

**ENGİNAR (*CYNARA SCOLYMUS L.*)  
YAPRAĞINDA FENOLİK MADDE  
ANALİZLERİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE  
TAYİNİ**

**Ahmet ULUAD**



T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENGİNAR (*CYNARA SCOLYMUS L.*) YAPRAĞINDA FENOLİK  
MADDE ANALİZLERİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE  
TAYİNİ**

**Ahmet ULUAD**

Doç. Dr. Saliha ŞAHİN  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2017

**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ahmet ULUAD tarafından hazırlanan "ENGİNAR (*CYNARA SCOLYMUS* L.) YAPRAĞINDA FENOLİK MADDE ANALİZLERİ VE ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

**Başkan :** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

**Üye :** Prof. Dr. Belgin İZGİ

**Üye :** Doç. Dr. Ömer KOZ

İmza

İmza

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

  
Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

9.12.2017

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel ve işitsel yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

.././....

**İmza**

**Ahmet ULUAD**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ENGİNAR (*CYNARA SCOLYMUS L.*) YAPRAĞINDA FENOLİK MADDE ANALİZLERİ VE ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ

**Ahmet ULUAD**

Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

**Danışman:** Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Enginar (*Cynara scolymus L.*) güney Akdeniz kökenli Afrikanın kuzey bölgesinde yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. Yakın dönemdeki çalışmalar enginar brakte yaprağı ekstraktının antioksidan, antikarsinojen, antigenotoksik, antibakteriyel, kolesterol düşürücü, diüretik ve koleretik aktivite içeren önemli tıbbi bulgulara sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca enginar yaprağında bulunan kafeol kuinik asit türevleri ve luteolin glikozitlerinin güçlü antioksidan etkiler gösterdiği bir çok çalışmada raporlanmıştır.

Türkiye’de yetiştirilen enginar başının dış tarafındaki brakte yapraklarında bulunan fenolik bileşikler HPLC-ESI-QTOF-MS tekniği ile belirlenmiştir. Enginarın brakte yaprağında 31 adet fenolik bileşiğin tespiti kullanılan tekniğin oldukça faydalı olduğunu bizlere kanıtlamıştır. Fenolik bileşiklerden 19 tanesi kantitatif olarak tespit edilirken, 12 tanesi kalitatif olarak belirlenmiştir. Enginar yaprağı ekstraktlarındaki temel bileşikler; luteolin, apigenin, naringin ve kamferol olarak belirlenmiştir. Enginar yaprağının %70 metanol ekstraktındaki temel fenolik bileşiklerin miktarları; luteolin (80,33 mg/kg kuru madde), apigenin (110,25 mg/kg kuru madde), naringin (25,00 mg/kg kuru madde) ve kamferol (80,44 mg/kg kuru madde) olarak bulunmuştur.

Ayrıca bu tez kapsamında enginar başının dış tarafındaki brakte yaprakları ekstraktlarının antioksidan kapasite tayinleri CHROMAC yöntemi ve toplam fenolik madde tayinleri de Folin-Ciocalteu yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucu antioksidan kapasite değerleri ile toplam fenol değerleri arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Araştırma sonucu elde ettiğimiz veriler enginar brakte yaprağının zengin bir antioksidan kaynağı olduğunu kanıtlamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Enginar, *Cynara scolymus*, brakte yaprak, LC-QTOF-MS, fenolik bileşikler, toplam fenol, antioksidan kapasite, CHROMAC.

**2017, ix + 54 sayfa.**

## ABSTRACT

Msc Thesis

### ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAY AND ANALYSIS OF PHENOLICS IN ARTICHOKE (*CYNARA SCOLYMUS* L.) LEAF

**Ahmet ULUAD**

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

**Supervisor:** Assoc. Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Artichoke (*Cynara scolymus* L.) is an ancient gramineous perennial plant, originating from the southern Mediterranean district of North Africa. Recently, many studies have shown that artichoke leaf extracts have major medicinal properties, including antioxidative, anticarcinogenic, antigenotoxic, antibacterial, cholesterol-lowering, diuretic and choloretic activities. Otherwise, the biological activities of artichoke leaves have been reported in various study predominantly the strong antioxidative effects which are attributed to caffeoylquinic acid derivatives and flavonoids such as luteolin glycosides.

The phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) outer bracts grown in Turkey was determined by HPLC-ESI-QTOF-MS, which proved useful in describing 31 phenolic compounds. 19 phenolic compounds were determined quantitatively, remaining phenolics were determined qualitatively. Luteolin, apigenin, naringin and kaempferol were determined as main phenolic compounds in artichoke bracts extracts. The primary phenolic compounds in %70 metanol extract were luteolin (80,33 mg/kg dry matter), apigenin (110,25 mg/kg dry matter), naringin (25,00 mg/kg dry matter) and campherol (80,44 mg/kg dry matter) in artichoke bracts.

Artichoke outer bracts extracts were also assayed for antioxidant capacity identified as CHROMAC and for total phenolic content as Folin-Ciocalteu. A linear relationship was observed between antioxidant capacity and total phenol values. The data demonstrates that artichoke bracts are rich source of antioxidants.

**Key words:** Artichoke, *Cynara scolymus*, bracts, LC-QTOF-MS, phenolic compounds, total phenol, antioxidant capacity, CHROMAC.

**2017, ix + 54 pages.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan, tez çalışmalarım da deneyimlerinden ve yardımlarından faydalandığım danışman hocam Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Tez çalışmam süresince bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen, fikirleriyle beni yönlendiren değerli hocam Prof. Dr. Cevdet DEMİR'e,

Çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünde, yardımlarından dolayı Teknik Koordinatör Orhan EREN, Dr. Murat Faruk US ve Filiz ÇAVUŞ'a,

Dene y aşamalarında yardımları ile bana destek olan yüksek lisans arkadaşım Çiğdem YÜKSEL'e

Yüksek lisans eğitimim süresince birlikte eğitim gördüğüm, tez çalışmam süresince her konuda bana destek ve yardımcı olan değerli arkadaşım Derya YILMAZ'a,

Tüm bu zahmetli süreçte destek ve yardımlarını devamlı üzerimde hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin deneysel çalışmaları ilk tez danışmanım Prof. Dr. Cevdet DEMİR danışmanlığında yürütülmüştür.

Ahmet ULUAD

.../.../.....

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Fenolik Maddeler.....	3
2.1.1. Fenolik Asitler.....	3
2.1.1.1. Hidroksisünamik asitler.....	3
2.1.1.2. Hidroksibenzoik asitler.....	4
2.1.2. Flavonoidler.....	5
2.1.2.1. Flavonoller.....	6
2.1.2.2. Flavonlar.....	7
2.1.2.3. Antosiyaninler.....	8
2.2. Bitkilerde Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler.....	9
2.2.1. Bitkilerde Fenolik Asitlerin ve Flavonoidlerin İşlevleri.....	10
2.3. <i>Asteraceae</i> Familyası.....	10
2.3.1. Enginar ( <i>Cynara scolymus</i> L.).....	10
2.3.2. Enginarında Bulunan Fenolik Asitler ve Flavonoidler.....	12
2.4. Analitik Yöntemler.....	13
2.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri.....	13
2.4.2. Kromatografik Teknikler.....	14
2.4.2.1. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-QTOF-MS).....	15
2.4.3. Spektroskopik Teknikler.....	17
2.4.3.1. Toplam Fenol Tayini.....	17
2.4.3.2. Antioksidan Kapasite Tayini.....	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler.....	20
3.1.1.1. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (LC-QTOF-MS).....	20
3.1.1.2. Ultraviyole Görünür Bölge (UV-VIS) Spektrometresi.....	20
3.1.1.3. Ultra Saf Su Cihazı.....	20
3.1.1.4. Analitik Terazisi.....	20
3.1.1.5. Döner Buharlaştırıcı.....	20
3.1.1.6. Manyetik Karıştırıcı.....	21
3.1.1.7. Ultrasonik Banyo.....	21
3.1.1.8. pH Metre.....	21
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Türü.....	21
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	21
3.1.3.1. Kimyasallar.....	21
3.1.3.1.1. Analitik saflıktaki kimyasallar.....	21



3.1.3.1.2. Diğer kimyasallar.....	22
3.1.3.2. Sarf malzemeler.....	23
3.1.3.3. Çözeltiler.....	23
3.1.3.3.1. Standart fenolik maddeler ile kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması..	23
3.1.3.3.2. Toplam fenol tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	23
3.1.3.3.3. Antioksidan kapasite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması....	24
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1. Bitkinin Toplanması ve Analize Hazırlanması.....	24
3.2.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	24
3.2.3. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-QTOF-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	26
3.2.4. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenol Tayini.....	27
3.2.5. CHROMAC Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini.....	27
4.BULGULAR.....	29
4.1. Spektroskopik Yöntemler.....	29
4.1.1. Toplam Fenol Tayini.....	29
4.1.2. Antioksidan Kapasite Tayini.....	30
4.2. Kromatografik Yöntem.....	32
4.2.1. LC-QTOF-MS Tekniği ile Enginar Yaprağında Bulunan Fenolik Maddeler.....	32
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	43
5.1. LC-QTOF-MS Sonuçları.....	43
5.1.1. Enginar ( <i>Cynara scolymus</i> ) Yaprağında Tespit Edilen Fenolik Maddeler..	43
5.1.2. Ekstraksiyon İşlemlerinde Kullanılan Çözücülerin Etkisi.....	45
5.2. UV-VIS Sonuçları.....	46
5.2.1. Toplam Fenol Sonuçları.....	46
5.2.3. Antioksidan Kapasite Sonuçları.....	46
5.3. Sonuç.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	54

## KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
APCI	Atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaştırma
CHROMAC	Krom İndirgeyici Antioksidan Kapasite Tayini
CUPRAC	Bakır İyonu İndirgeme Kapasitesi
DAD	Diod serili dedektör
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat
ESI	Elektrosprey İyonlaşma
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-ESI-MS	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonlaşma-Kütle Spektrometresi
LC-MS-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi-Kütle Spektrometresi
LC-QTOF-MS	Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MS	Kütle Spektrometresi
ORAC	Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
STD	Referans Standart
TRAP	Toplam Radikal Yakalama Antioksidan Kapasitesi
UV	Ultraviyole
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Bölge Spektrometresi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.1.1.1.	Hidroksisinamik asitlerin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.1.1.2.1.	Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.1.2.1.	Flavonoidlerin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.1.2.1.1.	Flavonollerin kimyasal yapısı	7
Şekil 2.1.2.2.1.	Flavonların kimyasal yapısı	8
Şekil 2.1.2.3.1.	Antosiyaninin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.3.1.1.	Bitkinin genel görünüşü	11
Şekil 2.3.1.2.	<i>Cynara scolymus</i> L.	11
Şekil 2.4.2.1.1.	Uçuş zamanlı bir kütle spektrometresinin şematik görünümü	16
Şekil 2.4.3.2.1.	H <sub>4</sub> L Difenilkarbazitin yapısı	19
Şekil 2.4.3.2.2.	H <sub>2</sub> L Difenilkarbazonun yapısı	19
Şekil 3.2.2.1.	Enginar yaprağı ekstraksiyon akış şeması	25
Şekil 4.1.1.1.	Standart gallik asit kalibrasyon grafiği	29
Şekil 4.1.2.1.	Standart troloks kalibrasyon grafiği	31
Şekil 4.2.1.1.	Enginar yaprağı ekstraktındaki fenolik maddelere ait LC-QTOF-MS kromatogramı (% 70 metanol)	32
Şekil 4.2.1.2.	Luteolin-7-o-glukuronit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	33
Şekil 4.2.1.3.	Luteolin-7-o-glukuronit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	33
Şekil 4.2.1.4.	Naringin-7-o-glikozit (Prunin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	34
Şekil 4.2.1.5.	Naringin-7-o-glikozit (Prunin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	34
Şekil 4.2.1.6.	Apigenin-7-o-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	35
Şekil 4.2.1.7.	Apigenin-7-o-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	35
Şekil 4.2.1.8.	Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	36
Şekil 4.2.1.9.	Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	36
Şekil 4.2.1.10.	Luteolin-7-o-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	37
Şekil 4.2.1.11.	Luteolin-7-o-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	37
Şekil 4.2.1.12.	Kripto-klorojenik asit (4-o-kafeolkuinik asit) bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	38
Şekil 4.2.1.13.	Kripto-klorojenik asit (4-o-kafeolkuinik asit) bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	38
Şekil 4.2.1.14.	Eriodiktiyolbileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı	39
Şekil 4.2.1.15.	Eriodiktiyolbileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

