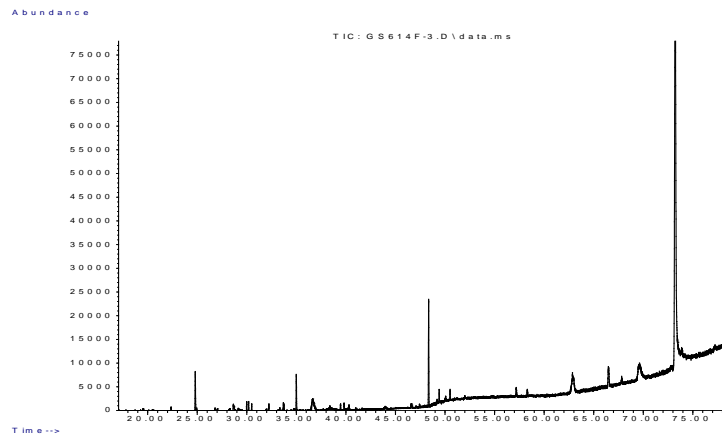
T: Tohum, K: Kavuz



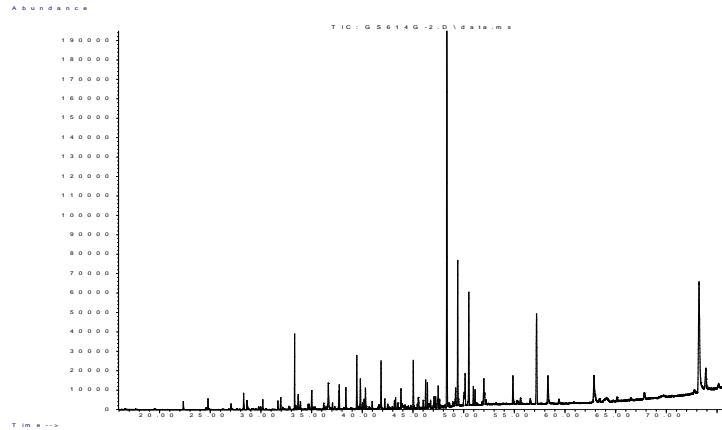
Şekil 4.9. *F. esculentum* Güneş Çeşidi Tohumu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)



Şekil 4.10. *F. esculentum* Güneş Çeşidi Kavuzu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)



Şekil 4.11. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidi Tohumu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)



Şekil 4.12. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidi Kavuzu Uçucu Bileşenlerin Kromatografik Profili (MSD-SPME Yöntemi ile)

4.1.3. HS-SPME analiz sonuçları

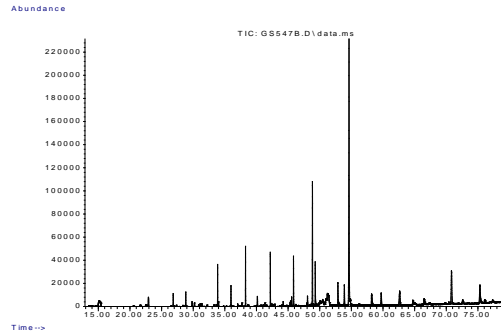
F. esculentum çeşitlerinin kültüre alındığı bölgede içerdiği uçucu bileşenlerin tespiti için HS-SPME metodu kullanıldı. GC-MS/FID sisteminde HP Inowax kolondan maddelerin çıkış sırasına (RRI) göre tablosu Çizelge 4.7’de gösterilmiş olup, analize ilişkin kromatografik profiller Şekil 4.13-4.14’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. HS-SPME Metoduna göre Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Kimyasal Kompozisyonu

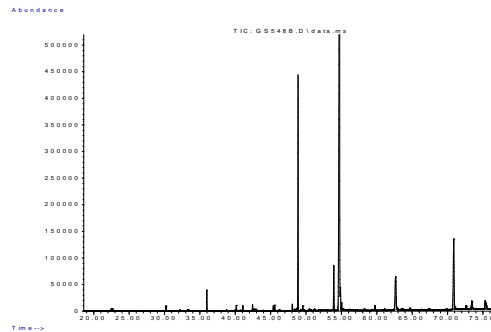
No	RRI	Bileşenler	%	
			Güneş	Sumçanka
1	1327	(Z)-3-Hekzenil asetat		0.38
2	1532	Kafur	0.47	0.37
3	1719	Borneol	2.45	1.19
4	1870	Hekzanoik asit	1.27	0.34
5	1900	<i>epi</i> -Kubebol		0.25
6	1957	Kubebol		0.29
7	1981	Heptanoik asit		0.1
8	2084	Oktanoik asit (= Kaprilik asit)	1.11	0.31
9	2192	Nonanoik asit (=Pelargonik asit)	1.18	0.35
10	2226	Metil hegzadekanat	15.02	13.49

Çizelge 4.4. (Devam) *HS-SPME* Metoduna göre Güneş ve Sumçanka Çeşitlerinin Kimyasal Kompozisyonu

No	RRI	Bileşenler	%	
			Güneş	Sumçanka
11	2265	Metil palmitoleat		0.22
12	2336	Metil heptadekanoat		0.1
13	2431	Metil oktadekanoat (=M. stearat)		3.55
14	2456	(Z)-9-Metil oktadesenoat (=M. oleat)	63.4	1.69
15	2472	(E)-9-Oktadesenoik asit metil ester (=M. elaidat)	1.16	57.3
16	2482	(Z)-7-Oktadesenoik asit metil ester		0.6
17	2483	Metil oktadekanoat (=M. stearat)	3.06	
18	2678	Oksiranoktanoik asit, 3-oktil-metil ester	4.21	
19	2679	Metil 11-metoksioktadekanoat		5.42
20	2849	Metil 3-oktil-oksiraneoktanoat		10.08
21	2900	Nonakosan		1
22	2931	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit)	5.93	1.41
TOPLAM:			99.26	98.44



Şekil 4.13. Güneş Çeşidinin Tarladaki Uçucu Bileşen Kromatogramı



Şekil 4.14. Sumçanka Çeşidinin Tarladaki Uçucu Bileşen Kromatogramı

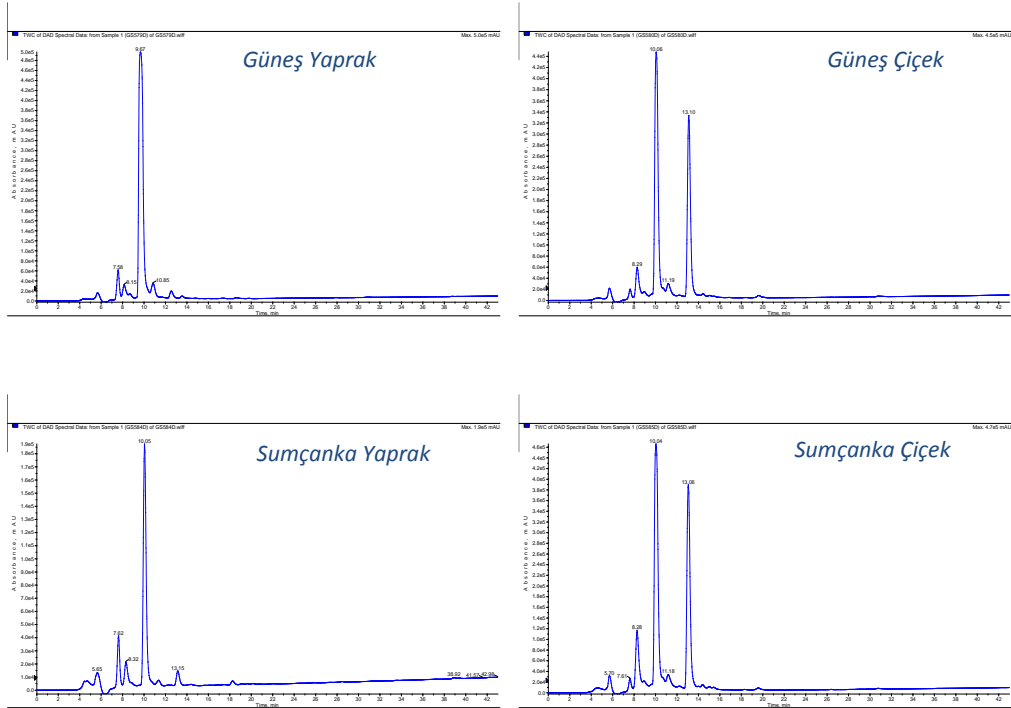
4.2. LC-MS Analiz Sonuçları

Karabuğday yaprak ve çiçeklerine ait sıvı kromatografi sonuçları Çizelge 4.8'de verilmiştir. Ekstrelerin yaprak ve çiçek için kromatografik profilleri de Şekil 15-16'da gösterilmiştir.

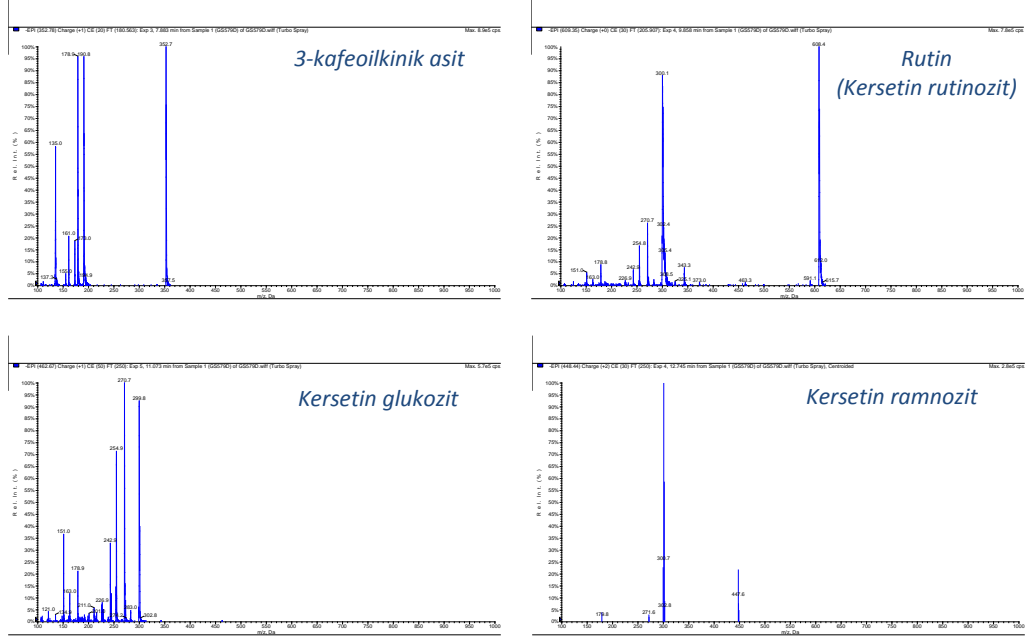
Çizelge 4.5. Çeşitlerin Yaprak ve Çiçek Ekstrelerinin Sıvı Kromatografik Verilere Göre Ana Maddeleri

