

Phenolic Composition and Antioxidant Properties of *Wisteria sinensis*

Saban Keskin (Corresponding author)
Department of Chemistry, Faculty of Art and Science,
Bilecik Seyh Edebali University, Bilecik, Turkey
E-mail: sabankeskin61@hotmail.com

Yakup Sirin
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey
E-mail: yakup.sirin@outlook.com

Hilal Ebru Cakir
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey
E-mail: hilalebruhotaman@gmail.com

Merve Keskin
Department of Chemistry, Faculty of Science,
Karadeniz Technical University, Trabzon, Turkey
E-mail: merveozdemirkeskin@gmail.com

Abstract

Wisteria is a plant species of the Fabaceae family with woody, flowering and climbing characteristics and has about 10 subspecies. *Wisteria sinensis*, abundant in Asian countries, is highly attractive for honey bees due to its blue-violet, fragrant flowers.

The flowers of the plant are mixed with sugar and flour to make a local meal (Teng Lo) in the East Asian countries. Flowers can also be consumed as a tea. *Wisteria sinensis* have antioxidant and antibacterial properties. It is very rich plant in terms of polyphenols, saponins, flavones and lectins. Because of these properties, *Wisteria sinensis* can be used in the treatment of rheumatoid arthritis, stomach and breast cancer diseases.

In this study, antioxidant properties and phenolic composition of the flower, leaf and branch parts of *Wisteria sinensis* collected from Trabzon/Turkey were investigated. Antioxidant capacity and HPLC-UV phenolic composition were determined according to Ferric reduction capacity (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and total phenolic substance (TPC) methods. Flowers of the plant were rich in cinnamic acid, vanillic acid, rutin, daidzein and luteolin. Extracts obtained from leaf and branch part were found to be rich in epicatechin, rutin, luteolin and cinnamic acid. A high correlation between antioxidant capacity and its total phenolic contents indicated that phenolic compounds were a major contributor of antioxidant activity of the plant.

Keywords: *Wisteria sinensis*, polyphenols, antioxidant capacity, phenolic composition

DOI: 10.7176/JSTR/5-2-12

***Wisteria sinensis*'in Fenolik Kompozisyonu ve Antioksidan Özellikleri**

Özet

Wisteria, Fabaceae ailesine ait odunsu, çiçeklenme ve tırmanma özelliklerine sahip ve yaklaşık 10 alt türü olan bir bitki türüdür. Asya ülkelerinde bol miktarda bulunan *Wisteria sinensis*, mavi-mor, kokulu çiçekleri nedeniyle bal arıları için oldukça çekicidir. Doğu Asya ülkelerinde yerel bir yemek (Teng Lo) yapmak için bitkinin çiçekleri şeker ve unla karıştırılır. Çiçekler ayrıca çay olarak da tüketilebilir. *Wisteria sinensis* antioksidan ve anti bakteriyel özelliklere sahiptir. Polifenoller, saponinler, flavonlar ve lektinler açısından çok zengin bir bitkidir. Bu özelliklerden dolayı, *Wisteria sinensis*, romatoid arterit, mide ve meme kanseri hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir. Bu çalışmada Trabzon/Türkiye'den toplanan *Wisteria sinensis* 'in çiçek, yaprak ve dal kısımlarının antioksidan özellikleri ve fenolik bileşimi incelenmiştir. Antioksidan kapasite ve HPLC-UV fenolik kompozisyon, demir indirgeme kapasitesi (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) süpürme aktivitesi ve toplam fenolik madde (TPC) yöntemlerine göre belirlenmiştir. Bitkinin çiçekleri, sinamik asit, vanilik asit, rutin, daidzein ve luteolin bakımından zengin olduğu belirlendi. Yaprak ve dal kısmından elde edilen ekstraktların epikateşin, rutin, luteolin ve sinamik asit açısından zengin olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan kapasite ile toplam fenolik içerik arasındaki yüksek korelasyon, fenolik bileşiklerin bitkinin antioksidan aktivitesine önemli bir katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Wisteria sinensis*, Polifenoller, Antioksidan kapasite, Fenolik içerik