		<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1.1.1.1.</b>	Hidroksisinamik asitlerin kimyasal yapısı	4
<b>Çizelge 2.1.1.2.1.</b>	Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı	5
<b>Çizelge 2.1.2.1.1.</b>	Flavonollerin kimyasal yapısı	7
<b>Çizelge 2.1.2.2.1.</b>	Flavonların kimyasal yapısı	8
<b>Çizelge 3.2.3.1.</b>	LC-QTOF-MS için analiz çalışma koşulları	26
<b>Çizelge 3.2.3.2.</b>	QTOF Şartları	26
<b>Çizelge 4.1.1.1.</b>	Folin-Ciocalteu yöntemi ile enginar yaprağının %70 metanol bütanol, etil asetat, kloroform ve su ekstraktlarında belirlenen toplam fenol miktarları (mg gallik asit/g kuru madde)	30
<b>Çizelge 4.1.2.1.</b>	CHROMAC yöntemi ile enginar yaprağının %70 metanol bütanol, etil asetat, kloroform ve su ekstraktlarında belirlenen antioksidan kapasite miktarları (mg troloks/g kuru madde)	31
<b>Çizelge 4.2.1.1.</b>	Enginar yaprağında LC-QTOF-MS ile belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanları ve standartlarla karşılaştırılması	40
<b>Çizelge 4.2.1.2.</b>	Enginar yaprağında tespit edilen fenolik bileşiklerin LC-QTOF molekül iyon kütleleri [M-H] ve molekül ağırlıkları	41
<b>Çizelge 4.2.1.3.</b>	Enginar yaprağındaki fenolik maddelerin farklı fraksiyonlardaki miktarları	42

## 1. GİRİŞ

Antioksidanlar, insan vücudunda çeşitli kimyasal süreçler ve oksidasyonun sebep olduğu kararsız serbest radikalleri etkisiz hale getirerek başta kanser olmak üzere pek çok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonlarını engelleyen moleküllerdir. Ayrıca antioksidanlar gıda endüstrisinde, gıdalarda oksidasyonun sebep olduğu bozulmayı ve acımayı engellemek amacıyla da gıda katkıları olarak kullanılmaktadır. Yüksek derecede reaktif olan bu serbest radikaller farklı moleküllerle reaksiyona girerek hücreye ve canlıya zarar vermektedir. Antioksidanlar son derece zararlı bu serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önlerler. Gıdaların üretimindeki değişik ve yapay işlemler sebebiyle vücuda serbest radikal geçişi artar ve bu serbest radikallerin reaksiyonu sonucu oluşan toksik maddeler hücrede tahribata sebep olur. Bu hücre tahribatını ve onların olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için antioksidan madde içeren besinlerin alınması gereklidir. Bu sebeple antioksidan bileşik içeren doğal ürünler ile ilgili yapılacak araştırma çalışmaları insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır.

Ticari olarak kullanılan sentetik antioksidanlar kimyasal yapılarında fenolik gruba sahiptirler. Antioksidan etkiden sorumlu yapısında da bu fenolik gruplardan kaynaklı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda bünyesinde fenolik bileşiklere sahip bitki türlerine olan ilgi artış göstermiştir. Bitkilerde bulunan flavanoid ve fenolik asitler en önemli doğal antioksidan gruplarıdır. Çalışmada kullanılan enginar yaprağının ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidler insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Enginar yaprağında bulunan kafeol quinik asit türevleri ve flavonoid olan luteolin glikozitlerinin enginar yaprağında ağırlıklı olarak güçlü antioksidatif etkiler gösterdiği bir çok çalışmada raporlanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada enginar yaprağındaki fenolik bileşikler ve bu fenolik maddelerin antioksidan özellikleri incelenmiştir.

Enginar (*Cynara scolymus* L.) Akdeniz'in güney bölgesinde yaygın olarak bulunan çok yıllık otsu bir bitkidir. Enginar özellikle İspanya, İtalya, Fransa, Türkiye, Yunanistan ve A.B.D ülkelerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde ise Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde enginar yetiştiriciliği yapılmaktadır.

Bitki türleri arasında fenolik bileşik içeriklerinin ve bulunma oranlarının farklı oluşu ve fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin değişim göstermesi bitkilerin yetiştirilme koşullarına, iklim şartlarına ve genetik yapılarına bağlıdır.

Bu çalışmanın amacı; ülkemizde yetiştirilen enginarın (*Cynara scolymus* L.) yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif olarak analizlerini gerçekleştirmek ve enginar yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasite değerlerini belirlemektir. Farklı ekstraksiyon çözücüleri ile çalışma yapılarak her çözücüdeki fenolik bileşik içerikleri belirlenerek toplam fenol değerleri ve antioksidan kapasiteleri bulundu. Fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayininde LC-QTOF-MS tekniğinden yararlanıldı. Ayrıca toplam fenol tayini ve antioksidan kapasite tayininden elde edilen değerler karşılaştırılarak fenolik içerik ile antioksidan kapasite arasındaki ilişki incelendi.

## **2. KURAMSAL TEMELLER**

### **2.1. Fenolik Maddeler**

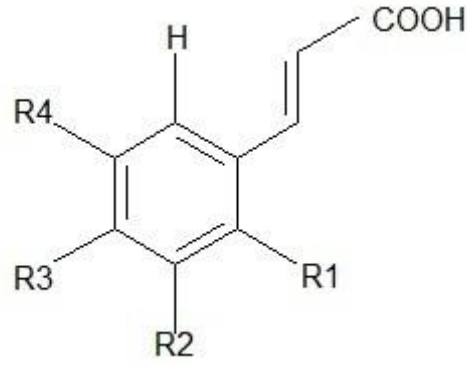
Fenolik bileşikler bir ya da daha fazla hidroksil grubunun aromatik halkaya bağlandığı yapılardır. Fenolik bileşikler temelde fenol olmak üzere çok geniş ve farklı yapılara sahip kimyasal bileşiklerdir. Fenolik bileşikler bitkinin gelişimi sırasında sentezlenen ve enfeksiyon, yaralanma ve ultraviyole radyasyonuna karşı koyan yapılardır. Hepsinin ortak bir yapısal özellik taşıdığı, yer değiştiren en az bir hidroksil grubunun var olduğu, aromatik halkaya sahip, doğal oluşumlu, yaklaşık 8000 fenolik madde bulunmaktadır (Stalikas 2007). Bu fenolik maddeler karbon yapılarına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılırlar.

#### **2.1.1. Fenolik Asitler**

Fenolik asitler bitki aleminde yaygın olarak sınıflandırılan aromatik sekonder bitki metabolitleridir. Genel olarak bir karboksilik asit özelliğine sahip fenoller fenolik asitler olarak adlandırılırlar (Stalikas 2007). Bu doğal olarak oluşan fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar.

##### **2.1.1.1. Hidroksisinamik Asitler**

Hidroksibenzoik asitlerden daha yaygın olarak bulunan hidroksisinamik asitlerin başlıcaları; para-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerdir. Hidroksisinamik asitler dondurma, sterilizasyon ve fermantasyon gibi işlenmiş ürünler dışında nadiren serbest halde bulunurlar. Bağ formları ise kuinik asit, tartarik asit ve şikimik asitin esterleri ya da glikozillenmiş türevleri olarak bulunurlar (Manach ve ark. 2004).



**Şekil 2.1.1.1.1.** Hidroksisinasamik asitlerin kimyasal yapısı

**Çizelge 2.1.1.1.1.** Hidroksisinasamik asitlerin kimyasal yapısı

İsim	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Sinamik asit	H	H	H	H
o-kumarik asit	OH	H	H	H
n-kumarik asit	H	OH	H	H
p-kumarik asit	H	H	OH	H
Ferulik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Sinapik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Kafeik asit	H	OH	OH	H

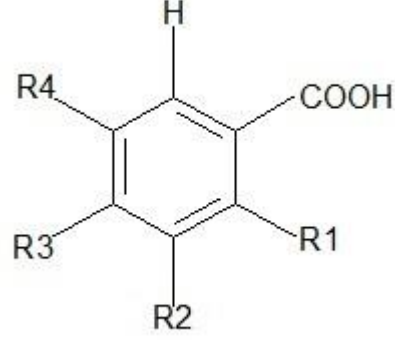
Kafeik ve kuinik asitin birleşmesiyle oluşan klorojenik asit yapısı bir çok meyve türünde ve özellikle kahvede yüksek oranda bulunmaktadır. Bir fincan kahve 70-350 mg klorojenik asit içerebilir. Hem serbest hem de esterleşmiş halde bulunan kafeik asit, çoğu meyvenin hidroksisinasamik asit içeriğinin %75 ve %100 arasında değişen değerini temsil etmesi sebebiyle en fazla miktarda bulunan fenolik asittir (Manach ve ark. 2004).

### 2.1.1.2. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> fenilmetan yapısında olan fenolik bileşiklerdir. Hidroksibenzoik asitlerin yapısal farklılıkları aromatik halkadaki hidroksilasyon ve metilasyondan kaynaklanır (Macheix ve ark. 1990).



Bitkilerde genellikle eser miktarda bulunurlar. Bilinen en yaygın hidroksibenzoik asitler; *p*-hidroksibenzoik, gallik, vanilik, siringik ve salisilik asitlerdir (Balasundram ve ark. 2006).



**Şekil 2.1.1.2.1.** Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı

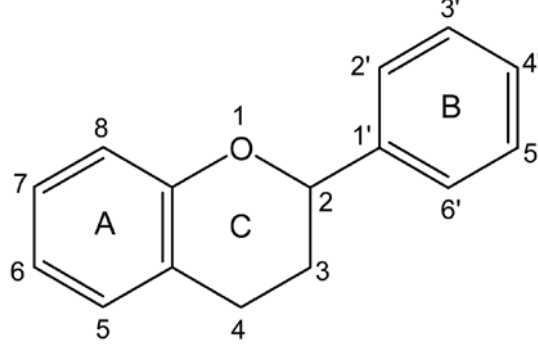
**Çizelge 2.1.1.2.1.** Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapısı

İsim	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Benzoik asit	H	H	H	H
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H
Vanilik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Protokatekuik asit	H	OH	OH	H
Siringik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Gentisik asit	OH	H	H	OH
Veratrik asit	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Salisilik asit	OH	H	H	H

## 2.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, iki benzen halkası (A ve B) ve bu halkaları birbirine bağlayan, oksijen içeren piron veya piron halkasından (C) oluşan C<sub>15</sub>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.1.2.1). Flavonoidler bitkilerde glikozit türevleri halinde buldukları gibi aglikonları halinde de bulunabilirler.

Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özellikleri sebebiyle kolaylıkla glikozitlenirler. Bitkilerde flavonoidler, hidroksilleme, metilleme ve en önemlisi glikolizleme sonucu çeşitli yapılarda bulunabilirler. Ayrıca flavonoid yapısındaki süstitüentler; hidroksil, benzil, sinamil, izofenil ve metoksil olabilir (Şahin 2011).



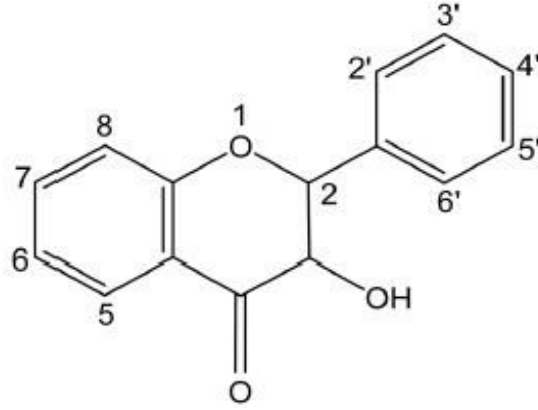
Şekil 2.1.2.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoidler, C halkasındaki değişimlere bağlı olarak flavonlar, flavononlar, flavonoller, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyaninleri oluştururlar.

#### 2.1.2.1. Flavonoller

Bu bileşikler genel olarak O-glikozitleri halinde yaygın olarak C halkasının 3 numaralı pozisyonunda bulunan hidroksil grubu ile konjuge olmuş ve 5, 7, 4', 3' ve 5' pozisyonlarında uygun süstitüentler ile glikozitleri halinde bulunurlar (Kris-Etherton ve ark. 2002, Nichenametla ve ark. 2006). Bitkilerde yaygın olarak bulunan flavonoller; kamferol, kuersetin, mirisetin ve izoramnetindir.