RT	M-H	MS ²	Tanımlama	Ekstre
7.6	353	191, 179	3-kafeoilkinik asit	GY, SY
8.2	353	191, 179	5-kafeoilkinik asit	GY, GÇ, SY, SÇ
9.7	609	300, 271, 255	Kersetin rutinozit (rutin)	GY, GÇ, SY, SÇ
10.9	463	343, 300, 271	Kersetin glukozit	GY, GÇ, SY, SÇ
12.7	447	301, 271	Kersetin ramnozid	GY, GÇ, SY, SÇ

GÇ: Güneş Çiçek, GY: Güneş Yaprak, SÇ: Sumçanka Çiçek, SY: Sumçanka Yaprak



Şekil 4.15. Çeşitlerin Yaprak ve Çiçeklerinin LC-MS Kromatogramları



Şekil 4.16. Standart Bileşiklerin LC-MS'te Elde Edilen Kütle Spektrumları

Çizelge 4.6. Çeşitlerin Yaprak ve Çiçeklerinde Rutin Miktarları

	Ekstrede % Rutin Miktarı	
	Yaprak	Çiçek
Güneş	14.36	16.28
Sumçanka	4.57	14.79

4.3. Sabit Yağ Asitleri Analiz Sonuçları

F. esculentum iki çeşidinin farklı kısımlarındaki sabit yağ profilleri araştırıldı. Bu amaçla sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu kullanıldı. Elde edilen sabit yağ asitleri metilleme işlemi ile uçucu haline getirilerek GC-FID ve GC/MS sistemleri ile tanımlandı. Kapiler kolondan çıkış sırasına göre bileşikler Güneş çeşidi için Çizelge 4.8 ve Sumçanka çeşidi için Çizelge 4.9'te listelenmiş, analizlere ait kromatogramlar Şekil 4.15-4.20'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. *F. esculentum* Güneş Çeşidine Ait Sabit Yağ Kompozisyonu

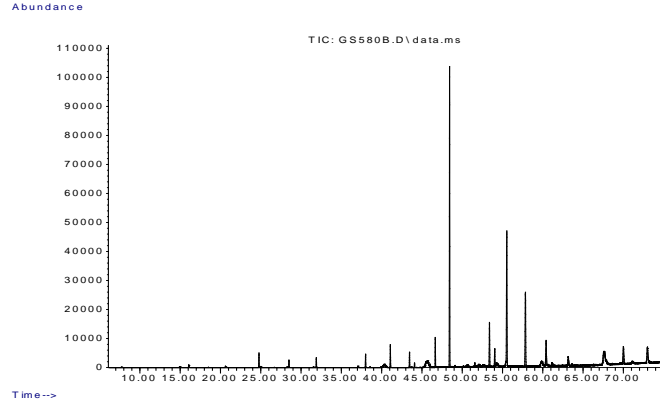
No	RRI	Bileşen	Güneş				
			Y	Ç	S	T	K
1	1199	Metil kaproat		0.2			
2	1399	Metil oktanoat		1.1			
3	1500	Metil nonanoat		0.6			
4	1600	Metil dekanoat (=M. kaprat)	0.3	1.0			
5	1791	Metil dodekanoat (=M. laurat)	3.8	1.0	5.7		
6	1998	Metil tetradekanoat (=M. miristat)	4.1	1.5	10.5	0.2	
7	2011	Dimetil suberat	0.7		2.0		
8	2112	Metil pentadekanoat			2.5		
9	2126	Dimetil azelat	4.7	2.7	9.5		
10	2226	Metil hegzadekanoat (=M. palmitat)	20.7	22.0	52.1	15.1	27.9
11	2235	Metil palmitoleat	1.5			0.1	
12	2339	Heptadekanoik asit metil ester		0.4			
13	2431	Metil oktadekanoat (=M. stearat)	2.6	5.2	5.0	2.2	5.6
14	2435	(E)-9-Oktadesenoik asit metil ester		3.2		40.1	37.0
15	2441	Metil oleat	2.2		2.8		
16	2445	(Z)-7-Oktadesenoik asit metil ester				e	
17	2509	Metil linoleat	12.0	20.6	7.5	34.5	29.4
18	2583	Metil linolenat	45.9	13.5	2.3	1.9	
19	2621	Metil eikosanoat (=M. araşidat)	1.4	2.7			
20	2621	Metil araşidat				1.5	
21	2641	11-Eikosenoik asit, Metil ester				3.0	
22	2700	Heptakosan		3.9			
23	2819	Metil behenat (=M. dokosanoat)		9.4		1.4	
24	2900	Nonakosan		10.5			
TOPLAM:			100.0	99.7	100.0	100.0	100.0

Çizelge 4.8. *F. esculentum* Sumçanka Çeşidine Ait Sabit Yağ Kompozisyonu

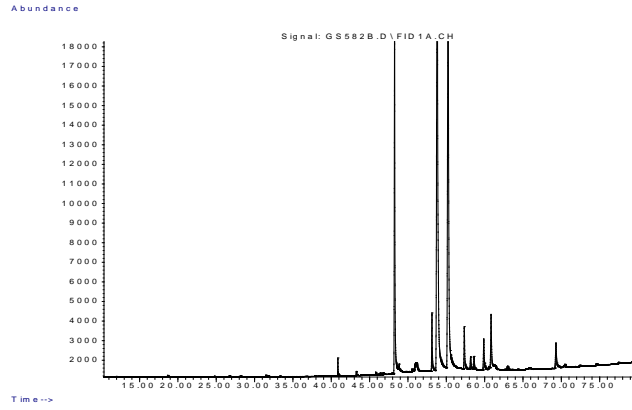
No	RRI	Bileşen	Sumçanka (%)				
			Y	Ç	S	T	K
1	1222	1-Dodesen					3.2
2	1418	1-Tetradesen					2.2
3	1791	Metil dodekanoat (=M. laurat)	0.7	0.6			3.1
4	1998	Metil tetradekanoat (=M. miristat)	2.8	1.7			3.8
5	2099	Metil pentadekanoat	0.3	0.5			

Çizelge 4.8. (Devam) *F. esculentum* Sumçanka Çeşidine Ait Sabit Yağ Kompozisyonu

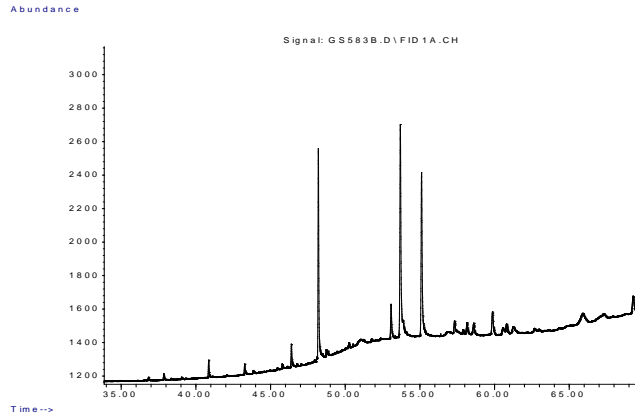
No	RRI	Bileşen	Sumçanka (%)				
			Y	Ç	S	T	K
6	2126	Metil nonanedioik asit	0.8		2.4		
7	2138	Metil pentadesenoat		0.2			
8	2143	Dimetil azelat		0.3			
9	2226	Metil palmitat	21.9	22.3	55.0	14.8	38.2
10	2235	Metil palmitoleat	0.4	0.3			
11	2236	Metil (<i>Z</i>)-7-hekzadesenoat	0.4				
12	2260	Metil (<i>E</i>)-3-hekzadekanoat	1.4	0.5			
13	2273	Palmitoleik asit		0.1			
14	2300	Trikosan		0.1			
15	2339	Metil heptadekanoat		0.5			
16	2431	Metil oktadekanoat	3.7	7.1	8.4	1.7	7.9
17	2438	Metil elaidat	3.3	0.3	7.3	36.5	
18	2441	Metil oleat	0.6	4.1		2.5	
19	2445	Metil (<i>Z</i>)-7-oktadesenoat		0.4			22.3
20	2482	Metil (<i>Z</i>)-7-hekzadesenoat		0.4			
21	2500	Pentakosan		0.4			
22	2509	Metil linoleat	15.5	23.6	26.9	32.6	19.2
23	2583	Metil linolenat	38.7	12.8		1.8	
24	2588	Dimetil oktadekadienoat				2.4	
25	2595	10- <i>trans</i> , 12- <i>cis</i> -oktadekadienoat				4.5	
26	2621	Metil araşidat	1.3	4.9		1.3	
27	2634	Metil 9,12,15-Oktadekatrienoat	3.8				
28	2641	Metil 11-eikosenoat				2.4	
29	2700	Heptakosan		1.5			
30	2806	Metil behenat (=Metil dokosanoat)		5			
31	2819	Metil behenat (=Metil dokosanoat)				1.4	
32	2900	Nonakosan		4.2			
33	2905	Metil trikosanoat		0.8			
34	2931	Hekzadekanoik asit (=Palmitik asit)		0.7			
35	2961	Triakontan		1.4			
36	3010	Metil tetrakosanoat		5.3			
TOPLAM:			95.6	99.9	99.9	99.9	99.9



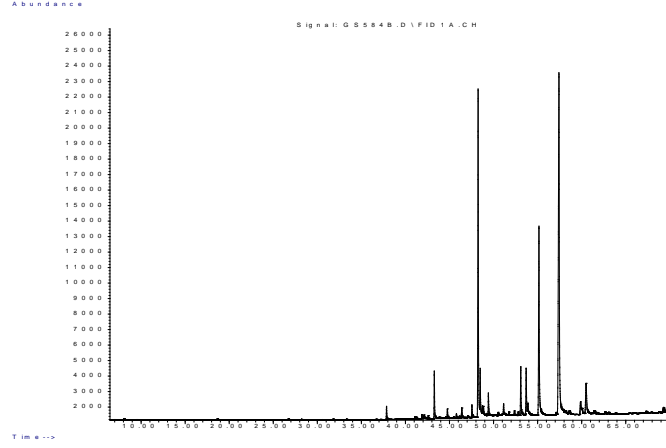
Şekil 4.17. Güneş Çeşidi Çiçekte Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı



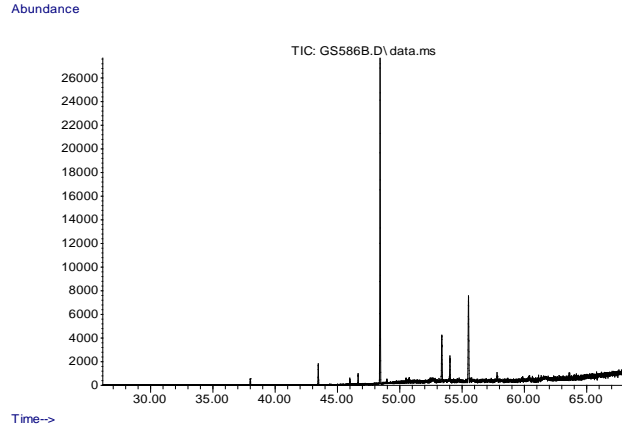
Şekil 4.18. Güneş Çeşidi Tohumda Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı



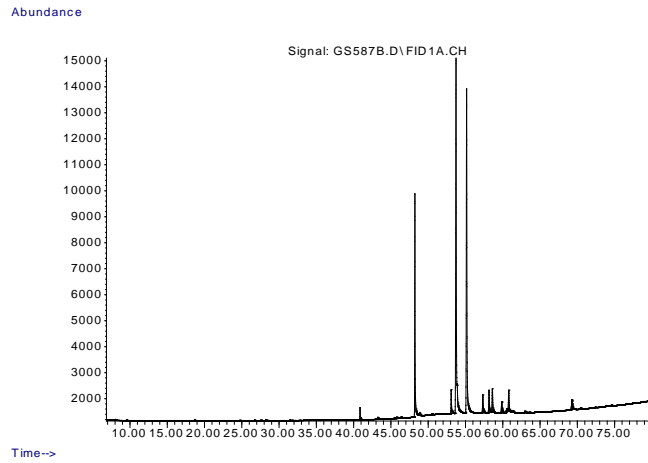
Şekil 4.19. Güneş Çeşidi Kavuzda Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı



Şekil 4.20. *Sumçanka Çeşidi Yaprak Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı*



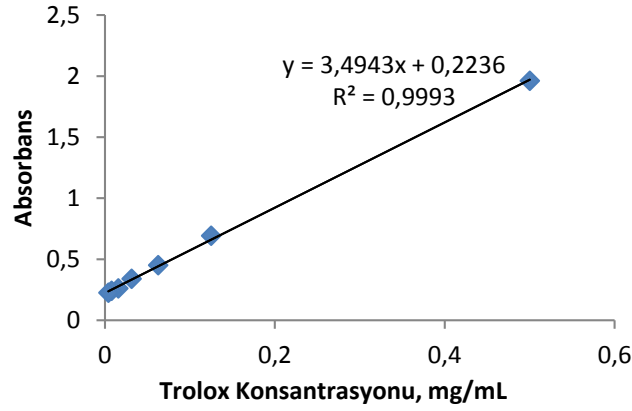
Şekil 4.21. *Sumçanka Çeşidi Sap Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı*



Şekil 4.22. *Sumçanka Çeşidi Tohum Sabit Yağ Asitleri Metil Ester Kromatogramı*

4.3.2. İndirgeme gücü aktivite sonuçları

F. esculentum'un Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin uçucu yağ ve ekstralarının demirin Fe⁺³(ferric) formunu Fe⁺²(ferrous) formuna indirgeme kapasitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Trolox için elde edilen kalibrasyon eğrisi, denklem ve R² değerleri Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Trolox Kalibrasyon Eğrisi

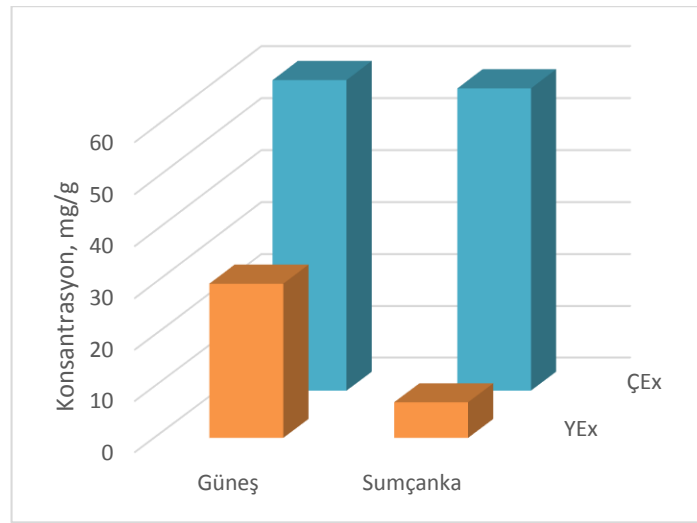
F. esculentum uçucu yağ ve ekstralarının gösterdiği indirgeme gücü aktivite değerleri Trolox'a eşdeğer olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. *F. esculentum* Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin İndirgeme Kapasitesi

	Güneş					Sumçanka				
	Uçucu Yağlar			Ekstreler		Uçucu Yağlar			Ekstreler	
Bitki Kısım	Y	Ç	S	Y	Ç	Y	Ç	S	Y	Ç
İG (mg/mL)	0.035	0.036	0.032	0.205	0.434	0.044	0.026	0.024	0.163	0.639
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SS	0.001	0.002	0.001	0.038	0.055	0.001	0.007	0.004	0.003	0.022
BHT	0.763± 0.023									
Ask. As.	0.152± 0.002									
Ç: Çiçek, S: Sap, Y: Yaprak, İG: İndirgeme Gücü, SS: Standart Sapma										

4.5. Toplam Fenol Miktarı

F. esculentum yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen metanollü ekstrelerde toplam fenol miktarı ölçüldü. Bu amaçla elektron transferine dayanan ve Folin-Ciocalteu reaktifiyle yapılan spektrofotometrik metod kullanıldı. Sonuçlar gallik asite eşdeğer olarak hesaplanıp Çizelge 4.12’de rapor edildi. Şekil 4.23’te görüldüğü gibi çiçek ekstrelerinde daha yüksek gallik aside eşdeğer fenol miktarı bulunmaktadır.



Şekil 4.25. *F. esculentum* Çiçek ve Yaprak Ekstrelerinde Toplam Fenol Miktarlarının Karşılaştırılması. YEx: Yaprak Ekstresi; ÇEx: Çiçek Ekstresi.

Çizelge 4.11. *F. esculentum* Ekstrelerinin Toplam Fenol Miktarı

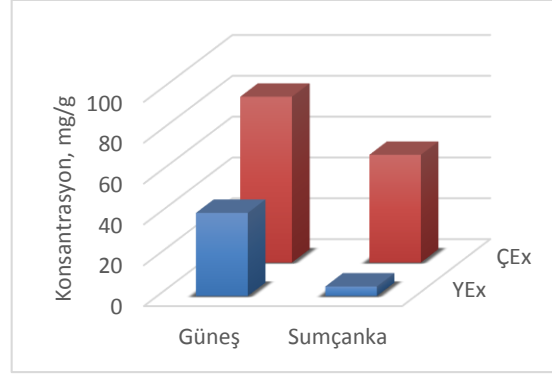
Bitki Kısmı	Güneş		Sumçanka	
	Y	Ç	Y	Ç
Fenol Miktarı*	29.98	59.92	6.95	62.98
	±	±	±	±
SS	1.38	1.29	1.91	2.16

*: mg/g Cinsinden Gallik Asite Eşdeğer
Ç: Çiçek, Y: Yaprak, SS: Standart Sapma

4.6. Toplam Flavonoit Miktarı

F. esculentum yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilen metanollü ekstrelerde toplam flavonoit miktarı ölçüldü. Bu amaçla $AlCl_3$ ile ekstrelerin oluşturduğu kompleksin rengi spektrofotometrik olarak ölçüldü ve sonuçlar rutine eşdeğer olarak hesaplanarak Çizelge 4.12’de rapor edildi. Şekil 4.24’de

çiçek ekstralarında daha yüksek miktarda rutine eşdeğer flavanoit miktarı olduğu ortaya konmuştur.



Şekil 4.26. *F. esculentum* Çiçek ve Yaprak Ekstrelerinde Toplam Flavanoit Miktarlarının Karşılaştırılması. YEx: Yaprak Ekstresi; ÇEx: Çiçek Ekstresi.

Çizelge 4.12. *F. esculentum* Ekstrelerinin Toplam Flavanoit Miktarı

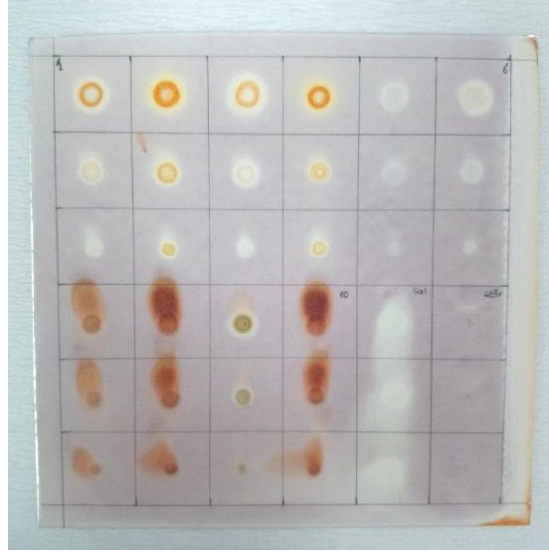
Bitki Kısım	Güneş		Sumçanka	
	Y	Ç	Y	Ç
Flav. Mik.*	40.71	81.23	4.66	52.75
	±	±	±	±
SS	1.80	3.03	0.20	3.09

*: mg/g Cinsinden Rutine Eşdeğer
Ç: Çiçek, Y: Yaprak, SS: Standart Sapma

4.7. Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

4.7.1. İTK-Otografi metodu

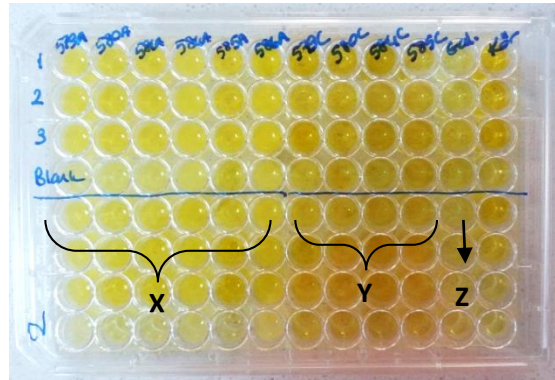
F. esculentum çeşitlerinin uçucu yağları ve ekstralarının asetilkolinesteraz (AChE) enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini nitel olarak değerlendirmek amacıyla İTK-Otografi metodu kullanılmıştır. Bu işlemde İTK plağına “dot-blot” (nokta şeklinde çeşitli konsantrasyonlarda numunelerin plağa emdirilmesi) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Silicagel F₂₅₄ İTK plağı (10×10 cm) üzerine 1.0×1.0 cm ebatlarında alanlar çizilerek her kutucuğun içine numune çözeltisi damlatıldı. Lekeler kuruduktan sonra plak üzerine reaktifler uygulandı (Şekil 4.25).