1. GİRİŞ

Wisteria, bezelye ailesine ait çiçekli bir türdür. Odunsu, tırmanıcı, üzüm asması gibi yaklaşık on adet türü bulunmaktadır. Süs bitkisi olarak dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Çin wisteriası olarak da adlandırılan tırmanıcı *Wisteria sinensis* boyu yaklaşık 20 m' ye ulaşır. Bitkinin yapraklarının şeker ile karıştırılmasıyla Teng Leo adı verilen geleneksel bir gıda elde edilmektedir. Bitkinin yaprakları çay olarak da kullanılmaktadır. Ayrıca bitkinin kökleri kağıt yapımında kullanılmaktadır. Şekil 1.' de bitkiye ait resim bulunmaktadır. Geleneksel ve tamamlayıcı tıpta mide ülseri, mide ve göğüs kanseri ile birlikte iltihaplı romatizmaların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. *Wisteria sinensis* ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, bitkinin yağından fenil propanoidler ve β -kromenlerinin saflaştırıldığı ve ayrıca bitkinin triterpenler, saponinler, isoflavonlar ve lektin içerdiği tespit edilmiştir (Mohamed vd., 2011). Bütün bitki metabolizmalarında, bitkinin çevresel stres koşullarına (UV radyasyon, patojenler vb) karşı savunma mekanizmasının sonucunda oluşturduğu sekonder metabolitler bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bulunmaktadırlar. Sekonder metabolit olan polifenoller; bitkiye yüksek antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitumoral özellikler kazandırmaktadır.



Şekil 1. *Wisteria sinensis* çiçekleri

Hücrel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı (ROS) ile onları detoksifiye eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanan oksidatif stresin kanser, diyabet, katarakt, romatoid artrit ve yaşlanma gibi çeşitli inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklarda rol oynadığı yapılan birçok çalışmada belirtilmektedir.

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan kaynaklarının yetersiz kaldığı durumlarda dışarıdan alınacak antioksidanlar ile organizmanın desteklenmesi oksidatif stresin oluşmasını engelleyebilmektedir. Bu nedenle günümüzde yiyecek ve biyolojik sistemlerde doğal olarak oluşan moleküllerin antioksidan aktivite etkisine artan bir ilgi vardır (Büyüktuncel, 2013).

Yaptığımız bu çalışmada geleneksel Çin tıbbında yaygın olarak kullanılan *Wisteria sinensis* bitkisinin antioksidan aktivitesi ve fenolik kompozisyonları belirlendi.

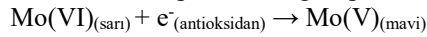
2. MATERYAL METOT

2.1. Numunelerin temini ve ekstraktların eldesi

Wisteria sinensis bitkisi Trabzon'da 2017 bahar döneminde toplandı. Bitkinin yaprak, sap, çiçek gibi farklı kısımlardan metanolik ekstraktlar hazırlandı. Bu amaçla numuneler kurutuldu, öğütüldü ve her bir kısımdan yaklaşık 3'er gram tartıldı. Daha sonra üzerine % 99' luk metanol ilave edildi ve 24 saat boyunca çalkalandı. İşlem tamamlandıktan sonra karışım süzüldü ve çözelti hacmi belirlendi.

2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Folin metodu fenolik maddelerin Folin Ciocalteu reaktifi ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanır ve doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için en çok kullanılan yöntemdir (Singleton ve Rossi, 1965; Singleton vd., 1999). Folin-Ciocalteu reaktifi molibdofosfotungstik heteropoliasiti ($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) olup bileşiğin aktif merkezinde Mo(VI) bulunur. Fenolik maddelerin folin reaktifi ile oluşturduğu mor menekşe renkli kompleks 765 nm'de maksimum absorbanansa sahiptir. Bu rengin spektrofotometrik ölçümü ile toplam fenolik madde miktarı tespit edilir.



Gallik asit (GA) standardı kullanılarak kalibrasyon grafiği hazırlandı (Slinkard vd., 1977; Singleton ve Rossi, 1965). Gallik asitin farklı konsantrasyonlarda (1.0; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0625 ve 0.03125 mg.mL⁻¹) çözeltileri hazırlandı. Konsantrasyona karşılık ölçülen absorban değerleri ile standart grafiği çizildi. Çizilen grafiğe göre ekstraktların toplam fenolik madde miktarı ayrı ayrı hesaplandı. Sonuçlar mg GAE.mL⁻¹ cinsinden ifade edildi.