Flavonollerin bitkilerdeki biyosentezi ışık ile uyarıldığı için, bitkinin toprak yüzeyine yakın kısımlarda eser miktarda bulunurken, bitkilerin dışında, kabuk ve yaprakları gibi hava ile temas eden kısımlarında daha fazla birikme eğilimi gösterirler (Manach ve ark. 2004).



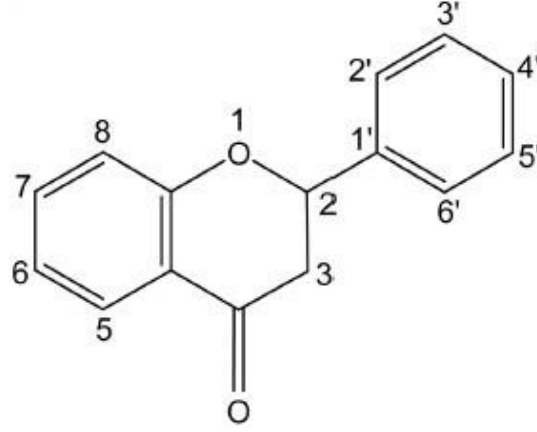
Şekil 2.1.2.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.2.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Bileşik konumu	5	7	3'	4'	5'
Kuersetin	OH	OH	OH	OH	-
Kamferol	OH	OH	-	OH	-
Galangin	OH	OH	-	-	-
Fisetin	-	OH	OH	OH	-
Mirisetin	OH	OH	OH	OH	OH

### 2.1.2.2. Flavonlar

Flavonlar, flavonollere göre meyve ve sebzelerde daha az bulunurlar. Flavon adı bu bileşik grubunu içeren bitkilerin çoğunun sarı çiçekli olmalarından ileri gelmektedir. Flavonları temel olarak luteolin ve apigenin glikozitleri oluşturur. Maydanoz ve kerevizin önemli flavon kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Manach ve ark. 2004).



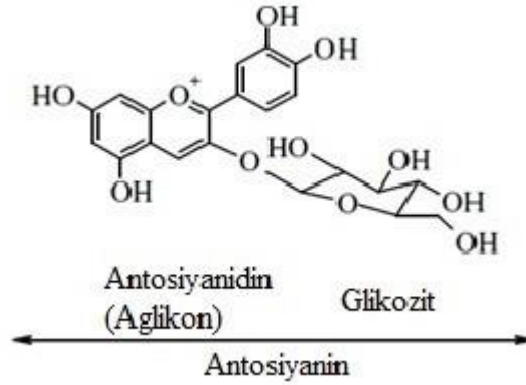
Şekil 2.1.2.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.2.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Bileşik konumu	5	7	3'	4'
Apigenin	OH	OH	-	OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Krisin	OH	OH	-	-

### 2.1.2.3. Antosiyaninler

Doğada serbest halde bulunmayan, glikozit bileşikleri halinde bulunan flavonoidlere antosiyanin adı verilir. Antosiyaninler çoğu bitki türünün pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren ve suda çözünebilen renk pigmentleridir (Castaneda-Ovando ve ark. 2009). Antosiyaninler asidik ortamda flavilyum katyonu halinde bulunurken, nötr ve bazik ortamlarda mavi renkli bileşikler haline dönüşmektedir (Ribereau-Gayon ve ark. 2000). Antosiyaninlerin şeker olmayan kısmı (aglikon), antosiyanidinler ( $C_6-C_3-C_6$ ) olarak adlandırılmaktadır. Her bir antosiyanidin farklı şeker ve asit grupları ile farklı pozisyonlarda bağlanarak çok sayıda antosiyanin oluşturabilir (Jamet ve ark. 2002).



Şekil 2.1.2.3.1. Antosiyaninin kimyasal yapısı

Antosiyaninlerin şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir. Başlıca antosiyanidinler; siyanidin, delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin ve petunidindir.

## 2.2. Bitkilerde Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

Bitkilerde bulunan flavanoid ve fenolik asitler önemli doğal antioksidan gruplardır. Bu grupların bitkilerde en önemli işlevi bitkinin savunma mekanizmasındaki aktif görevleridir. Fenolik bileşikler bitkinin gelişimi sırasında sentezlenen ve enfeksiyon, yaralanma ve UV radyasyonuna karşı koyan yapılardır (Manach ve ark. 2004). Yapılarında en az bir aromatik halka ve bir yada birden fazla hidroksil grubu bulunduran bu bileşiklerin antikanser, antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin bulunduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (Bhattacharya ve ark. 2010). Aynı bitki türünde; büyüme mevsimi, çevresel ve iklimsel koşullar, cins, bitki hastalıkları, toprak çeşidi, coğrafik bölge gibi etkenler fenolik bileşik içeriğini etkilemektedir (Sellapan ve ark. 2000). Bitkilerde bulunan fenolik maddeler; renk, acılık, tat, koku ve ürünün oksidatif stabilitesine etki etmektedir (Naczki ve ark. 2004).

### 2.2.1. Bitkilerde Fenolik Asitlerin ve Flavonoidlerin İşlevleri

Bitkinin patojenler tarafından saldırıya uğraması ve aşırı UV radyasyonuna maruz kalması nedeniyle fenolik asitler ve flavonoidler ikincil metabolitler olarak bitkide bulunurlar (Manach ve ark. 2004). Fenolik asitler ve flavonoidler ayrıca gıdalarda renk, koku, tat ve oksidatif stabilite üzerinde de etkilidirler (Naczki ve Shahidi. 2006). Gıdalarda bulunan fenolik maddeler ayrıca enzimatik esterleşme substratı, antioksidan ve antimikrobiyal etki, enzim inhibitörü ve saflık kontrol kriteri olarak önem taşımaktadır (Eruçar 2006).

### 2.3. Asteraceae Familyası

*Asteraceae* familyasına ait Türkiye florasında toplam 1209 tür ve 134 cins belirtilmekte olup tür sayısı bakımından ilk sırada gelmektedir. Bu türlerin 447'si endemiktir (Davis ve ark. 1988). *Asteraceae* familyası; gıda bitkileri, tıbbi ve ilaç bitkileri, yabancı zararlı otları ve zehirli bitkileri içermektedir. Familya türleri ilaç sanayisinde yaygın olarak kullanılır, ayrıca birçok türü de süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Rowley ve ark. 1981).

#### 2.3.1. Enginar (*Cynara scolymus* L.)

Enginar (*Cynara scolymus* L.) *Asteraceae* familyasından gövdeleri dik, sert ve boyuna oluklu olan 50-150 cm boyunda çokyıllık otsu bir bitkidir. Yaprakları sapsız, büyük, uzun-oval ve parçalıdır. Yaygın olarak Güney Avrupa ve Akdeniz çevresinde yetiştirilmektedir. Dünya genelinde yetiştirilen enginarın en önemli üreticileri İspanya ve İtalya'dır (Wang ve ark. 2003). Ülkemizde ise Ege, Marmara ve Akdeniz bölgelerinde yapılan üretimin büyük çoğunluğunu Ege ve Marmara bölgeleri karşılamaktadır.



**Şekil 2.3.1.1.** Bitkinin genel görünüşü  
(<https://herbalmateriamedica.wordpress.com/2014/04/19/cynara-scolymus>)

Enginarın yer aldığı *Cynara* cinsi içinde üç yabancı tür daha bulunur; *Cynara cardunculus* L. Akdeniz'in kıyı bölgeleri ve Latin Amerika'da yaygındır. *Cynara cyriaca* Boiss, Orta Akdeniz'de ve *Cynara sibthorpiana* Boiss ve Heldr, Yunanistan ve Ege adalarında yaygındır. Kültürü yapılan enginar *Cynara scolymus* L. ise *Cynara cardunculus* L.'in değişime uğraması ile meydana gelmiştir.



**Şekil 2.3.1.2.** *Cynara scolymus* L. (<http://dietetica.casapia.com/>)

Enginar yaprağında bulunan fenoliklerin koleretik, antihepatotoksik, diüretik, kolesterol düşürücü (Rabaneda ve ark. 2003), antibakteriyel, antioksidan ve anti-HIV (Wang ve ark. 2003), özelliklerde etkili olduğu birçok çalışmada raporlanmıştır.

### **2.3.2. Enginarda Bulunan Fenolik Asitler ve Flavonoidler**

Enginar yaprağı flavonoid ve fenolik asit içeriğiyle önemli bir fenolik madde kaynağıdır. Enginar yaprağında bulunan kafeol kuinik asit türevleri ve flavonoid olan luteolin ve apigenin glikozitlerinin enginar yaprağında ağırlıklı olarak güçlü antioksidan etkiler gösterdiği birçok çalışmada raporlanmıştır (Wang ve ark. 2003, Schutz ve ark. 2004, Pandino ve ark. 2011).

Enginar yaprağı ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin, karaciğer ile ilgili detoksifikasyon reaksiyonlarını arttırdığı, safra söktürücü etki ve koleretik etki gösterdiği raporlanmıştır. Ayrıca karaciğerdeki kanın kolesterol seviyesini düşürdüğü, diğer dokularda ve karaciğerdeki yağ birikimini azalttığı da belirtilmiştir (Mulinacci ve ark. 2003).

Enginar atığı olarak çalışılan enginar yaprağında LC-MS/MS yöntemi ile 45 adet fenolik bileşik tespit edilmiştir. Tespit edilen fenolik bileşiklerin bir kısmında standart ile karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmada kafeik asit, klorojenik asitin farklı türevleri ve dikafeolquinik asit çalışmada önemli fenolik maddeler olarak tespit edilmiştir (Rabaneda ve ark. 2003).

Enginar ekstraktlarında yüksek miktarda bulunan luteolin ve onun glikoziti luteolin-7-o-glikozit, kafeol kuinik asit türevlerinin ve özellikle klorojenik asit (5-kafeol kuinik asit) ve sinarinin (1,3-dikafeol kuinik asit) koleretik aktiviteye, kolesterol düşürücü özelliğe, antibakteriyel ve antioksidatif özelliğe sahip olduğu bir çok kez raporlanmıştır (Adzet ve ark. 1987, Gebhart ve ark. 1997, Rodriguez ve ark. 2002, Micedei ve ark. 2008).



## **2.4. Analitik Yöntemler**

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerle ilgili çok sayıda çalışma gerçekleştirilmektedir. Bitkilerde fenolik bileşiklerin analizi ilk olarak ekstraksiyon işlemi ile başlamaktadır. (Şahin 2011).

Tüm bu ekstraksiyon yöntemlerinde temel prensip; belirli fenolik asitlere ve bu fenolik asitlerin belirli formlarına uygun ekstraksiyon yöntemini kullanmaktır. Çözünebilen fenolik asitler metanol, aseton, su veya bunların belirli oranda karışımlarından oluşan çözücülerle ekstrakte edilirken, bağlı halde bulunan fenolik asitler asit, alkali veya hem asit hem alkali hidrolize tabi tutularak ekstrakte edilmektedir (Tuncel ve Yılmaz. 2010).

Fenolik maddelerin ekstraksiyonunda özellikle çözgen ekstraksiyonu yöntemi kullanılırken, fenolik bileşiklerin belirlenmesinde ise genellikle kromatografik teknikler kullanılmaktadır (Borneman ve ark. 1997).

Bitkilerde fenolik asit ve flavonoidlerin belirlenmesinde sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılabilir (Stalikas ve ark. 2007).

Ekstraksiyon aşamasında yaygın olarak C18 ya da anyon değiştirici kartuşların kullanıldığı, katı faz ekstraksiyon ve etil asetat, dietil eter gibi organik çözücülerin kullanıldığı sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulanmaktadır (Rodriguez-Delgado ve ark. 2001).

### **2.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri**

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu; fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları, uygulanan ekstraksiyon yöntemi, muhafaza süresi ve koşulları ve girişim yapan maddelerin varlığı gibi faktörler etkilemektedir (Shahidi ve Nacz 2004).

Polar olan fenolik asitler (benzoik asit, sinamik asit) saf organik çözücüler ile tam olarak ekstrakte edilemezler, dolayısıyla alkol-su, aseton-su karışımları bu olumsuzluğu çözmek adına önerilmektedir.