Şekil 4.27. *F. esculentum* Uçucu Yağ ve Ekstreleri İçin İTK-Otografi Uygulama Sonuçları

4.7.2. Ellman Metodu

İTK- Otografi yöntemiyle aktivite gösterdiği uçucu yağ ve ekstrelerin inhibisyon etkileri Ellman yöntemi ile kantitatif değerlendirmeye tabi tutuldu. Enzim inhibisyonu sonucunda mikrotiter plak kuyucuklarındaki renk değişimi Şekil 4.26'da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. *F. esculentum* Bitkisinin Uçucu Yağ ve Ekstrelerin Etkisi ile AChE İnhibisyonu **X:** Uçucu Yağlar, **Y:** Eksteler ve **Z:** Galantamin (standart inhibitör).

Çizelge 4.13. *F. esculentum* Çeşitlerine Ait Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin AChE İnhibisyonunun Ellman Metoduna Göre Kantitatif Sonuçları

	Güneş					Sumçanka					Standart
	Uçucu Yağlar			Ekstreler		Uçucu Yağlar			Ekstreler		G
Bitki Kısmı	Y	Ç	S	Y	Ç	Y	Ç	S	Y	Ç	
İnh.%	63.9	47.4	50.2	10.5	42.8	65.8	4.8	56.0	4.5	57.5	94.1
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SS	3.5	3.8	3.3	2.4	3.2	4.1	5.3	3.6	2.8	2.8	1.7

İnh: İnhibisyon, SS: Standart Sapma, Ç: Çiçek, G: Galantamin, S: Sap, Y: Yaprak.

5. TARTIŞMA

Proje kapsamında *Fagopyrum esculentum* bitkisinin tescillenmiş iki çeşidinin (Güneş ve Sumçanka) tohumları temin edilerek Eskişehir-Kütahya geçit iklimi koşullarında yetiştirildi. Yetiştirme süreci kapsamında bitkinin uçucu bileşenleri hem canlı bitki üzerinde tarla şartlarında hem de toplanmış kısımlarından laboratuvar şartlarında incelemeye tabi tutuldu. Tarla şartlarında HS-SPME tekniği kullanıldı.

5.1. Hidrodistilasyon Yöntemi ile Elde Edilen Uçucu Bileşenler

Her bir çeşidin yaprak, çiçek, sap, tohum ve kavuz kısımlarının uçucu bileşenleri çeşitli metotlarla analiz edildi. Yaprak, çiçek ve sap kısımlarının uçucu yağının daha fazla olacağı düşünülerek bu kısımlar için hidrodistilasyon yöntemi tercih edildi. Bununla birlikte tohum ve kavuz kısımlarının taşıdığı uçucu bileşenleri MSD-SPME tekniği ile elde edilip incelendi.

Konvansiyonel hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen yağ verimleri kıyaslandığı zaman Sumçanka çeşidinin çiçek kısımlarının en yüksek (%0,065) yağ verimine sahip olduğu tespit edildi. Güneş çeşidinin çiçeklerinde ise en düşük (%0,022) yağ verimi saptandı. Yaprak hidrodistilasyonu sonucunda her iki çeşitten elde edilen uçucu yağların %97'sini oluşturan 27-29 madde tespit edildi. Çiçek hidrodistilasyonu sonucunda her iki çeşitten elde edilen uçucu yağların %97-99,9'sini oluşturan 20-23 madde tespit edildi. Sap kısmında 18-20 tane madde yağların %99'unu oluşturmuştur. Tüm uçucu yağların ortak özelliği hegzadekanoik asidin (%32.7-83.6) yağların profilinde dominant olmasıdır. Bununla birlikte dodekanoik ve tetradekanoik asitler tüm yağlarda tespit edildi. Seskiterpen grubundan hegzahidrofarnesil aseton tüm yağlarda saptanırken *trans*-Kalamenen sadece Güneş çeşidinin yaprak yağında (%8.31) saptandı. Yaprak yağlarında farklı olarak yüksek miktarda (%16.7 ve %9.36) diterpenik bir bileşik olan fitole rastlandı. Sumçanka çiçeğinin diğer yağlardan farkı alkan serisi madde grubu açısından zengin (>%51) olmasıdır (Çizelge 4.2).

Daha önce yapılan çalışmalarda *F. esculentum*'un farklı çeşitleri ele alınmış olup uçucu bileşen profillerinde çoğunlukla alkan türevi maddelere rastlanmıştır [15, 43, 48, 60].

5.2. Tarla Şartlarında Gerçekleştirilen HS-SPME Çalışmaları

Canlı bitki üzerinde tarla şartlarında gerçekleştirilen HS-SPME çalışması sonucunda her iki çeşidin ürettiği uçucu bileşenler Small Activated Coconut Charcoal (20/40) üzerine trap edilerek elde edildi. Adsorban üzerine tutunan uçucu bileşenlerin hekzan ile elüe edilmesi ve GC-MS analizine tabi tutulması sonucunda uçucu bileşenlerin %98-99'unu oluşturan 12-20 tane bileşik karakterize edildi. Her iki çeşitte de ortak özellik olarak metil palmitatın yüksek miktarda (%13-15) olduğu görüldü. Güneş çeşidinin farklı olarak %63.4 oranında metil oleat içerdiği saptandı. Sumçanka çeşidi ise ana madde olarak %57.3 oranında metil elaidat taşımaktadır. Genel kromatografik profile bakıldığında Sumçanka çeşidinin daha kompleks uçucu bileşen kompozisyonuna sahip olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.4).

5.3. Laboratuvar Şartlarında Gerçekleştirilen MSD-SPME Çalışmaları

Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin tohumları olgunlaşma aşamasında toplanarak kurutuldu ve uçucu bileşenleri MSD-SPME tekniği ile analize tabi tutuldu. Bu amaçla kavuz ve tohum ayrımı özel bir düzenekte gerçekleştirildi (Şekil). MSD-SPME yönteminin şartları (numune miktarı, ekstraksiyon süresi) ön laboratuvar çalışmalarında optimize edildi. Daha sonra tüm numuneler bu şartlarda analiz edildi. Gaz kromatografik analiz sonuçları Çizelge 4.3'te toplu halde gösterilmektedir. Her iki çeşidin tohum ve kavuz kısımlarında yüksek miktarda (%33-93) hegzadekanoik asit ortak ana madde olarak tespit edildi. Bunu takip eden tetradekanoik asit (%6.1-8.9) ikinci ana madde olarak saptandı. Ayrıca Sumçanka çeşidinin kavuzunda yüksek miktarda (%14.2) hekzenil salisilata rastlandı. Kavuz kısmında bulunan uçucu bileşenlerin profilinin (17-18 bileşik) tohuma nazaran (5-7 bileşik) daha kompleks olduğu fark edildi.

5.4. Sabit Yağ Asitleri Üzerinde Çalışmalar

Güneş ve Sumçanka çeşitlerinin farklı kısımları için (yaprak, çiçek, sap, tohum ve kavuz) sıvı- sıvı ekstraksiyon yöntemine dayanan Folch metodu uygulandı. Yağ asitlerinin metil esterleri daha uçucu olduğu için GS-MS ve GC/FID analizine tabi tutuldu.

Güneş çeşidine ait sabit yağ asitleri analiz sonuçları Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. Toplam 24 adet madde aydınlatıldı. Bu çeşide ait bitki kısımlarının hepsinde (yaprak, çiçek, sap, tohum ve kavuz) ortak olan maddelerin metil palmitat ve metil linoleat olduğu görülmektedir. Metil palmitat en yoğun olarak sap kısmında (%52.1) dikkat çekerken, hem sap kısmının hem de çiçek (%22) kısmının ana maddesi olduğu görülmektedir. Metil linoleat'ın ise en fazla miktarda tohum kısmında (%34.5) olduğu görülmektedir. Tohum ve kavuzda ortak ana madde (%37-40) metil oktadesenoat olarak tespit edildi. Kavuz kısmı yağ asitler açısından çok zayıf olarak bulundu. Yalnızca 4 maddeyle temsil edilmesiyle dikkat çekmiştir. Ayrıca, yaprak kısmında metil linolenat (%45.9) en yüksek yüzdeyi gösterdi.

Sumçanka çeşidinin sabit yağ asitlerinin GC/MS ve GC-FID sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 4.8) toplam 36 madde aydınlatıldı. Her bir kısımdaki (yaprak, çiçek, sap, tohum ve kavuz) ortak maddelerin de Güneş çeşidindeki gibi metil palmitat ve metil linoleat olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak metil oktadekanoat'ın da az miktarlarda (sırasıyla %3.7, 7.1, 8.4, 1.7, 7.9) ortak olduğu görülmektedir. Bu çeşidin sap kısmında da Güneş çeşidinde olduğu gibi metil palmitat (%55) yüksek oranda bulunmuştur. Kavuzun (%38.2) da ana maddesi olarak saptandı. Yaprak kısmında metil linolenat (%38.7) ve tohum kısmında metil elaidatın (%36.5) ana madde olması diğerlerinden farklılık göstermiştir.