2.3. Toplam Flavanoid Tayini

Flavanoid miktarı tayini Fukumoto ve Mazza (2000)'ya göre yapıldı. Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi olarak da adlandırılan bu metodun prensibi, alüminyum klorürün, flavonoidlerin 4-keto ve C-3 ya da C-5 (ya da her ikisi) hidroksil grubu ile kararlı bir asit kompleksi oluşturmasına dayanmaktadır. Alüminyum klorür ayrıca flavonoidlerin A ve B halkarındaki orto-dihidroksil grupları ile kararsız bir asit kompleksi de oluşturur (Pallab vd., 2013). Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (0.25; 0.125; 0.0625; 0.03125; 0.015625 ve 0.0078125 mg.mL⁻¹) kuersetin (KE) kullanıldı. Pipetlemeler bittikten 40 dakika sonra 415 nm' de saf suya karşı tüplerin absorbanları kaydedildi. Konsantrasyona karşılık kaydedilen absorban değerleri ile standart grafiği çizildi. Çizilen standart grafiğine göre ekstraktların toplam flavanoid madde miktarı hesaplandı ve toplam flavanoid miktarı mg KE.mL⁻¹ ekstrakt olarak ifade edildi.

2.4. Antioksidan Kapasitesi Tayini

Wisteria sinensis'in yaprak, sap ve çiçeklerinden hazırlanan metanolik ekstraktların antioksidan kapasiteleri demir indirgeme (FRAP) ve serbest radikal süpürme (DPPH) yöntemleri kullanılarak yapıldı (Keskin vd., 2019).

2.4.1. Demir İndirgeme Gücü (FRAP)

Bu yöntemin ilkesi, Fe³⁺ iyonlarının, asidik ortamda Fe(TPTZ)³⁺ tripridiltriazin kompleksiyle antioksidanlar tarafından mavi renkli Fe(TPTZ)²⁺ kompleksine indirgenmesine dayanır (Benzie and Strain, 1999). FRAP reaktifi, 40 mM HCL, 2.5 mL FeCl₃.6H₂O ve 25 mL 300 mM pH 3.60 asetat

tamponunda çözündürülmüş 2.5 mL 10 mM TPTZ karıştırılarak hazırlandı. 3 mL taze hazırlanmış FRAP reaktifine 100 µL örnek eklenmiş, daha sonra 37 °C'de 4 dakika inkübe edilmiştir. Numunelerin absorbansı saf su kullanılarak hazırlanmış köre karşı 593 nm'de kaydedilmiştir. Standart bir kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 100-1000 mM arasında değişen farklı konsantrasyonlarda demir sülfat çözeltisi kullanıldı. Standart referans olarak Trolox kullanıldı. FRAP testiyle elde edilen sonuçlar g numune başına µM Fe (II) eşdeğeri olarak verildi.

2.4.2. Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi (DPPH)

Metanol ekstraktlarının radikal süpürme kapasitesi, Molyneux tarafından açıklanan DPPH yöntemi kullanılarak belirlendi (Molyneux, 2004). Her örnek için, altı farklı konsantrasyonda 0,75 mL ekstrakt metanol içinde 0,75 mL 0,1 mM DPPH ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında inkübasyondan sonra absorbans 517 nm'de kaydedildi. Sonuçlar, SC₅₀ olarak ifade edildi; bu değer DPPH'nin ilgili konsantrasyondaki çözeltisinde serbest radikal miktarını yarı yarıya azaltmak için gerekli numune konsantrasyonunu ifade etmektedir.