Fenolik maddeler dışındaki polar olmayan yabancı bileşiklerin (vakslar, yağlar, steroller, klorofiller) bitkiden ayrılmasında ise diklorometan, kloroform, hekzan ve benzen gibi polar olmayan çözücüler önerilmektedir. Ayrıca pH, sıcaklık, örnek-çözücü hacmi oranı, zaman aralıkları ekstraksiyon yönteminde rol oynayan önemli faktörlerdir. Soxhlet ekstraksiyonu katı örneklerden flavonoidleri izole etmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Çoğu durumda sulu metanol ya da asetonitril çözücü olarak kullanılmaktadır. Literatürde bu ekstraksiyon yönteminde ekstraksiyon süresi yaklaşık olarak 12 saat olarak belirlenmiştir (Stalikas 2007).

Süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminde ise yüksek sıcaklığa ve oksijene uzun süre maruz kaldığında örnekte ortaya çıkan bozunma ürünlerinden arınmış temiz ekstrakt elde edilir. Ek olarak süperkritik CO<sub>2</sub>'de çözünmeyen klorofil ve diğer polar olmayan türleri de içermez. Bu teknik aynı zamanda bitki örneklerinde, diğer örnek hazırlama teknikleri ile de kombine edilebilir (Stalikas 2007).

#### **2.4.2. Kromatografik Teknikler**

Fenolik bileşiklerde bulunan farklı yapısal grupları tayin etmek için kullanılan yöntemlerin dayandığı temel ilkeler birbirinden farklılık göstermektedir. Fenolik bileşiklerin ayrılması ve kantitatif tayinlerinde kromatografik teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır (Şahin 2011).

Fenolik madde profilinin belirlenmesi amacıyla sıvı kromatografisi, sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi (LC-MS), gaz kromatografisi – kütle spektrometresi (GC-MS), ince tabaka kromatografisi (TLC) ve kapiler elektroforez (CE) yöntemleri kullanılabilir. Fenolik asit ve flavonoidlerin analizinde en yaygın olarak kullanılan teknik ise ters faz sıvı kromatografisidir (Tuncel ve Yılmaz 2010).

Ters faz kolon kullanımı ile HPLC de fenolik maddelerin ayrımı daha duyarlı hale gelmiştir. Bitkilerde bulunan fenolik maddelerin analizi, DAD ve UV dedektörleri kullanılarak yapılmaktadır (Shahidi ve Nacz 2004).

Polifenolik maddelerin kromatografik analizlerinde alıkonma süresi temel alınmaktadır. Sıvı kromatografisinde bileşiklerin kimyasal yapısına bağlı olarak alıkonma süreleri değişmektedir. Hidroksillenmiş ve glikozitlenmiş fenoliklerin alıkonma süreleri kısa iken, metilenmiş veya açillenmiş fenoliklerin alıkonma süreleri daha uzundur (Öztaş 2006).

Gaz kromatografisi ile fenolik bileşiklerin analizinde görülen tek dezavantaj bileşiklerin sahip olduğu sınırlı uçuculuk özellikleridir. GC tekniğinin avantajı ise izomeri olan fenolik bileşiklerin kütle dedektörü (MS) kullanılarak ortaya çıkan parçalanma ürünlerinden yola çıkarak tayin edilmesinin mümkün olmasıdır (Schmidt ve ark. 1994).

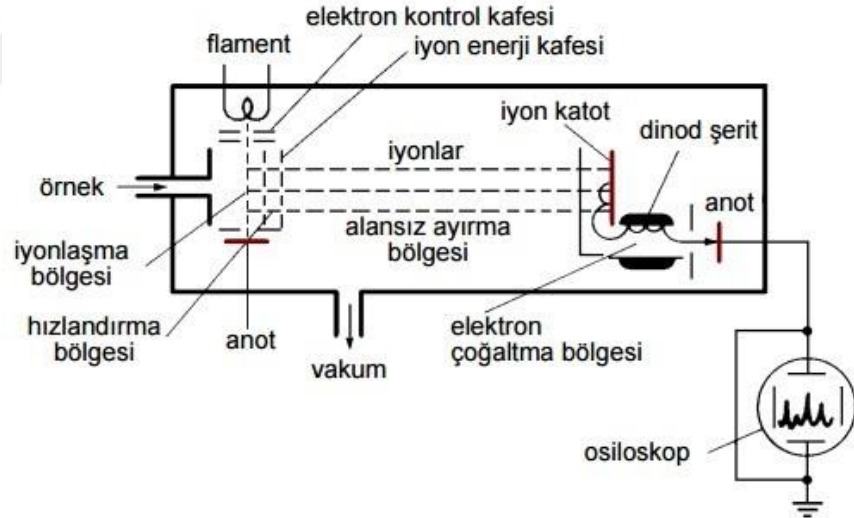
#### **2.4.2.1. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-QTOF-MS)**

Bu teknik, sıvı kromatografisinde fiziksel özelliklerine göre ayrılan bileşenlerden oluşturulan iyonların ilk olarak kütle/yük oranlarına göre ayrıldıktan sonra uçuş zamanlarına bağlı olarak kütlelerin ayrımını sağlamaktadır. Çok düşük derişimde bile örneğin içindeki fenolik maddenin tespitini mümkün hale getirmektedir.

Kuadropol analizöründe, örnek kromatografi kolonunda fiziksel özelliklerine göre ayrıldıktan sonra kütle spektrometresinin girişinde bulunan bir transfer hattında iyonlar ve elektron şok iyon kaynağıyla (elektron-iyonizasyon) ve kimyasal iyonizasyon ile iyonlaştırılarak parçacıklara ayrılır. Kuadropol analizörler dört paralel çubuktan oluşmaktadır. Bu çubuklardan karşılıklı olanlar aynı polariteye sahipken yan yana olanlar zıt polariteye sahiptirler. Her bir çubuğa doğru akım ve radyo frekans voltajı uygulanır. Kuadropol voltajları değiştirilerek iyonlar taranır. Uygulanan radyo frekans alanında sadece belirli kütle/yük oranına sahip iyonlar osilatör yolunu izleyebilirler. Kuadropolde doğru akım ve radyo frekans alanları birleştirildiğinde tanecikler merkez eksenini etrafında titreşim yaparak hareket ederler. Böylelikle uygulanan voltaj ile birlikte taneciklerin çubuklardan biri ile karşılaştırılarak saptırılmadan bazı m/z oranındaki taneciklerin geçmesine olanak sağlanır.

TOF (Uçuş zamanlı) kütle spektrometresinde ise, kısa süreli bir elektron pulsu oluşturularak elektron bombardımanı ile pozitif iyonlar üretilir. Delikli bir levha ile kontrolü sağlanan bu pulsların frekansı 10000 Hz ve ömrü 0.25 s kadardır. Üretilen iyonlara iyonizasyon pulsu uygulanarak aynı frekanstaki elektrik alanı pulsu ile hızlandırılırlar. Hızlandırılan bu tanecikler elektrik alanı olmayan bir ayırma tüpüne girerler. Ayırma tüpüne taneciklerin tamamının kinetik enerjileri aynıdır. Bu sebeple taneciklerin her birinin hızı, kütleleri ile ters orantılı olacak şekilde farklı olur ve daha hafif kütleli tanecikler kollektöre daha kısa zamanda ulaşır. Böylelikle ayırım sağlanmış olur.

Uçuş zamanlı kütle spektrometrelerinde dedektör bir elektron çoğaltıcı tüptür. Tüpün çıkışında katot ışını, osiloskopun dikey döndürme levhalarına ulaştırılır ve yatay tarama hızlandırma pulsları ile senkronize edilir. Böylece kütle spektrumunun tamamı osiloskop ekranında hemen görüntülenir ([http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle\\_1.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_1.pdf)).



**Şekil 2.4.2.1.1.** Uçuş zamanlı bir kütle spektrometresinin şematik görünümü ([http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle\\_1.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/kutle_1.pdf)).

### 2.4.3. Spektroskopik Teknikler

Bitkilerin toplam fenol ve antioksidan kapasite tayinleri yaygın olarak spektroskopik yöntemlerle yapılmaktadır.

#### 2.4.3.1. Toplam Fenol Tayini

Bitki ve gıda matrikslerinin spektroskopik toplam fenol tayinlerinde en yaygın kullanılan yöntem Folin-Ciocalteu yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak 1927 yılında tirozin analizi için geliştirilmiştir. Daha sonra 1965 yılında Singleton ve Rossi tarafından molibdotungstosforik heteropolianyon reaktifi kullanılarak fenol tayini için yenilenmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemi polimerizasyon derecesinden bağımsız duyarlı ve kantitatif bir yöntemdir. Bu yöntemde fenolik maddeler arasında hiçbir fark bulunmaksızın kolorimetrik yükseltgenme-indirgenme ölçümleri gerekmektedir.

Folin-Ciocalteu reaktifi heteropolifosfotungstat-molibdat içeren bir oksidasyon belirteçidir. Reaksiyon sonucu oluşan mavi renkli ürün,  $P_2W_{18}O_{62}^{7-}$  'den  $H_4P_2W_{18}O_{62}^{6-}$  'ya kadar olan tungstat serisindeki 1, 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri ile  $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$  'den  $H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$  kadar olan molibdat serisindeki 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri karışımından oluşur (Şahin 2011).

Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol tayininde daha doğru sonuca ulaşabilmek için; alkali ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi ile uygun hacimlerde çalışılmalı, renk oluşumu için en uygun zaman, sıcaklık belirlenmeli ve referans standart madde olarak gallik asit kullanılmalıdır.

#### 2.4.3.2. Antioksidan Kapasite Tayini

Antioksidanların oksidatif stres ile ilgili rahatsızlıkların önlenmesindeki pozitif etkilerinden dolayı antioksidanlara olan ilgi artış göstermiştir. Bu ilgi sebebiyle gıdaların antioksidan kapasitesini ve içeriğindeki bileşikleri öğrenmek beslenme, sağlık ve gıda bilimi açısından önem kazanmaktadır.

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından temel olarak iki sınıf altında toplanır.

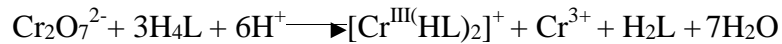
- Elektron transferi reaksiyonuna dayanan yöntemler
- Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayanan yöntemler

Elektron transferi reaksiyonuna dayanan analiz yöntemleri antioksidan maddenin, indirgenildiğinde renk değişimine uğrayan bir oksidasyon maddeyi, indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişimindeki seviye numunedeki antioksidan derişimi ile orantılıdır. Elektron transferine dayanan başlıca yöntemler; Folin, CUPRAC (Apak ve ark. 2007), ABTS (Re ve ark. 1999), DPPH (Sanchez-Moreno ve ark. 1998) ve CHROMAC (Işık ve ark. 2013) yöntemleridir.

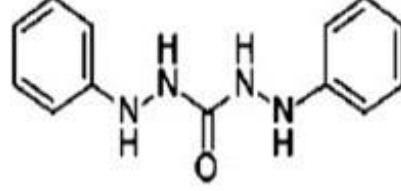
Hidrojen atomu transferine dayanan analiz yöntemlerinin çoğunda azo bileşiklerinin bozunması sonucu oluşan peroksi radikallerinin antioksidan ve substrat tarafından yarışmalı bir şekilde giderilmesi prensibine dayanmaktadır. Burada antioksidan ve substrat, azo bileşiklerinin ısıl bozunmasından üretilen peroksil radikalleri (ROO<sup>•</sup>) için yarışırlar. Hidrojen atomu transferine dayanan başlıca yöntemler; ORAC, TRAP ve indüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otoksidasyonu yöntemleridir.

Çalışma kapsamımız gereği CHROMAC metodunu ayrıntılı olarak inceleyeceğiz: CHROMAC yönteminde, n-elektrona sahip indirgen antioksidan maddelerle pH 2,8’de yükseltgen madde olarak kullanılan dikromat tepkimeye girer. Çalışma koşullarında kullanılan örnek hacmi x mL (<0,50 mL), tampon hacmi 3,5 mL (pH 2,8 fosfat tamponu), potasyum dikromat çözeltisinin (3,4x10<sup>-4</sup> M) hacmi ise 0,50 mL’dir. CHROMAC yönteminde, asidik ortamda aşırı Cr(VI) ile reaksiyona giren fenolik maddeler fenoksil radikallerine dönüşür, Cr(VI) ise Cr(III) formuna indirgenir.