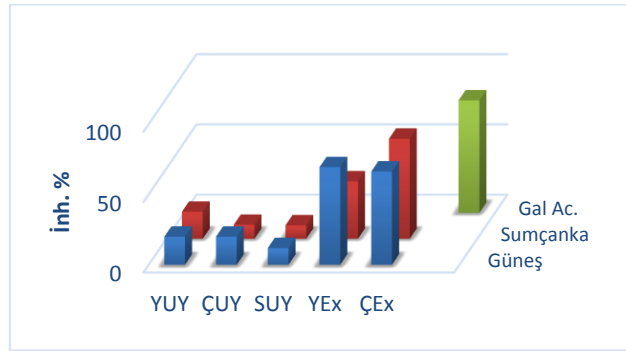
5.5. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Proje kapsamında *F. esculentum* iki çeşidinin uçucu yağ ve ekstrelerinin oksidatif bozukluk ve nörodejeneratif prosesler üzerine gösterdiği etki araştırıldı. Bu amaçla uçucu yağ ve ekstrelerin iki farklı sistemde antioksidan potansiyelleri ve antikolinesteraz potansiyelleri *in vitro* şartlarda değerlendirildi.

5.5.1. Antioksidan aktivite çalışmaları

Araştırma konusu olan *F. esculentum* uçucu yağ ve ekstralarının antioksidan aktivitesi değerlendirildi. Bu amaçla elektron transferine dayalı test sistemleri kullanıldı: DPPH ve FRAP.

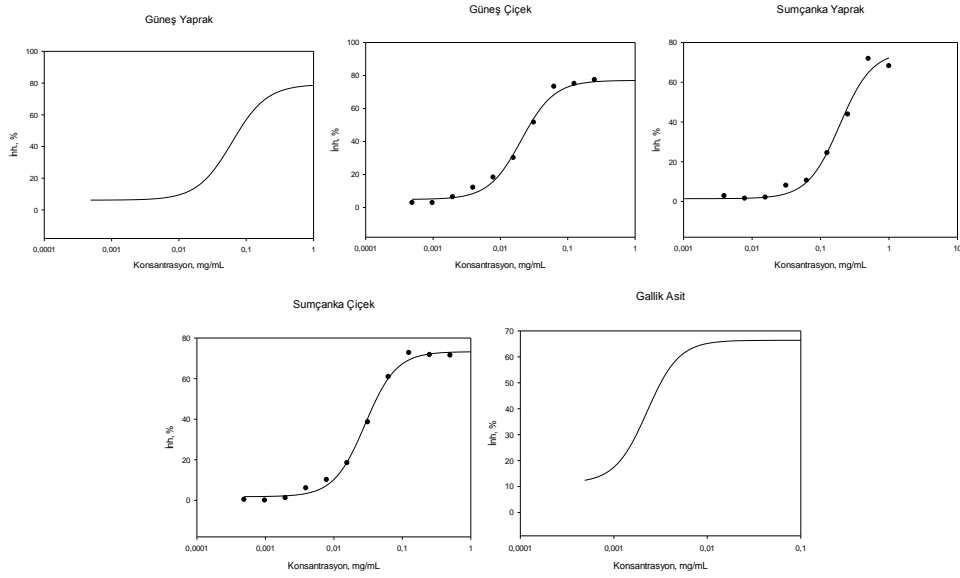
Bu sistemlerin temeli elektron transferine dayalıdır [131]. Stabil serbest radikal olan DPPH antioksidan etkili madde ile tepkimeye girerek kompleks oluşturur ve rengi mordan sarıya döner. Proje kapsamında test edilen uçucu yağ ve ekstralar belli bir konsantrasyonda uygulanarak mikropalak titer tekniğiyle deneye tabi tutuldu. Numunelerin yüzde inhibisyon değerleri standart antioksidan madde olan gallik asitin değerleriyle kıyaslandı. İnhibisyon değerleri %50'den büyük olan numuneler için IC₅₀ değerleri *SigmaPlot* 12.0 programı ile hesaplandı (Şekil 5.2). Çizelge 4.9'da numunelerin ve standart maddenin kantitatif aktiviteleri karşılaştırmalı olarak özetlendi.



Şekil 5.1. Güneş ve Sumçanka Çeşitlerine Ait DPPH Radikalini Süpürme Etkisi. YUY: Yaprak Uçucu Yağı, ÇUY: Çiçek Uçucu Yağı, SUY: Sap Uçucu Yağı, YEx: Yaprak Ekstresi, ÇEx: Çiçek Ekstresi, Gal.Ac.; Gallik Asit.

Her iki çeşide ait yaprak, çiçek ve sap uçucu yağlarının 2,5 mg/ml'lik konsantrasyonlarında DPPH radikalini inhibe etme yüzdeleri 9.56-19.95 arasında değişmektedir. Buna karşın yaprak ve çiçekten elde edilen ekstraların serbest radikal süpürme etkileri daha yüksek olup hesaplanan IC₅₀ değerleri 0,019-0,173 mg/mL arasında bulundu. Bununla birlikte her iki çeşidin çiçek

ekstreleri standart antioksidan madde kadar inhibisyon değerlerine sahip olduğu saptandı.



Şekil 5.2. *F. esculentum* Ekstrelerinin IC_{50} Değerlerinin Hesaplanmasında Kullanılan Grafikler

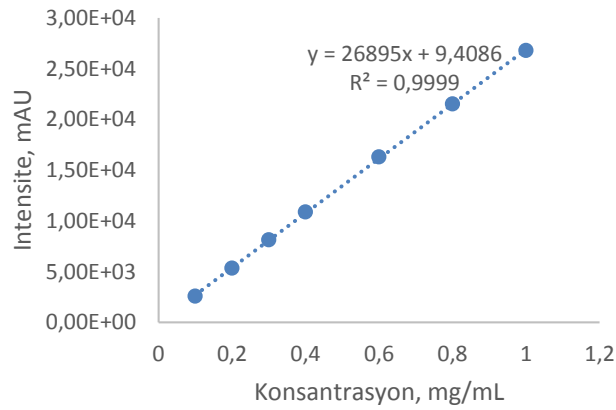
F. esculentum uçucu yağ ve ekstrelerinin demirin Fe^{+3} (ferric) formunu Fe^{+2} (ferrous) formuna indirgeme kapasitesi Trolox (Suda çözünen vitamin E)'a eşdeğer olarak hesaplandı. Numunelere ait redükleme değerleri Çizelge 4.11'de özetlendi.

Her iki çeşide ait uçucu yağların demir redükleme kapasite değerleri (0.024-0.044) arasında değiştiği saptandı. Bunun yanında ekstrelerine ait redükleme kapasite değerlerin belirgin derecede (0.163-0.639 arası) yüksek olduğu tespit edildi. En yüksek redükleme etkisini Sumçanka çiçek ekstresi (0.639) gösterirken, en düşük aktivite değerini Sumçanka çeşidinin saplarına ait uçucu yağ (0.024) gösterdi.

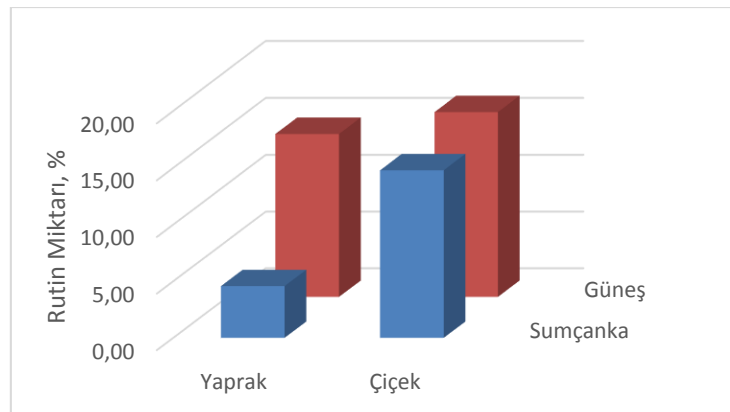
Antioksidan aktivite ölçümü farklı sistemler içerisinde gerçekleştirilerek, tüm ekstrelerin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği görüldü. Radikal süpürme ve demir indirgeme gücü yoluyla elde edilen veriler ile toplam fenol, flavonoid miktarları ve LC-MS analizi birbirleriyle tutarlı sonuçlar vermektedir. Tüm analiz sonuçları anlamlı bir hale getirildiğinde her iki çeşidin çiçek ekstrelerindeki

antioksidan madde miktarının yüksek olduğu ancak, Sumçanka çeşidinin yaprak ekstresindeki antioksidan madde miktarının ise en düşük değere sahip olduğu belirlenmiştir.

Sıvı kromatografisi sonuçları da ekstrenin ana bileşiğinin rutin (%4.5-16.8) olduğunu göstermiştir. Rutin'in kalibrasyon eğrisi Şekil 5.3'te gösterilmektedir. LC-MS-MS analiz sonuçlarını göz önünde bulundurduğumuzda ekstrelerin antioksidan bileşikler açısından zengin olduğu ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.5). Daha önce yayınlanmış çalışmalarda rutin ve türevlerinin antioksidan etkileri rapor edilmiştir [46, 53, 79, 81, 84, 132].



Şekil 5.3. Rutin'in Kalibrasyon Eğrisi



Şekil 5.4. Ekstrelerin İçerdiği Rutin Miktarlarının Karşılaştırılması

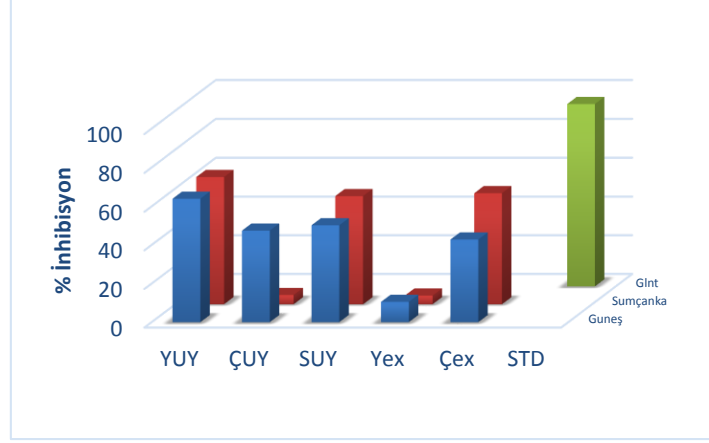
5.5.2. Antikolinesteraz enzim çalışmaları

Demans, günlük yaşam işlevlerinin sürdürülmesini engelleyen ilerleyici bir beyin hastalığı olup, bellek kaybı, günlük yaşamın gereksinimlerini yerine getirmede zorlanma; algılamada, toplumsal davranışların düzenlenmesinde ve duygusal tepkilerin kontrolünde bozulma belirtileriyle tanımlanmaktadır. Alzheimer hastalığı demansın en sık görülen türüdür. Günümüzde Alzheimer hastalığı yaşlı nüfusun arasında önemli derecede yaygın hale gelmiştir.