2.5. Fenolik Kompozisyonun Belirlenmesi

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda (280 ve 315 nm) aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı Thermo Finnigan Surveyor HPLC sisteminde yapıldı. Analizler ters faz C18 kolonu (150 mm x4.6 mm, 5µm; Fortis) kullanarak ve asetonitril, su ve asetik asitle gradient program uygulanarak gerçekleştirildi (De Villers vd., 2004). A rezervuarında % 2 asetik asit (saf suda) ve B rezervuarında % 70-30 asetonitril-saf su bulunan gradient programı uygulandı. Ayrıca numune ve standartların enjeksiyon hacmi 25 µL'ye, mobil faz akış hızı 1,2 mL.dk⁻¹'ya ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30 °C'ye ayarlanarak çalışma optimizasyonu sağlandı (Can, 2015).

3. BULGULAR

Wisteria sinensis'in yaprak, sap ve çiçeklerinden hazırlanan metanolik ekstraktların toplam polifenol miktarı sırasıyla 1.23 mg GAE.g⁻¹, 1.93 mg GAE.g⁻¹ ve 1.39 mg GAE.g⁻¹; demir indirgeme kapasitesi sırasıyla 0.56 µM FeSO₄.7H₂O.g⁻¹, 8.29 µM FeSO₄.7H₂O.g⁻¹ ve 3.96 µM FeSO₄.7H₂O.g⁻¹; serbest radikal temizleme kapasitesi (SC₅₀) sırasıyla 8.92 mg.mL⁻¹, 4.89 mg.mL⁻¹ ve 6.87 mg.mL⁻¹ olarak belirlendi. Bitkinin yapraklarının kateşin, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, rutin, daidzein, cinnamik asit ve luteolin içerdiği tespit edildi. Epikateşin, *p*-kumarik asit, rutin, sinamik asit ve luteolinin ise bitkinin her üç kısmında da olduğu belirlendi. Analiz sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2' de özetlendi.

Tablo 1. *Wisteria sinensis* yaprak, çiçek ve sap kısımlarının toplam polifenol ve antioksidan değerleri

| | Toplam Polifenol Miktarı (mg GAE.g ⁻¹) | Toplam Antioksidan Kapasite, FRAP (µM FeSO ₄ .7H ₂ O.g ⁻¹) | Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi (SC ₅₀ mg.mL ⁻¹) |
|--------|--|--|--|
| Yaprak | 1.23 ± 0.01 | 0.56 ± 0.02 | 8.92 ± 0.07 |
| Çiçek | 1.39 ± 0.00 | 3.96 ± 0.03 | 6.87 ± 0.09 |
| Sap | 1.93 ± 0.00 | 8.29 ± 0.12 | 4.89 ± 0.02 |

Tablo 2. *Wisteria sinensis* yaprak, çiçek ve sap kısımlarının fenolik kompozisyonu

| Fenolik Kompozisyon (mg fenolik bileşen.g ⁻¹)* | | | | | | | | | | | | | | |
|--|----|-----|------|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | GA | PKA | p-BA | KT | VA | KA | ŞA | EKT | p-CA | FA | RT | DA | SA | LT |
| Yaprak | - | - | - | - | - | - | - | 36.43 | 2.77 | - | 76.61 | 0.63 | 117.81 | 13.24 |
| Çiçek | - | - | - | 1.94 | 0.63 | 1.36 | 0.12 | 2.76 | 6.63 | 13.69 | 12.80 | 29.40 | 11.60 | 7.19 |
| Sap | - | - | - | - | 2.66 | - | - | 10.79 | 3.11 | - | 64.82 | - | 2.27 | 10.17 |

GA: Gallik asit, PKA: Protokatequik asit, p-BA: p-Hidroksibenzoik asit, KT: Kateşin, VA: Vanilik asit, KA: Kafeik asit, ŞA: Şiringik asit, EKT: Epikateşin, p-CA: p-Kumarik asit, FA: Ferulik asit, RT: Rutin, DA: Daidzein, SA: Sinnamik asit, LT: Luteolin

*Analiz sonuçları üç tekrarlı olarak elde edilmiştir. Standart sapma <0.01 olduğu için tablo değerlerine yansıtılmamıştır.