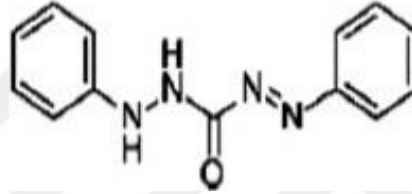
Reaksiyon sonucu geriye kalan Cr(VI) ise ortama eklenen 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit (3.4x10<sup>-4</sup> M) ile pH 2,8’de reaksiyona girerek Cr(III)-difenilkarbazon şelatını oluşturur.



Difenilkarbazit ve difenilkarbazonun yapıları Şekil 2.4.4.2.1 ve Şekil 2.4.4.2.2'de gösterilmiştir:



Şekil 2.4.3.2.1. H<sub>4</sub>L Difenilkarbazitin yapısı



Şekil 2.4.3.2.2. H<sub>2</sub>L Difenilkarbazonun yapısı

Toplam hacim 5 mL'ye su ile tamamlanır (0,50-x mL su eklenir). Reaksiyon sonucu oluşan Cr(III)-difenilkarbazon şelatı 540 nm'de maksimum absorbans yapmaktadır. Buna göre fenolik maddeler için absorbans değeri eşitlik 2-1'de gösterildiği gibi hesaplanır:

$$A_{\text{Geriyeye kalan}} = A_{\text{Blank}} - A_{\text{Örnek}} \quad 2-1$$

$A_{\text{Blank}}$ : Antioksidan içermeyen, tüm reaktif maddenin ve aşırı Cr(VI) bulunduğu çözeltide, Cr(VI) ve 1,5-difenilkarbazit birleşiminin oluşturduğu yükseltgenme-indirgenme tepkimesi sonucu oluşan Cr(III)-difenilkarbazon şelatının absorbans değeri,  $A_{\text{Geriyeye kalan}}$ : Fenolik madde ile reaksiyon sonucu geriye kalan Cr(VI) ve 1,5-difenilkarbazit oluşturduğu Cr(III)-difenilkarbazon şelatının absorbans değeridir. CHROMAC yönteminde blank örnek için pH 1,2 monosodyumsitrat-HCl (0,1 M) tamponu 3,5 mL ortama eklenerek kullanılır. Standart kalibrasyon grafikleri için farklı derişimlerdeki troloks çözeltileri kullanılarak absorbans ( $A_{\text{Geriyeye kalan}}$ ) ile derişim arasında grafik çizilir (Işık ve ark. 2013)

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler**

###### **3.1.1.1. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi(LC-QTOF-MS)**

Çalışmada Agilent marka HPLC 1260 infinity QTOF 6550 ifunnel model sıvı kromatografisi-uçuş zamanlı kütle spektrometresi kullanılmıştır. Negatif iyonlaştırma modunda çalışılmıştır. Analitik kolon olarak Agilent Poroshell C18 kolonu (4.6 mm x 100 mm x 2.7 µm) kullanılmıştır.

###### **3.1.1.2. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-VIS)**

Çalışmada Agilent marka Cary 60 model UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır. Ölçümler 1 cm kuvarz hücreler kullanılarak yapılmıştır. Cihazın dalgaboyu aralığı 200-800 nm arasındadır.

###### **3.1.1.3. Ultra Saf su Cihazı**

Analizler sırasında kullanılan ultra saf su, MP marka Dest up model ultra saf su cihazından temin edilmiştir. Ultra saf suyun saflığı 18,25 MΩ×cm değerindedir.

###### **3.1.1.4. Analitik Terazı**

Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması için ±0,0001 hassasiyete sahip Denver Instrument marka SI-234 model analitik terazi kullanılmıştır.

###### **3.1.1.5. Döner Buharlaştırıcı**

Deneyisel çalışma sırasında metanolün uçurulması aşamasında Bibby RE 301×RE 300 marka cihaz RE 100 EA adaptörü ile kullanılmıştır.



### **3.1.1.6. Manyetik Karıştırıcı**

Örneklerin ekstrakte edilmesi amacıyla Stuart marka US152 model manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

### **3.1.1.7. Ultrasonik Banyo**

DeneySEL çalışmalar sırasında örneğin ekstraksiyonu ve çözeltilerin hazırlanması için UNITED Ultrasonic Cleaner marka ultrasonik banyo kullanılmıştır.

### **3.1.1.8. pH Metre**

Çalışmada HANNA Instruments marka HI 2211 model pH metre kullanılmıştır.

## **3.1.2. Çalışmada Kullanılan Bitki Türü**

Bu çalışmada ülkemizin çoğunlukla Marmara ve Ege bölgesinde yayılış gösteren Asteraceae (papatyagiller) familyasına bağlı *Cynara* cinsinin; *Cynara scolymus* türü analiz edilmiştir.

## **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler**

### **3.1.3.1. Kimyasallar**

#### **3.1.3.1.1. Analitik Saflıktaki Kimyasallar**

Merck, Metanol, 1.06018.2500

Merck, Etanol, 1.02371.2500

Merck, Butanol, 1.01988.2500

Merck, Kloroform, 1.02444.2500

Merck, Etil asetat, 1.00868.2500

Merck, Sodyum karbonat (susuz), 1.06393.1000

Merck, Sodyum hidroksit, 1.06469.1000

Merck, Bakır sülfat, 1.02791.1000

Merck, Sodyum potasyum tartarat, 1.08087.1000  
Merck, Amonyum asetat, 1.01116.0500  
Merck, Potasyum dikromat, 1.04865.0500  
Merck, Sodyum dihidrojen fosfat (susuz), 1.06370.0050, %99.9

### **3.1.3.1.2. Diğer Kimyasallar**

Sigma-Aldrich, Gallik asit, G7384  
Sigma-Aldrich, Vanilik asit, V2250  
Merck, Kafeik asit, 822029  
Sigma-Aldrich, Siringik asit, 63627, %98  
Sigma-Aldrich, 3-kumarik asit, 92649, %95  
Sigma-Aldrich, 4-kumarik asit, C9008, %98  
Sigma, Klorojenik asit, C3878,  
Sigma, Neoklorojenik asit, 91213, %95  
Merck, Ferulik asit, 822070  
Sigma-Aldrich, Hidroksitirosol, 91404, %98  
Sigma-Aldrich, Tirosol, 79058, %99,5  
Sigma-Aldrich, Epigallokateşin, E3768, %95  
Sigma-Aldrich, Kateşin, 43412, %99  
Sigma-Aldrich, Kuersitrin, 83389, %97  
Sigma-Aldrich, Naringin, 71162, %95  
Sigma-Aldrich, cis-Resveratrol, 34092  
Sigma-Aldrich, Kamferol, K0133  
Sigma-Aldrich, Luteolin, 72511, %97  
Sigma-Aldrich, Apigenin, 42251, %99  
Sigma-Aldrich, Kuersetin, Q4951, %95  
Sigma-Aldrich, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, F9252  
Acros, Troloks [(±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid], 21894  
Sigma-Aldrich, 1,5-difenilkarbazit, 259225

### **3.1.3.2. Sarf Malzemeler**

10-100 µl aralıklı mikropipet (Dragonlab)

100-1000 µl aralıklı mikropipet (Dragonlab)

1000-5000 µl aralıklı mikropipet (Dragonlab)

Millipore Millex-HV hidrofilik 0,45 µm'lik PVDF membran filtre

### **3.1.3.3. Çözeltiler**

#### **3.1.3.3.1. Standart Fenolik Maddeler İle Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması**

Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-QTOF-MS) cihazında gerçekleştirilen analiz için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. 10 mg/L stok çözelti kullanılarak gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, 3-kumarik asit, 4-kumarik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, ferulik asit, hidroksitirozol, tirozol, epigallokateşin, kateşin, kuersitrin, naringin, cis-resveratrol, kamferol, luteolin, apigenin ve kuersetin fenolik bileşikleri için 0,0312; 0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,5000; ve 1,0000 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltiler metanol içerisinde çözülmüştür.

#### **3.1.3.3.2. Toplam Fenol Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 0,4000 g NaOH bir miktar ultra saf suda çözülerek hacmi ultra saf su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%2 sodyum karbonat çözeltisi: 2,0000 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bir miktar ultra saf suda çözülerek hacmi ultra saf su ile balon jojede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

%0,5 bakır sülfat ve %1 sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 0,5000 g CuSO<sub>4</sub> ve 1,0000 g NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> bir miktar ultra saf suda çözülerek hacmi ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### **3.1.3.3.3. Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

pH 2,8 fosfat tamponu: 6,2400 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_3$  ve 0,6800 mL  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (%85'lik) karıştırılarak ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

Potasyum dikromat çözeltisi: 0,1000 g  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  bir miktar ultra saf suda çözülerek hacmi ultra saf su ile balon jodede 100 mL'ye tamamlanmıştır.

1,5-difenilkarbazit çözeltisi: 0,1000 g 1,5-DFK (difenil karbazit), 70 mL aseton ve 30 mL pH 2,8 fosfat tamponu karıştırılarak hazırlanmıştır.

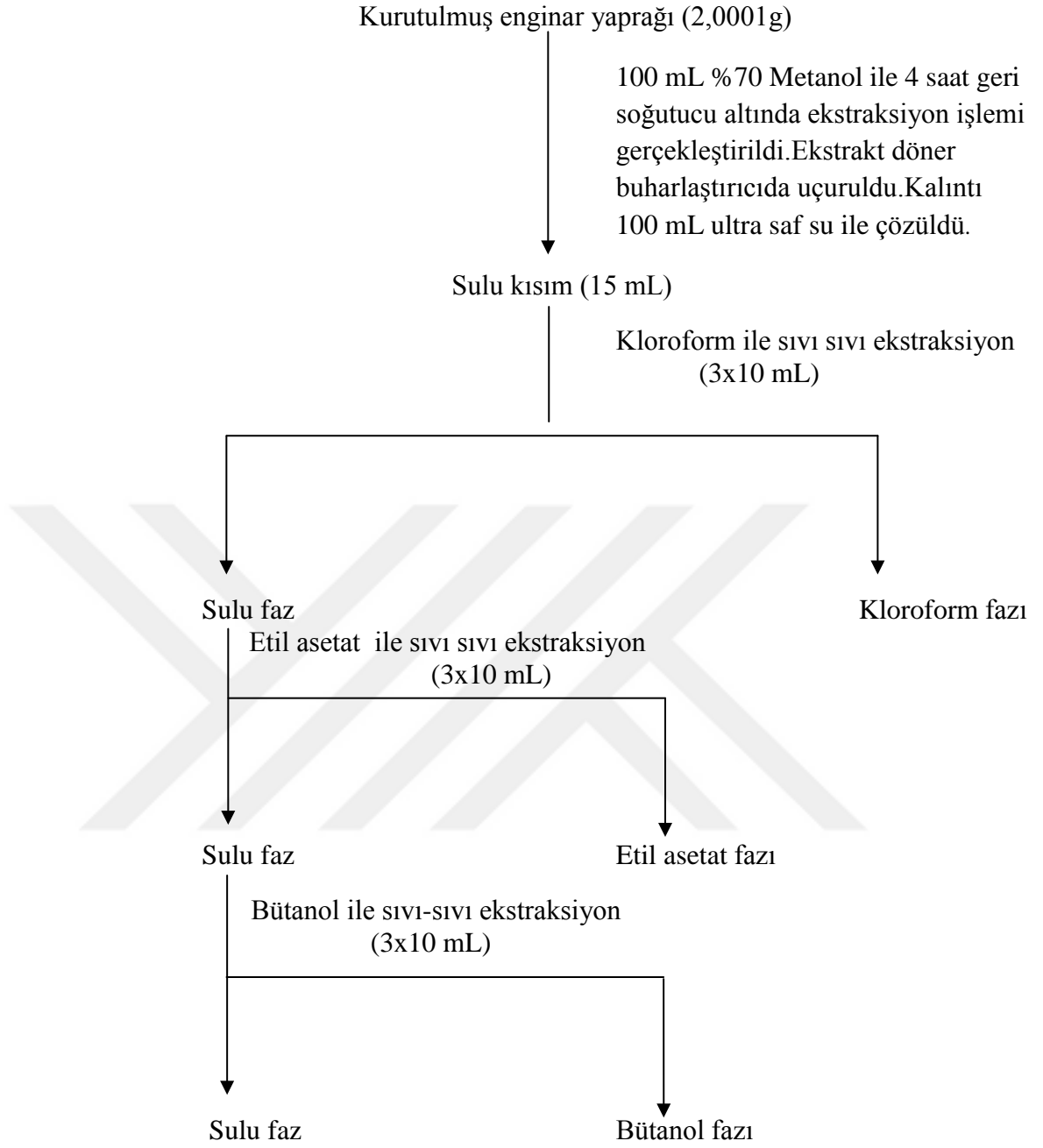
## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Bitkinin Toplanması ve Analize Hazırlanması**