Bu hastalığın tedavisinde antikolinesteraz etkili bileşikler ilk seçenektir. Günümüzde doğal kaynaklardan elde edilen, ucuz, güvenilir ve kolay ulaşılabilir antikolinesteraz inhibitörlere olan talep hızla artmaktadır. Bu doğrultuda çeşitli bitkilerden elde edilen ürünler (uçucu yağ, ekstre, saf madde) üzerinde *in vitro* ve *in vivo* şartlarda AChE ve BuChE enzimlerinin inhibisyonu araştırılmaktadır.

Proje kapsamında *F. esculentum* uçucu yağ ve ekstralarının ticari olarak satılan elektrikli yılanbalığı (*Electrophorus electricus*) AChE'ı kullanarak AChE inhibisyon kapasitesi tayin edildi. Araştırmanın ilk basamağında tüm numuneler üzerinde dot-blot tekniği kullanılarak genel tarama gerçekleştirildi. İTK-Otografi metodu sayesinde tüm numunelerin eş zamanlı olarak enzim üzerindeki etkisi test edildi. İTK plağı üzerinde görsel olarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda numunelerin aktivitesi olup olmadığı tespit edildi. Bir sonraki aşamada tüm aktif olan numunelerin niceliksel değerleri Ellman metoduyla saptandı. Numunelerin enzim üzerinde gösterdiği etkiler Çizelge 4.13'te özetlendi.

Test edilen numunelerin arasında yaprak uçucu yağları en etkin (%İnh. 63.9-65.8) şekilde AChE enzmini inhibe etti. Bunları takip eden sap uçucu yağları da kayda değer (%İnh. 50.2-56) inhibisyon etkisine sahip olduğu tespit edildi. Her iki çeşide ait yaprak ekstralarının AChE aktivitesinde %10'dan fazla inhibisyona neden olmadığı görüldü. Elde edilen sonuçlara göre galantaminle karşılaştırıldığında en yüksek aktiviteyi (65,8) Sumçanka yapraklarına ait uçucu yağ göstermiştir. Buna karşın en düşük aktiviteyi (4.5) de yine Sumçanka yaprağına ait ekstre göstermiştir. Şekil 5.5'te test edilen numunelerin AChE inhibisyon değerleri karşılaştırılması sunulmuştur.



Şekil 5.5. *F. esculentum* Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Ellman Metodunda AChE İnhibisyonlarının Karşılaştırılması. YUY: Yaprak Uçucu Yağı, ÇUY: Çiçek Uçucu Yağı, SUY: Sap Uçucu Yağı, YEx: Yaprak Ekstresi, ÇEx: Çiçek Ekstresi, GInt: Galantamin.

Daha önce, Polonya menşeli *F. esculentum* tohumu Türkiye’de yetiştirilerek etil asetatlı ekstresinin nöroprotektif etkisi araştırılmış ve BuChE (Bütiril kolin esteraz) enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir [46].

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada *Fagopyrum esculentum* bitkisinin Türkiye’de geliştirilen Güneş çeşidi ve Kazakistan’da kültürü yapılan Sumçanka çeşidi Eskişehir-Kütahya geçit kuşağında yetiştirilip farklı kısımlarından uçucu yağ, sabit yağ asitleri ve ekstreler elde edildi. Bitkinin çiçeklenme-meyvelenme döneminde her iki çeşidin uçucu bileşenleri tarla şartlarında HS-SPME tekniğiyle ekstre edilerek araştırıldı. Çeşitlerin uçucu bileşik profilinde ortak olarak metil palmitat yüksek miktarda saptanırken, Güneş çeşidinin metil oleat, Sumçanka çeşidinin ise metil elaidat açısından zengin olduğu tespit edildi.

Laboratuvar şartlarında bitkinin uçucu yağ ve sabit yağ asitlerinin kompozisyonları gaz kromatografik tekniklerle aydınlatıldı. Tohum ve kavuz kısımlarının taşıdığı uçucu bileşikler MSD-SPME tekniğiyle incelendi. Analiz sonucunda bu kısımların hegzadekanoik asit ve tetradekanoik asit bakımından zengin olduğu belirlendi.

Karabuğday uçucu yağ ve ekstrelerinin antioksidan aktivitesi, serbest radikal DPPH ve demir redükleme gücüne göre değerlendirildi. Karşılaştırmalı analiz sonucunda uçucu yağların %19’dan fazla inhibisyon göstermediği, ekstrelerin ise önemli ölçüde inhibisyon potansiyelinin olduğu tespit edildi.

Uçucu yağ ve ekstrelerin nöroprotektif özellikleri AChE enzimini inhibe etme potansiyeline göre değerlendirildi. Yaprak ve sap uçucu yağlarının önemli derecede inhibisyon etkisine sahip (sırasıyla, >%65, %56) olduğu saptandı. Ancak, uçucu yağların ise AChE üzerinde zayıf bir etkiye sahip olduğu görüldü.

F. esculentum uçucu yağlarının düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu göze çarparken AChE enzimini inhibe etmeleri, bitkinin nöronları koruyucu bir etkisi olduğunu ortaya koyarak konuyla ilgili yapılacak ileri düzey araştırmalara ışık tutmaktadır. Farklı polaritedeki çözücülerle elde edilen ekstrelerin AChE üzerindeki aktivitesinin araştırılması bu anlamda önem arz etmektedir.

Bu proje kapsamında Türkiye’de tescillenmiş Güneş çeşidi ve Kazakistan’da tescillenmiş Sumçanka çeşidinin yan ürünleri (çiçek, yaprak, sap

ve kavuz) kimyasal ve biyolojik aktivite bakımından ele alınarak bitkinin katma değerinin arttırılması hedeflenmiştir. Yapılan araştırma sonucunda tescillenmiş çeşitlerin belirtilen katma değerlere sahip olduğu görülmüştür.

KAYNAKÇA

- [1] Balunas, M.J. ve Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* 78 (5), 431-441.
- [2] Engin, B., Erkan, E., Çelik, U., Kutlubay, Z. ve Serdaroğlu, S. (2016). Dermatolojide gıda takviyesinin önemi. *Dermatoz.* 2, 1-14.
- [3] Chiu, T.-M., Huang, C.-C., Lin, T.-J., Fang, J.-Y., Wu, N.-L. ve Hung, C.-F. (2009). In vitro and in vivo anti-photoaging effects of an isoflavone extract from soybean cake. *J. Ethnopharmacol.* 126 (1), 108-113.
- [4] Draelos, Z.D. (2010). Nutrition and enhancing youthful-appearing skin. *Clinics in Dermat.* 28 (4), 400-408.
- [5] Lu, R. ve Serrero, G. (1999). Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J. Cel. Physio.* 179 (3), 297-304.
- [6] Yılmaz, B. ve Usta, C. (2011). Nar'ın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi.* 14 (3), 146-153.
- [7] Ahmed, A., Khalid, N., Ahmad, A., Abbasi, N.A., Latif, M.S.Z. ve Randhawa, M.A. (2014). Phytochemicals and biofunctional properties of buckwheat: a review. *J. Agric. Sci.* 152 (3), 349-369.
- [8] Petr, J., Kalinova, J., Moudry, J. ve Michalova, A. (2004). Historical and current status of buckwheat culture and use in the Czech Republic. *Proceeding 9th International Symposium on Buckwheat.* Prague. V.D. Iva Faberová, Petra Čepková, Ivan Hon, Vojtěch Holubec, Zdeněk Stehno (Eds).
- [9] Barcaccia, G., Volpato, M., Gentili, R., Abeli, T., Galla, G., Orsenigo, S., Citterio, S., Sgorbati, S. ve Rossi, G. (2016). Genetic identity of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) landraces locally cultivated in the Alps. *Genet. Resour. Crop Ev.* 63, 639–651.
- [10] Wijngaard, H.H. ve Arendt, E.K. (2006). Buckwheat. *Cereal Chem.* 83 (4), 391-401.
- [11] Mazza, G. (1988). Lipid content and fatty acid composition of buckwheat seed. *Cereal Chem.* 65 (2), 122-126.

- [12] Sindhu, R. ve Khatkar, B.S. (2016). Composition and functional properties of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) flour and starch. *Int. J. Innov. Res. Advanc. Studies.* 3 (7), 154-159.
- [13] Acar, R., Arslan, D. ve Günes, A. (2011). Effect of plant parts and harvest period on rutin, quercetin, total phenol contents and antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Asian J. Chem.* 23 (7), 3240.
- [14] <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Erişim tarihi: 25.05.2016).
- [15] Kim, S.J., Rahman, M.M., Lee, M.K., Seo, J.M., Arasu, M.V., Suzuki, T., Al-Dhabi, N.A., Yoon, Y.H. ve Shim, J.H. (2014). Identification and quantification of volatile and phenolic compounds composition in buckwheat sprouts by GC/MS and HPLC. *Asian J. Chem.* 26 (3), 777-782.
- [16] Özkaya, B. (1999). Tahılların neden olduğu alerjiler ve önemi. *Food Hi-Tech. Mar.*, 82-88.
- [17] <http://www.colyak.org.tr/sayfa.asp?Sayfa=Kategori&Bolum=5>. (Erişim tarihi: 05.05.2017).
- [18] Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J. ve De Kimpe, N. (2004). Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *J. Ethnopharmacol.* 92 (1), 1-21.
- [19] Kreft, S., Knapp, M. ve Kreft, I. (1999). Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *J. Agr. Food Chem.* 47 (11), 4649-4652.
- [20] Munro, M.C., Newell, R.E. ve Hill, N.M. (2014). 3-71 Polygonaceae, knotweed family. Nova Scotia Plants. Nova Scotia Museum. İskoçya. 733-734.
- [21] Watanabe, M. (1998). Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agr. Food Chem.* 46 (3), 839-845.
- [22] Sanchez, A., Schuster, T.M., Burke, J.M. ve Kron, K.A. (2011). Taxonomy of Polygonoideae (Polygonaceae): A new tribal classification. *Taxon.* 60 (1), 151-160.
- [23] Emen, S., Çeken, B., Altaş, S., Pirinçcioğlu, M. ve Kızıl, M. (2010). Rheum ribes bitkisinin su ekstraktının antioksidant ve DNA'yı serbest radikallerden koruma etkisinin araştırılması. *Proceeding 24. Ulusal Kimya Kongresi.* Zonguldak.