4. TARTIŞMA

Geleneksel Çin tıbbında oldukça geniş uygulama alanı bulan *Wisteria sinensis*'ten elde edilen yağ ve uçucu bileşenler oldukça yaygın kullanılmaktadır. Geleneksel tıp alanında oldukça geniş uygulama alanı bulan bu bitki fenolik bileşenleri açısından oldukça zengindir (Mohamed vd., 2011). Flavonoidler bitkilerce üretilen sekonder metabolitlerdir ve bitkilerin kuraklık, patojenlerin varlığı, UV radyasyonu gibi çevresel stres faktörlerinden korunmak için ürettikleri bileşiklerdir. Bu bileşiklerin oldukça yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu bildirilmektedir. Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif strese bağlı rahatsızlıklara karşı insan sağlığını koruyucu etkileri olduğu da ifade edilmektedir (Yao, et. al., 2004). Bu çalışma ile elde edilen bulgular, *wisteria sinensis*'in yaprak, sap ve çiçek gibi farklı kısımlarının yüksek miktarda flavonoid sınıfı bileşikler ihtiva ettiğini göstermiştir. Wink (2013) yapmış olduğu bir çalışmada *Wisteria sinensis* bitkisinin ait olduğu bezelye ailesinin fenolik bileşenler açısından zengin olduğunu ifade etmiştir. Özellikle flavonoidler, izoflavonlar, kateşinler, antosiyaninler, tanenler ve kumarinler açısından bu aileye ait bitkilerin zengin olduğu ifade edilmektedir. Chew ve arkadaşları (2011) aynı aileye ait farklı bir bitki türünün toplam polifenolik madde içeriğini ve antioksidan özelliklerini araştırmışlardır. B. purpurea bitkisine ait çiçeklerin 3.49 mg GAE.g⁻¹ toplam polifenolik madde içerdiğini ve IC₅₀ değerlerinin de toplam polifenolik madde ile orantılı olduğunu ifade etmişlerdir. Huang ve arkadaşları (2013) yapmış oldukları bir çalışmada yine aynı aileden olan *Spatholobus suberectus*un toplam polifenol miktarının % 1.81– % 2.60 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bu bitkinin de kateşin içerdiği belirtilmiştir. Mohamed ve arkadaşları (2011) yaptıkları çalışma sonucunda *Wisteria sinensis*' in luteolin ve kefeik asit açısından zengin olduğunu, antioksidan kapasitesinin de yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler literatür bilgileri ile birleştirildiğinde, *Wisteria sinensis*'in farklı kısımlarından yüksek antioksidan aktiviteye sahip flavonoidlerin elde edilebileceği ifade edilebilir.

5. SONUÇ

Wisteria sinensis'in antioksidan kapasitesi ve toplam polifenolik içeriğinin belirlendiği bu çalışma, bitkinin özellikle çiçek kısmının oldukça çeşitli fenolik bileşikler ihtiva ettiğini göstermiştir. Yine toplam polifenolik madde miktarı ile toplam antioksidan kapasite arasında bir korelasyon olduğu da görülmektedir. Bu sonuçlar *Wisteria sinensis*'ten elde edilecek ekstraktların gıda bileşimine katılarak onların antioksidan aktivite yönünden fonksiyonlarını arttırabileceği ifade edilebilir.

References

Benzie, I.F.F & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17: 93-103.

- Can, et. al., (2015). An investigation of turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles, *food chemistry*, 180, 133-141.
- Chew, et. al., (2011). Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11-12.
- Fukumoto L. R & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Huang et. al., (2013). Characterization of Total Phenolic Constituents from the Stems of *Spatholobus suberectus* Using LC-DAD-MSn and Their Inhibitory Effect on Human Neutrophil Elastase Activity, *Molecules*, 18, 7549-7556
- Keskin, et. al., (2019). An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes, *South African Journal of Botany*, 120, 170-174.
- Mohamed et. al., (2011). Antioxidant and Cytotoxic Constituents from *Wisteria sinensis*, *Molecules*, 16, 4020-4030.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26, 211–219.
- Pallab, et. al., (2013). Estimation of Total Flavonoids Content (TFC) and Antioxidant Activities of Methanolic Whole Plant Extract of *Biophytum Sensitivum* Linn., *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3, 4, 33-37.
- Singleton V. L & Rossi J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic–Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singleton, et. al., (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Slinkard, K & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 28, 49–55.
- Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae), *South African Journal of Botany*, 89, 164–170.
- Yao et. al., (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits, *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113–122.