Tez kapsamında analizi gerçekleştirilen *Cynara scolymus* türü enginar Bursa ilinden temin edilmiştir. Enginarın baş kısmında bulunan brakte yaprakları kurutulduktan sonra kaba öğütme işlemi yapılarak homojen hale getirilmiştir. Örnekler spektroskopik ve kromatografik analizler için buzdolabında 2-8 °C'de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu**

Homojen hale getirilmiş örnekten belirli miktarda alınarak %70 metanol ile geri soğutucu altında ekstrakte edildikten sonra kloroform, etil asetat ve bütanol çözücüleri kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örneğin ekstraksiyonunda uygulanan işlemler aşağıdaki Şekil 3.2.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.2.1. Enginar yaprağı ekstraksiyon akış şeması

### 3.2.3. Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC-QTOF-MS) ile Fenolik Bileşiklerin Tayini

*Cynara scolymus* türü enginar yapraklarındaki fenolik bileşiklerin analizi Agilent 1260 Infinity 6550 Funnel LC-QTOF-MS cihazı ile analiz edildi. LC-QTOF-MS cihazı ile fenolik bileşiklerin analizinde iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonlaşma, iyon modu olarak negatif mod tercih edilmiştir. Kolon olarak Agilent Poroshell C18 (100 mm x 4,6 mm, i.d. 2.7 µm) kolonu ile 5 µL enjeksiyon hacminde 0,6 mL/dk akış hızı ile çalışıldı. Analiz sırasında 5 mM amonyum asetat içeren su ve metanolden oluşan gradient çalışma programı uygulandı. Toplam analiz süresi 33 dk olup, LC-QTOF-MS için gradient çalışma koşulları çizelge 3.2.3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.3.1. LC-QTOF-MS için analiz çalışma koşulları**

Zaman(dakika)	A [%]	B [%]
0,0	95,0	5,0
0,5	95,0	5,0
25,0	5,0	95,0
28,0	5,0	95,0
28,10	95,0	5,0

A: 5 mM Amonyum asetat, B: Metanol

**Çizelge 3.2.3.2. QTOF Şartları**

İyonlaştırma modu	
Negatif	
İyonlaştırma Şartları	
Gaz sıcaklığı	175 °C
Kurutma gazı	14,0 L/dk
Sisleştirici	45 psig
Sheath gaz sıcaklığı	350 °C
Sheath gaz akışı	11 L/dk
Fragmentör	300 V
OCT 1 RF Vpp	750 V
Soğutucu	65 V
Püskürtücü	1000 V
Belirleme	
Kütle aralığı	100-1500 m/z
Tarama hızı	2 spektrum/s
Zaman	500 ms/spektrum

### 3.2.4. Folin-Ciocalteu Yöntemi ile Toplam Fenol Tayini

Ekstraksiyon çalışmaları sonucu elde edilen ekstraktlar için toplam fenol tayinleri çalışmalarında standart madde olarak gallik asit kullanıldı. Stok Folin çözeltisi, 1/3 oranında (5 mL folin çözeltisi + 10 mL saf su) seyreltilerek analizde kullanıldı. 0,1 M NaOH içinde %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> olacak şekilde Lowry A çözeltisi ve %1'lik NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> içinde %0,5'lik CuSO<sub>4</sub> olacak şekilde Lowry B çözeltisi hazırlandı. Lowry A ve Lowry B den 50:1 (v/v) oranında karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlandı. Analiz tüplerine sırasıyla 0,1 mL ekstrakt, 1,9 mL saf su, 2,5 mL Lowry C ve 0,25 mL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler 30 dk kadar karanlıkta bekletilerek, 750 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirildi (Folin ve Ciocalteu, 1927).

Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden faydalanarak ekstraktların (%70 metanol, su, etil asetat, bütanol ve kloroform) toplam fenol değerleri (mg gallik asit/g kuru madde) belirlendi. Toplam fenol ölçümlerinde etil asetat, butanol, kloroform ve su ekstraktları azot gazı altında uçurulduktan sonra metanolde çözülmüştür.

### 3.2.5. CHROMAC Yöntemi ile Antioksidan Kapasite Tayini

Enginar yaprağı ekstraktlarındaki antioksidan kapasite değerleri CHROMAC yöntemi ile belirlendi. Standart kalibrasyon grafiği için farklı derişimlerdeki troloks çözeltileri kullanılarak absorbans ile derişim arasında grafik çizildi. Çalışma koşullarında kullanılan örnek hacmi x mL (<0,50mL), tampon hacmi 3,5 mL (pH 2,8 fosfat tamponu), potasyum dikromat çözeltisinin ( $3,4 \times 10^{-4}$  M) hacmi ise 0,50 mL'dir.

CHROMAC yönteminde, asidik ortamda aşırı Cr(VI) ile reaksiyona giren fenolik maddeler fenoksil radikallerine dönüşür, Cr(VI) ise Cr(III) formuna indirgenir. Reaksiyon sonucu geriye kalan Cr(VI) ise ortama eklenen 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit ( $3,4 \times 10^{-4}$  M) ile pH 2,8'de reaksiyona girerek Cr(III)-difenilkarbazon şelatını oluşturur. Toplam hacim 5 mL'ye su ile tamamlanır (0,50-x mL su eklenir). Reaksiyon sonucu oluşan Cr(III)-difenilkarbazon şelatı 540 nm'de maksimum absorbans yapmaktadır. Potasyum dikromat çözeltisi ilavesinden sonra 1 dk karıştırıldı ve ardından 1,5-

difenilkarbazit ( $3.4 \times 10^{-4}$  M) çözeltisi eklenerek tekrar karıştırıldı ve 50 dk bekletildikten sonra absorbans okuması gerçekleştirildi (Işık ve ark. 2013).

Hazırlanan kalibrasyon grafiğinden faydalanarak ekstraktların (%70 metanol, su, etil asetat, bütanol ve kloroform) antioksidan kapasite değerleri (mg troloks/g kuru madde) belirlendi. Antioksidan kapasite ölçümlerinde etil asetat, butanol, kloroform ve su ekstraktları azot gazı altında uçurulduktan sonra metanolde çözülmüştür.



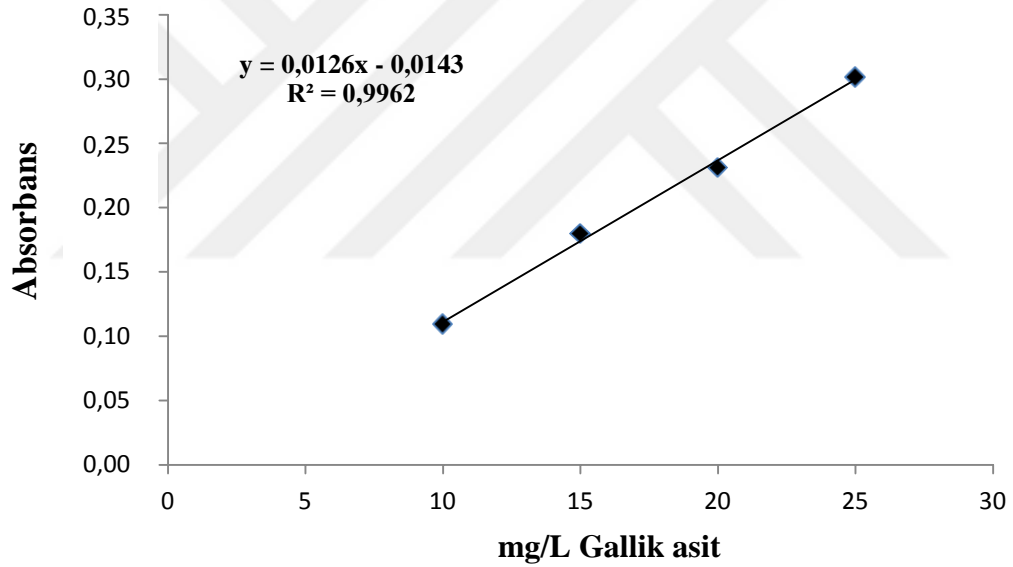


## 4. BULGULAR

### 4.1. Spektroskopik Yöntemler

#### 4.1.1. Toplam Fenol Tayini

Elde edilen %70 metanol, etil asetat, butanol, kloroform ve su ekstraktlarının toplam fenol tayinleri Bölüm 3.2.4'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği Şekil 4.1.1.1'de gösterildiği gibi standart madde gallik asit kullanılarak 10-25 mg/L derişim aralığında çizildi.



Şekil 4.1.1.1. Standart gallik asit kalibrasyon grafiği

**Çizelge 4.1.1.1.** Folin-Ciocalteu metodu ile enginar yaprağının % 70 metanol, butanol, etil asetat, kloroform ve su ekstraktlarında belirlenen toplam fenol miktarları (mg gallik asit/g kuru madde)

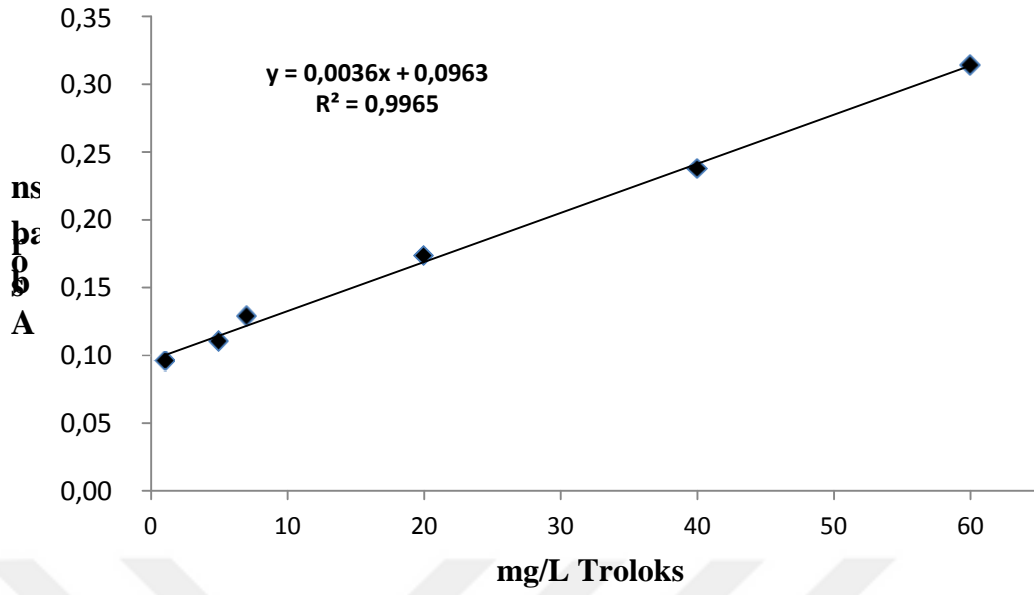
<b>Ekstraktlar</b>	<b>Toplam fenol (mg GA/g kuru madde)</b>
Metanol (%70)	864,80±2,12
Su	397,91±0,80
n-Butanol	48,66±0,14
Etil asetat	43,38±0,07
Kloroform	43,13±0,14

GA: Gallik asit

Toplam fenol miktarlarının %70 Metanol ve su ekstraktlarında diğerlerine göre daha fazla miktarda tespit edildiği Çizelge 4.1.1.1’de görülmektedir.

#### **4.1.2. Antioksidan Kapasite Tayini**

Enginar yaprağından elde edilen %70 metanol, etil asetat, butanol, kloroform ve su ekstraktlarının antioksidan kapasitesi CHROMAC yöntemi kullanılarak Bölüm 3.2.5’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafiği şekil 4.1.2.1’de gösterildiği gibi standart madde troloks kullanılarak 1-60 mg/L derişim aralığında çizildi. Çizelge 4.1.2.1 enginar yaprağı ekstraktlarının CHROMAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerini göstermektedir.