- [24] Geven, F., Bingöl, Ü. ve Güney, K. (2008). ANK Herbarium'u Polygonaceae familyasının revizyonu ve veritabanının hazırlanması. *Kastamonu Üniv. J. Fores. Fac.* 8 (1), 67-85.
- [25] Graham, S.A. ve Wood Jr, C. (1965). The genera of Polygonaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor.* 46 (2), 91-121.
- [26] Ronse Decraene, L. ve Smets, E. (1991). The floral nectaries of polygonum sl and related genera (persicarieae and polygoneae)-position, morphological nature and semophyletic. *Flora.* 185 (3), 165-185.
- [27] Sangma, S.C. ve Chrungoo, N.K. (2010). Buckwheat gene pool: potentialities and drawbacks for use in crop improvement programmes. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 4 (SI1), 45-50.
- [28] Zhang, Z.L., Zhou, M.L., Tang, Y., Li, F.L., Tang, Y.X., Shao, J.R., Xue, W.T. ve Wu, Y.M. (2012). Bioactive compounds in functional buckwheat food. *Food. Res. Int.* 49 (1), 389-395.
- [29] Anjen, L., Bojian, B., Grabovskaya-Borodina, A.E., Hong, S., McNeill, J., Mosyakin, J., Mosyakin, S.L., Ohba, H. ve Park, C. (2003). Polygonaceae. *Flora of China.* 277-350.
- [30] Ohnishi, O. (1991). Discovery of the wild ancestor of common buckwheat. *Fagopyrum.* 11, 5-10.
- [31] Li, Q. ve Yang, M. (1992). Preliminary investigation on buckwheat origin in Yunnan, China, *Proc. 5th. Intl. Symp. Buckwheat.* R. Lin, vd., 44-46.
- [32] Chen, Q.F. (1999). A study of resources of *Fagopyrum* (Polygonaceae) native to China. *Bot. J. Linn. Soc.* 130 (1), 53-64.
- [33] Joshi, B.D. ve Paroda, R.S. (1991). Buckwheat in India.
- [34] Ladefoged, K. (1952). The periodicity of wood formation. *Biologiske Skrifter, Kgl. Dansk Videnskabernes Selskab, Kobenhavn.* 7 (3).
- [35] Yıldız, G. ve Bilgiçli, N. (2012). Effects of whole buckwheat flour on physical, chemical, and sensory properties of flat bread, lavaş. *Czech J. Food Sci.* 30 (6), 534-540.
- [36] Levent, H. ve Bilgiçli, N. (2012). Evaluation of physical, chemical and sensory properties of Turkish flat breads (bazlama and yufka) supplemented with lupin, buckwheat and oat flours. *Int. J. Food Sci. Nutr. Eng.* 2 (5), 89-95.

- [37] Eggum, B.O., Kreft, I. ve Javornik, B. (1980). Chemical-Composition and Protein-Quality of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Qual. Plant.* 30 (3-4), 175-179.
- [38] Bonafaccia, G., Marocchini, M. ve Kreft, I. (2003). Composition and technological properties of the flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chem.* 80 (1), 9-15.
- [39] Bonafaccia, G., Gambelli, L., Fabjan, N. ve Kreft, I. (2003). Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chem.* 83 (1), 1-5.
- [40] <https://apps.webofknowledge.com/>. (Erişim tarihi: 17.05.2017).
- [41] https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=Q1aaFSHhO2fhOqKXYk3&page=1&cr_pqid=21&viewType=summary&colName=WOS. (Erişim tarihi: 18.05.2017).
- [42] Hori, M., Ohuchi, K. ve Matsuda, K. (2006). Role of host plant volatile in the host-finding behavior of the strawberry leaf beetle, *Galerucella vittaticollis* Baly (Coleoptera : Chrysomelidae). *Appl. Entomol. Zool.* 41 (2), 357-363.
- [43] Janes, D., Kantar, D., Kreft, S. ve Prosen, H. (2009). Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS. *Food Chem.* 112 (1), 120-124.
- [44] Kalinova, J., Triska, J. ve Vrchotova, N. (2011). Occurrence of eugenol, coniferyl alcohol and 3,4,5-trimethoxyphenol in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and their biological activity. *Acta Physiol. Plant.* 33 (5), 1679-1685.
- [45] Nikolic, N., Sakac, M. ve Mastilovic, J. (2011). Effect of buckwheat flour addition to wheat flour on acylglycerols and fatty acids composition and rheology properties. *Lwt-Food Sci. Technol.* 44 (3), 650-655.
- [46] Gulpinar, A.R., Orhan, I.E., Kan, A., Senol, F.S., Celik, S.A. ve Kartal, M. (2012). Estimation of in vitro neuroprotective properties and quantification of rutin and fatty acids in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Food Res. Int.* 46 (2), 536-543.
- [47] Leiber, F., Kunz, C. ve Kreuzer, M. (2012). Influence of different morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation in vitro. *Czech J. Anim. Sci.* 57 (1), 10-18.

- [48] Janes, D., Prosen, H., Kreft, I. ve Kreft, S. (2010). Aroma Compounds in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats, Flour, Bran, and Husk. *Cereal Chem.* 87 (2), 141-143.
- [49] Danila, A.M., Kotani, A., Hakamata, H. ve Kusu, F. (2007). Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agr. Food Chem.* 55 (4), 1139-1143.
- [50] Choi, S.M. ve Ma, C.Y. (2006). Extraction, purification and characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Food Res. Int.* 39 (9), 974-981.
- [51] Kalinova, J., Triska, J. ve Vrchotova, N. (2006). Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Agr. Food Chem.* 54 (15), 5330-5335.
- [52] Amézqueta, S., Galán, E., Fuguet, E., Carrascal, M., Abián, J. ve Torres, J.L. (2012). Determination of d-fagomine in buckwheat and mulberry by cation exchange HPLC/ESI-Q-MS. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* 402 (5), 1953-1960.
- [53] Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A. ve Briggs, C.J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Res. Int.* 40 (3), 356-364.
- [54] Fabjan, N., Rode, J., Kosir, I.J., Wang, Z.H., Zhang, Z. ve Kreft, I. (2003). Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *J. Agr. Food Chem.* 51 (22), 6452-6455.
- [55] Dorota, D.S. ve Wieslaw, O. (1999). Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. *J. Agr. Food Chem.* 47 (10), 4384-4387.
- [56] Watanabe, M., Ohshita, Y. ve Tsushida, T. (1997). Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. *J. Agr. Food Chem.* 45 (4), 1039-1044.
- [57] Obendorf, R.L., Steadman, K.J., Fuller, D.J., Horbowicz, M. ve Lewis, B.A. (2000). Molecular structure of fagopyritol Al (O- α -D-galactopyranosyl-(1 - 3)-D-chiro-inositol) by NMR. *Carbohydr. Res.* 328 (4), 623-627.
- [58] Steadman, K.J., Fuller, D.J. ve Obendorf, R.L. (2001). Purification and molecular structure of two digalactosyl D-chiro-inositols and two trigalactosyl D-chiro-inositols from buckwheat seeds. *Carbohydr. Res.* 331 (1), 19-25.

- [59] Zheng, F., Qing-Bao, S., Gen-Rong, Q., Pei-Long, S., Xiao-Yu, Z. ve Dan-Xia, C. (2004). GC/MS analysis of fatty acid in *Fagopyrum esculentum* seed oil. *Food Sci. Technol. Res.* 25, 267-269.
- [60] Zhou, Q., Wintersteen, C.L. ve Cadwallader, K.R. (2002). Identification and quantification of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey. *J. Agr. Food Chem.* 50 (7), 2016-2021.
- [61] Cho, J.Y., Moon, J.H., Kim, H.K., Ma, S.J., Kim, S.J., Jang, M.Y., Kawazoe, K., Takaishi, Y. ve Park, K.H. (2006). Isolation and structural elucidation of antimicrobial compounds from buckwheat hull. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16 (4), 538-542.
- [62] Vizireanu, C., Burluc, R.M., Daraba, A. ve Istrati, D. (2009). Research on the use of *Fagopyrum* sp. for culinary preparations. *Lucrări Științifice, Universitatea de Științe Agricole Și Medicină Veterinară " Ion Ionescu de la Brad" Iași, Seria Agronomie.* 52 (2), 109-116.
- [63] Association, B.H.M. (1990). British Herbal Pharmacopoeia, vol 1: *Fagopyrum*. *Biddles, Guildford.*
- [64] Pharmacopoeia, B.-B.H. (1990). Bournemouth: British Herbal Medicine Association. v. 1.
- [65] Compain, P. ve Martin, O.R. (2007). Iminosugars: from synthesis to therapeutic applications. John Wiley & Sons.
- [66] Pant, S., Samant, S.S. ve Arya, S.C. (2009). Diversity and indigenous household remedies of the inhabitants surrounding Mornaula reserve forest in West Himalaya. *Indian J. Tradition. Knowl.* 8 (4), 606-610.
- [67] Wajid, M., Aslam, M.S. ve Uzair, M. (2015). Genus *Fagopyrum*: Phytochemical and ethnopharmacological. *Indian Res. J. Pharm. Sci.* 4, 1-14.
- [68] Mehta, P., Negi, K. ve Ojha, S. (2010). Native plant genetic resources and traditional foods of Uttarakhand Himalaya for sustainable food security and livelihood. *Ind. J. Nat. Prod. Res.* 1 (1), 89-96.
- [69] Campbell, C.G. (1997). Buckwheat: *Fagopyrum esculentum* Moench. Bioversity International.
- [70] Sastri, B. (1956). The Wealth of India. A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products. Raw Materials. *The Wealth of India.* 4.
- [71] Joshi, B.D. (1999). Status of buckwheat in India. *Fagopyrum.* 16, 7-11.