Şekil 4.1.2.1. Standart troloks kalibrasyon grafiği

**Çizelge 4.1.2.1.** CHROMAC yöntemi ile enginar yaprağının % 70 metanol, butanol, etil asetat, kloroform ve su ekstraktlarında belirlenen antioksidan kapasite miktarları (mg troloks/g kuru madde)

Ekstraktlar	Antioksidan kapasite (mg TE/g kuru madde)
Metanol (%70)	270,00±9,02
Su	128,68±2,85
n-Butanol	52,93±0,10
Etil asetat	38,94±0,18
Kloroform	35,91±4,11

TE: Troloks eşdeğeri

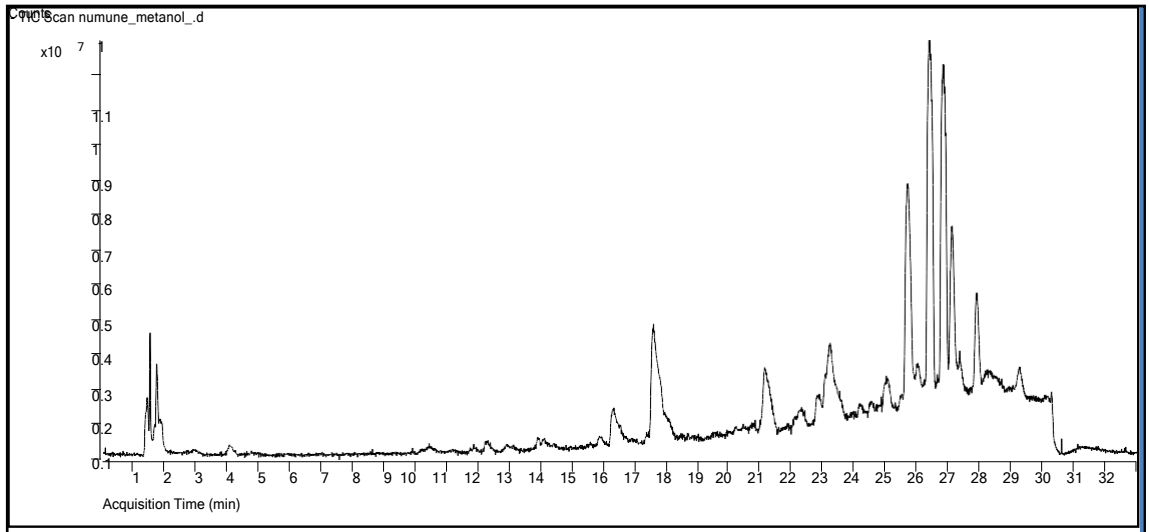
Antioksidan kapasite miktarlarının %70 Metanol ve su ekstraktlarında diğerlerine göre daha fazla miktarda tespit edildiği Çizelge 4.1.2.1’de görülmektedir. Aynı zamanda antioksidan kapasite değerleri ile toplam fenol değerleri arasında doğrusal bir ilişki görülmektedir.

## 4.2. Kromatografik Yöntem

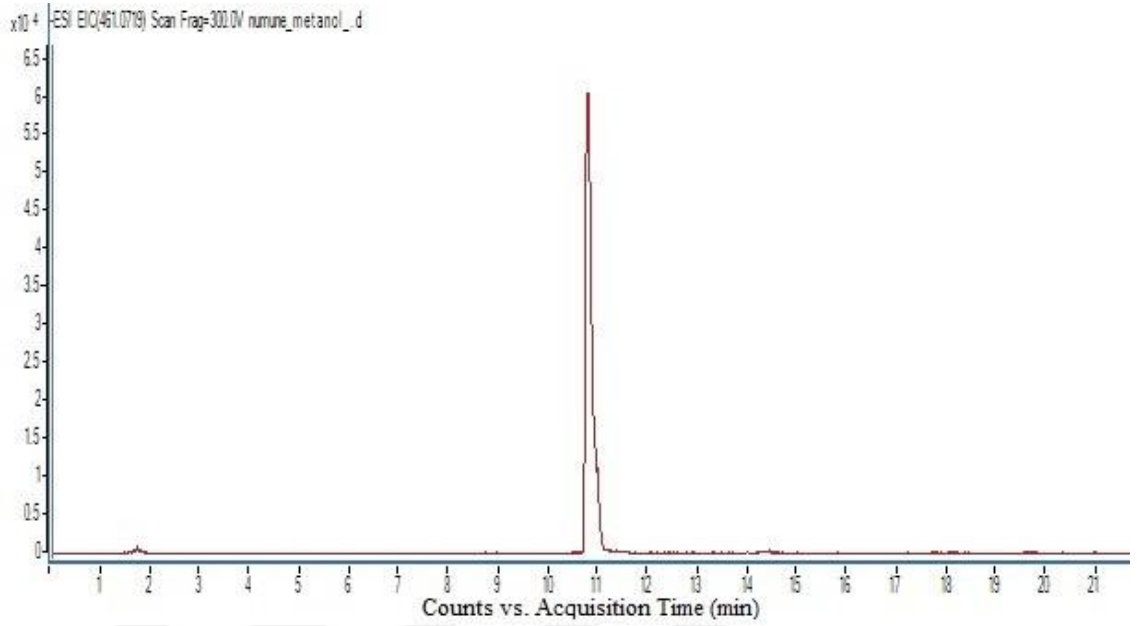
### 4.2.1. LC-QTOF-MS Tekniği ile Enginar Yapradıında Bulunan Fenolik Maddeler

LC-QTOF-MS cihazı için standart fenolik bileşikler kullanılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. 10 mg/L stok çözeltileri kullanılarak gallik asit, vanilik asit, kafeik asit, siringik asit, 3-kumarik asit, 4-kumarik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, ferulik asit, hidroksitirozol, tirosol, epigallokateşin, kateşin, kuersitrin, naringin, cis-resveratrol, kamferol, luteolin, apigenin ve kuersetin fenolik bileşikleri için 0,0312; 0,0625; 0,1250; 0,2500; 0,5000; ve 1,0000 mg/L standart çözeltileri hazırlandı. Standart fenolik maddeler için konsantrasyona karşı pik alan değerleri ile kalibrasyon grafiği çizildi

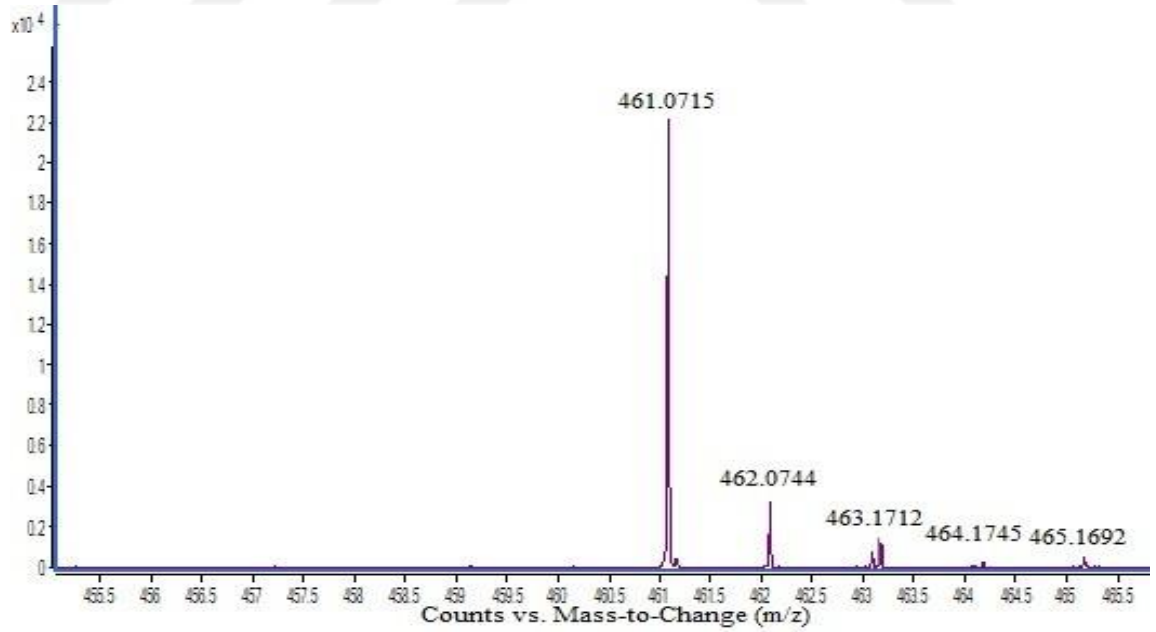
Standart fenolik bileşiklerin analizi, Bölüm 3.2.3'de belirtilen çalışma koşullarında gerçekleştirildi. Şekil 4.2.1.1'de enginar yaprağı ekstraktındaki fenolik maddelere ait LC-QTOF-MS toplam iyon kromatogramı, Şekil 4.2.1.2 - 4.2.1.15'de enginar yaprağı ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin LC-QTOF-MS kromatogramları ve spektrumları verilmiştir. Çizelge 4.2.1.1'de enginar yaprağında belirlenen fenolik bileşikler, Çizelge 4.2.1.2'de enginar yaprağında tespit edilen fenoliklerin karakterizasyonu ve Çizelge 4.2.1.3'de enginar yaprağındaki fenolik maddelerin farklı fraksiyonlardaki miktarları verilmektedir.



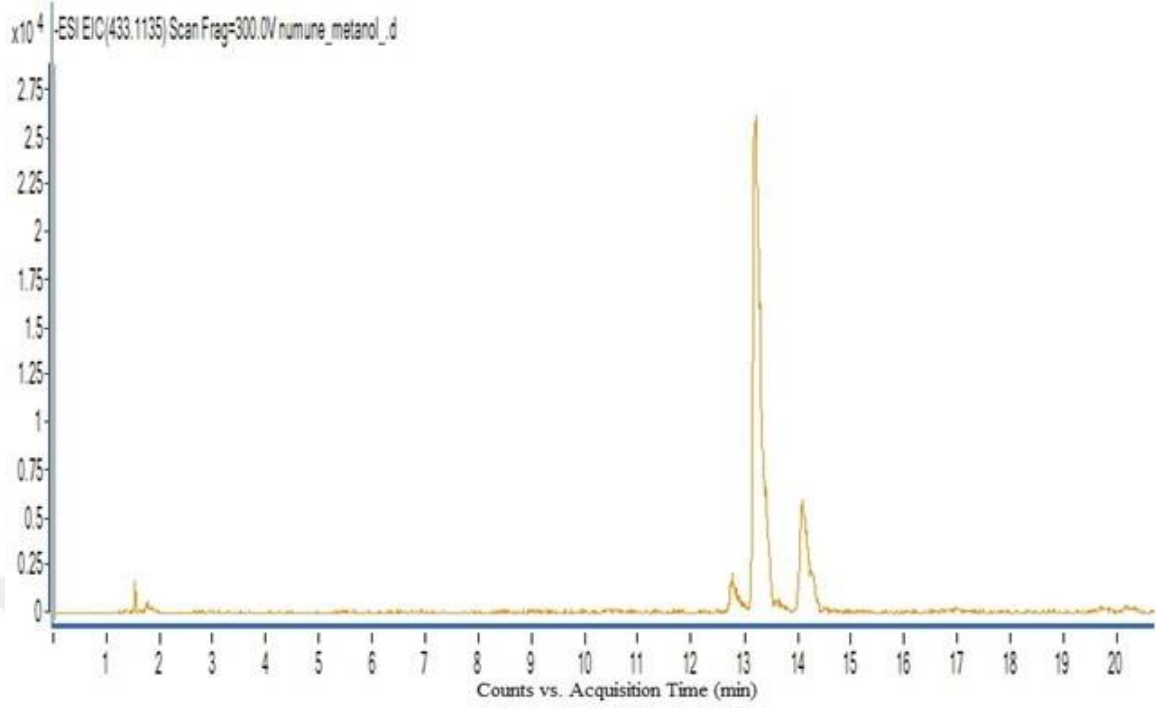
Şekil 4.2.1.1. Enginar yaprağı ekstraktındaki fenolik maddelere ait LC-QTOF-MS kromatogramı (%70 metanol)