- [72] Kreft, I., Fabjan, N. ve Yasumoto, K. (2006). Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chem.* 98 (3), 508-512.
- [73] Zielinska, D., Szawara-Nowak, D. ve Michalska, A. (2007). Antioxidant capacity of thermally-treated buckwheat. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 57 (4), 465-470.
- [74] Cheol-Ho, P., Kim, Y., Choi, Y., Heo, K. ve Kim, S. (2000). Rutin content in food products processed from groats, leaves, and flowers of buckwheat. *Fagopyrum.* 17, 63-66.
- [75] Decraene, L.P.R. ve Akeroyd, J.R. (1988). Generic limits in Polygonum and related genera (Polygonaceae) on the basis of floral characters. *Bot. J. Linn. Soc.* 98 (4), 321-371.
- [76] Ortiz-Díaz, J. (1994). Polygonaceae. *Etnoflora Yucatenense.* 10.
- [77] Uzun, A. ve Palabaş Uzun, S. (2011). Medicinal and aromatic plant taxa of Altındere Valley (Maçka/Trabzon). *Proceeding 2nd International Non-Wood Products Symposium.* Isparta/TURKEY: 8-10 September 2011. H. Fakir, vd. (Eds).
- [78] Tomotake, H., Yamamoto, N., Yanaka, N., Ohinata, H., Yamazaki, R., Kayashita, J. ve Kato, N. (2006). High protein buckwheat flour suppresses hypercholesterolemia in rats and gallstone formation in mice by hypercholesterolemic diet and body fat in rats because of its low protein digestibility. *Nutrition.* 22 (2), 166-173.
- [79] Hinneburg, I., Kempe, S., Ruttinger, H.H. ve Neubert, R.H.H. (2006). Antioxidant and photoprotective properties of an extract from buckwheat herb (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Pharmazie.* 61 (3), 237-240.
- [80] Curran, J.A., Stringer, D.A., Wright, B., Taylor, C.G.A., Przybylski, R. ve Zahradka, P. (2010). Biological response of hepatomas to an extract of *Fagopyrum esculentum* M. (Buckwheat) is not mediated by inositols or rutin. *J. Agr. Food Chem.* 58 (5), 3197-3204.
- [81] Orcic, D., Svircev, E., Mimica-Dukic, N., Beara, I., Balog, K., Franciskovic, M. ve Simin, N. (2012). Phenolic profile and antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb and root extracts. *Planta Med.* 78 (11), 1289-1289.
- [82] Vogrincic, M., Kreft, I., Filipic, M. ve Zegura, B. (2013). Antigenotoxic effect of tartary (*Fagopyrum tataricum*) and common (*Fagopyrum esculentum*) buckwheat flour. *J. Med. Food.* 16 (10), 944-952.

- [83] Kim, C.D., Lee, W.K., No, K.O., Park, S.K., Lee, M.H., Lim, S.R. ve Roh, S.S. (2003). Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract. *Int. Immunopharmacol.* 3 (1), 129-136.
- [84] Acar, R., Unver, A., Arslan, D., Ozcan, M.M. ve Gunes, A. (2011). Effect of plant parts and harvest period on rutin, quercetin, total phenol contents and antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in Turkey. *Asian J. Chem.* 23 (7), 3240-3242.
- [85] Guo, X., Zhu, K., Zhang, H. ve Yao, H. (2010). Anti-tumor activity of a novel protein obtained from tartary buckwheat. *Int. J. Mol. Sci.* 11 (12), 5201-5211.
- [86] Jin, H.-M. ve Wei, P. (2011). Anti-fatigue properties of tartary buckwheat extracts in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (8), 4770-4780.
- [87] Higasa, S., Fujihara, S., Hayashi, A., Kimoto, K. ve Aoyagi, Y. (2011). Distribution of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory substance (2"-hydroxynicotianamine) in the flour, plant parts, and processed products of buckwheat. *Food Chem.* 125 (2), 607-613.
- [88] Shen, M., Chapman, R.S., He, X., Liu, L.Z., Lai, H., Chen, W. ve Lan, Q. (2008). Dietary factors, food contamination and lung cancer risk in Xuanwei, China. *Lung Cancer.* 61 (3), 275-282.
- [89] Sun, G., Cui, T., Jin, Q., Li, X., Li, S. ve Cui, C. (2012). Cytotoxicity of different extract parts of buckwheat sprout. *Food Sci. Technol.* 10, 200-203.
- [90] Sun, T. ve Ho, C.-T. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem.* 90 (4), 743-749.
- [91] Ishii, S., Katsumura, T., Shiozuka, C., Ooyauchi, K., Kawasaki, K., Takigawa, S., Fukushima, T., Tokuji, Y., Kinoshita, M. ve Ohnishi, M. (2008). Anti-inflammatory effect of buckwheat sprouts in lipopolysaccharide-activated human colon cancer cells and mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (12), 3148-3157.
- [92] Choi, I., Seog, H., Park, Y., Kim, Y. ve Choi, H. (2007). Suppressive effects of germinated buckwheat on development of fatty liver in mice fed with high-fat diet. *Phytomed.* 14 (7), 563-567.
- [93] Ortmeyer, H.K., Lerner, J. ve Hansen, B.C. (1995). Effects of D-chiroinositol added to a meal on plasma glucose and insulin in hyperinsulinemic rhesus monkeys. *Obesity Res.* 3 (4), 605-608.
- [94] Lu, C., Xu, J., Zhao, P., Ma, H., Tong, H., Jin, Y. ve Li, S. (1992). Clinical application and therapeutic effect of composite tartary buckwheat flour on

hyperglycemia and hyperlipidemia. *Proceedings of the 5th International Symposium on Buckwheat*. R. Lin, vd. (Eds).

- [95] Wang, J., Liu, Z., Fu, X. ve Run, M. (1992). A clinical observation on the hypoglycemic effect of Xinjiang buckwheat. *Proceedings of the 5th International Symposium on Buckwheat*. R. Lin, vd. (Eds).
- [96] De Francischi, M.L.P., Salgado, J.M. ve Da Costa, C.P. (1994). Immunological analysis of serum for buckwheat fed celiac patients. *Plant Foods Human Nutr.* 46 (3), 207-211.
- [97] Golisz, A., Gawronska, H. ve Gawronski, S.W. (2007). Influence of buckwheat allelochemicals on crops and weeds. *Allelopathy J.* 19 (2), 337-349.
- [98] Tsuzuki, E. (1987). Studies on allelopathy among higher plants V. Isolation and identification of phenolic substances from wild perennial buckwheat (*Fagopyrum cymosum* M.). *Bull. Fac. Agric. Miyazaki Univ.* 34, 289-295.
- [99] Iqbal, Z., Hiradate, S., Noda, A., Isojima, S.-i. ve Fujii, Y. (2003). Allelopathic activity of buckwheat: isolation and characterization of phenolics. *Weed Sci.* 51 (5), 657-662.
- [100] Tsuzuki, E., Yamamoto, Y. ve Shimizu, T. (1987). Fatty acids in buckwheat are growth inhibitors. *Ann. Bot. London.* 60 (1), 69-70.
- [101] Kalinova, J., Vrchotova, N. ve Triska, J. (2007). Exudation of allelopathic substances in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Agr. Food Chem.* 55 (16), 6453-6459.
- [102] Tin, W.W.T., Hayashi, H., Otomatsu, T., Hirose, K., Hasegawa, K. ve Shigemori, H. (2009). Caprolactam, an inhibitory allelochemical exuded from germinating buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) seeds. *Heterocycles.* 78 (5), 1217-1222.
- [103] Kinnula, V.L. ve Crapo, J.D. (2004). Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Rad. Biol. Med.* 36 (6), 718-744.
- [104] Singh, U. ve Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiol.* 13 (3), 129-142.
- [105] Sas, K., Robotka, H., Toldi, J. ve Vecsei, L. (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.* 257 (1), 221-239.

- [106] Smith, M.A., Nunomura, A., Zhu, X., Takeda, A. ve Perry, G. (2000). Metabolic, metallic, and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. *Antiox. Redox Sign.* 2 (3), 413-420.
- [107] Guidi, I., Galimberti, D., Lonati, S., Novembrino, C., Bamonti, F., Tiriticco, M., Fenoglio, C., Venturelli, E., Baron, P. ve Bresolin, N. (2006). Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 27 (2), 262-269.
- [108] Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G. ve Monks, T.J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 13 (3), 135-160.
- [109] Hyun, D.H., Hernandez, J.O., Mattson, M.P. ve de Cabo, R. (2006). The plasma membrane redox system in aging. *Aging Res. Rev.* 5 (2), 209-220.
- [110] Upston, J.M., Kritharides, L. ve Stocker, R. (2003). The role of vitamin E in atherosclerosis. *Progr. Lipid Res.* 42 (5), 405-422.
- [111] Papas, A.M. (1996). Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids.* 31 (1), S77-S82.
- [112] Steer, P., Millgard, J., Sarabi, D.M., Basu, S., Vessby, B., Kahan, T., Edner, M. ve Lind, L. (2002). Cardiac and vascular structure and function are related to lipid peroxidation and metabolism. *Lipids.* 37 (3), 231-236.
- [113] Uchida, K. (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Rad. Biol. Med.* 28 (12), 1685-1696.
- [114] Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. ve Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 312 (7029), 478-481.
- [115] Grice, H.C. (1988). Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem. Toxicol.* 26 (8), 717-723.
- [116] Witschi, H.P. (1986). Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract. *Food Chem. Toxicol.* 24 (10-11), 1127-1130.
- [117] Aras, Ö. (2006). Üzüm ve üzüm ürünlerinin toplam karbonhidrat, protein, mineral madde ve fenolik bileşik içeriklerinin belirlenmesi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi.
- [118] Birks, J.S. ve Grimley Evans, J. (2015). Rivastigmine for Alzheimer's disease. *The Cochrane Library.*

- [119] Singhal, A.K., Naithani, V. ve Bangar, O.P. (2012). Medicinal plants with a potential to treat Alzheimer and associated symptoms. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Diseases.* 2 (2), 84.
- [120] Howes, M.J.R. ve Houghton, P.J. (2003). Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharm. Biochem. Behavior.* 75 (3), 513-527.
- [121] EDQM (2014). Determination of essential oils and vegetable drugs. Council of Europe. Strasbourg, France. 217-218.
- [122] Folch, J., Lees, M. ve Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 497-509.
- [123] Ackman, R.G. (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (4), 541-545.
- [124] Krishnaiah, D., Sarbatly, R. ve Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Proces.* 89 (3), 217-233.
- [125] Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L. ve Sarker, S.D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytother. Res.* 21 (7), 615-621.
- [126] Koşar, M., Göger, F. ve Başer, K.H.C. (2011). In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia halophila* Hedge from Turkey. *Food Chem.* 129 (2), 374-379.
- [127] Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Meth. Enzymology.* 299, 152-178.
- [128] Marston, A., Kissling, J. ve Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem. Analysis.* 13 (1), 51-54.
- [129] Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. ve Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- [130] Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, G.O., Cakmak, Y.S. ve Duran, A. (2013). Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and

aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem. Toxicol.* 55, 290-296.

- [131] Huang, D., Ou, B. ve Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agr. Food Chem.* 53 (6), 1841-1856.
- [132] Drazic, S., Glamoclija, D., Ristic, M., Dolijanovic, Z., Drazic, M., Pavlovic, S., Jaramaz, M. ve Jaramaz, D. (2016). Effect of environment of the rutin content in leaves of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Plant Soil Environ.* 62 (6), 261-265.