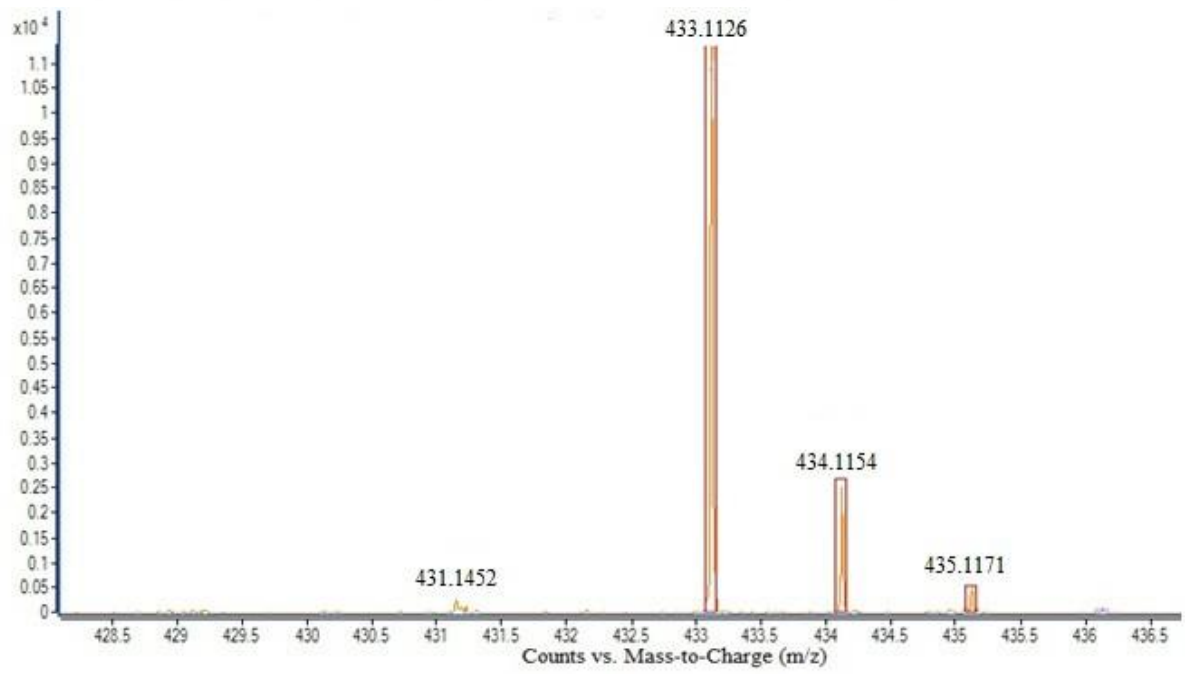
Şekil 4.2.1.2. Luteolin-7-O-glukuronit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı



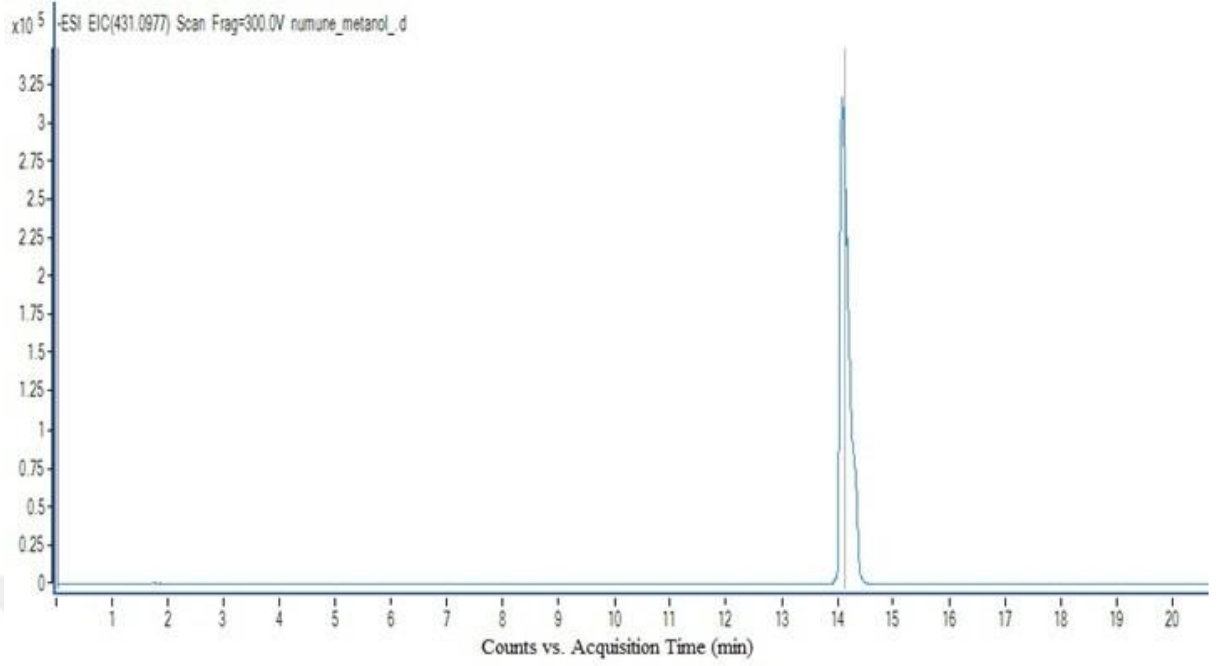
Şekil 4.2.1.3. Luteolin-7-O-glukuronit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu



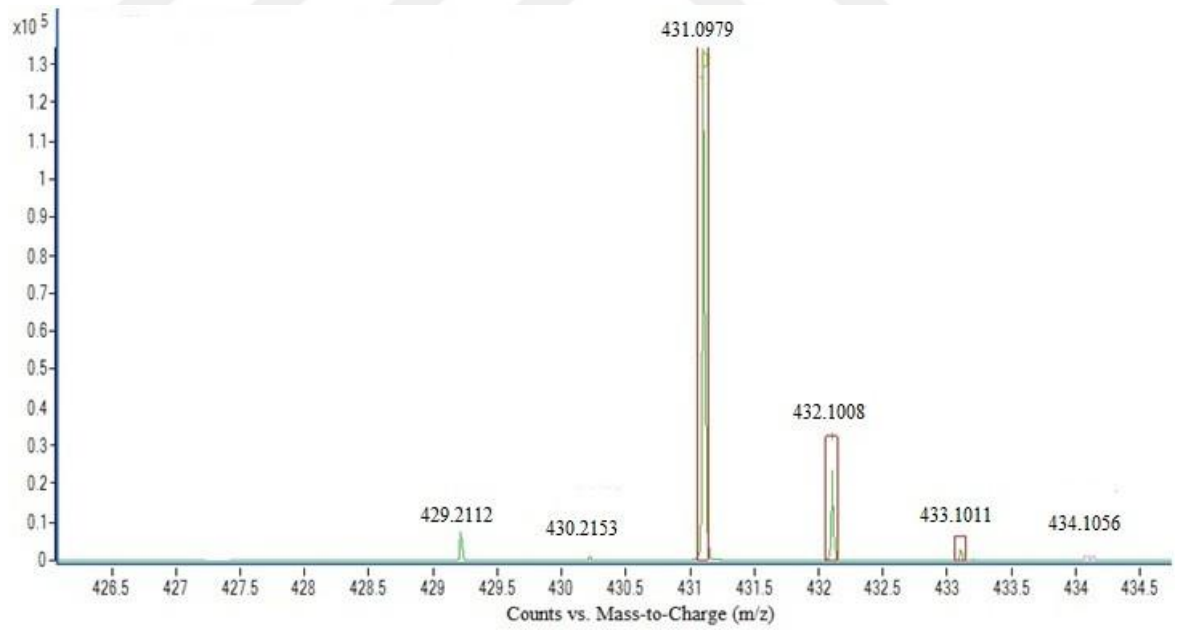
**Şekil 4.2.1.4.** Naringin-7-O-glikozit (Prunin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı



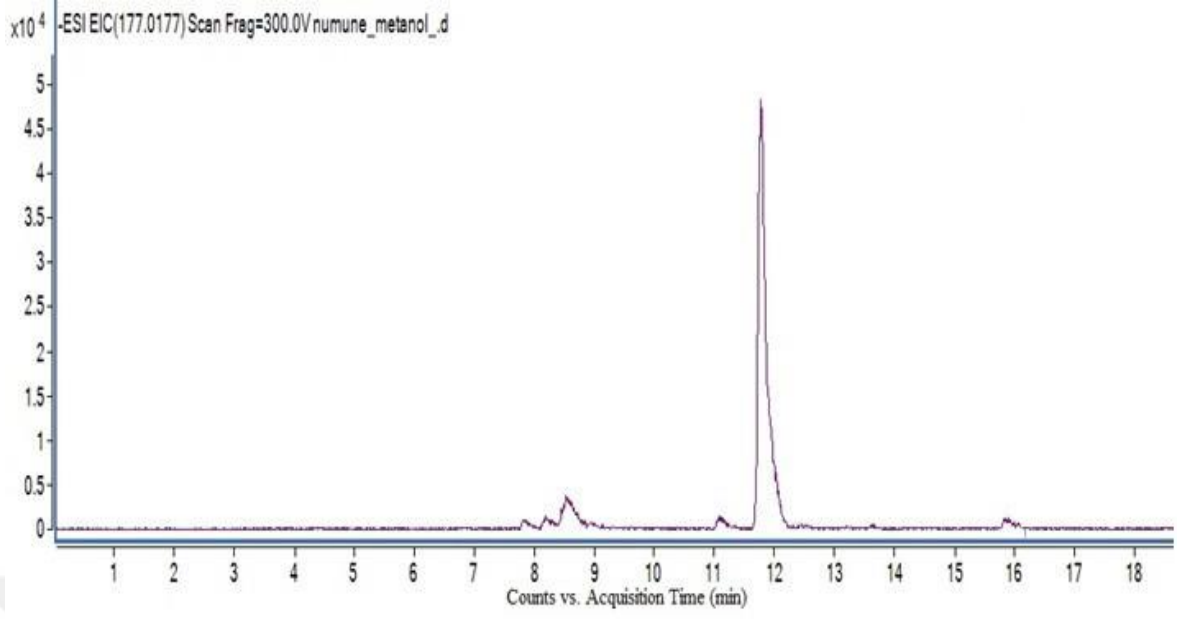
**Şekil 4.2.1.5.** Naringin-7-O-glikozit (Prunin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu



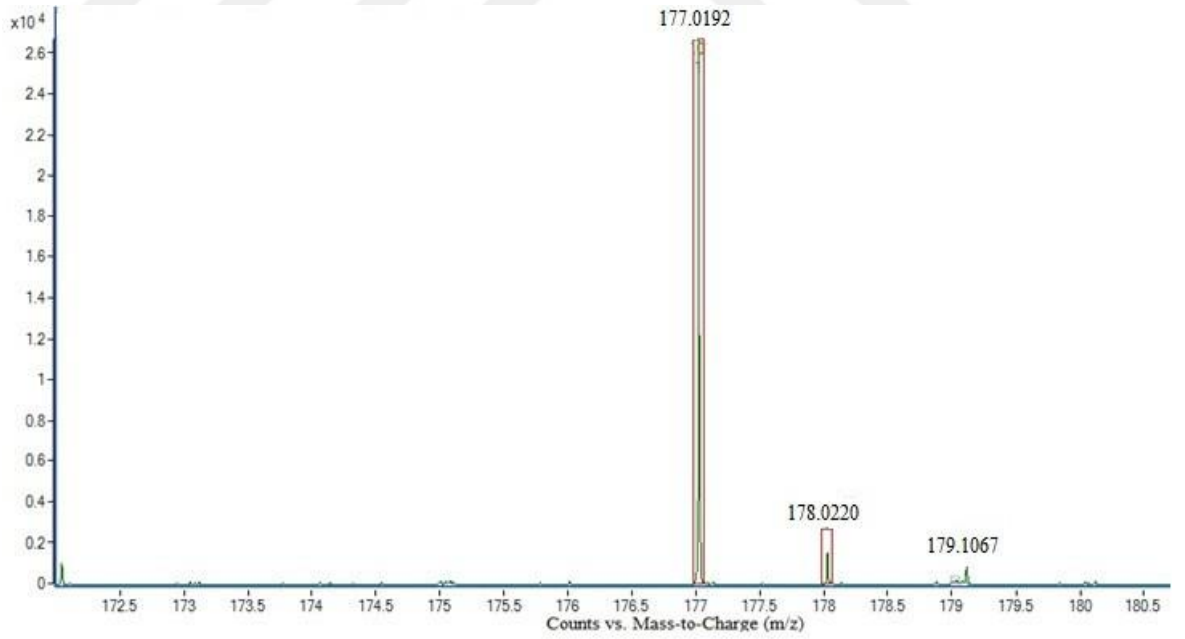
Şekil 4.2.1.6. Apigenin-7-O-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı



Şekil 4.2.1.7. Apigenin-7-O-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu

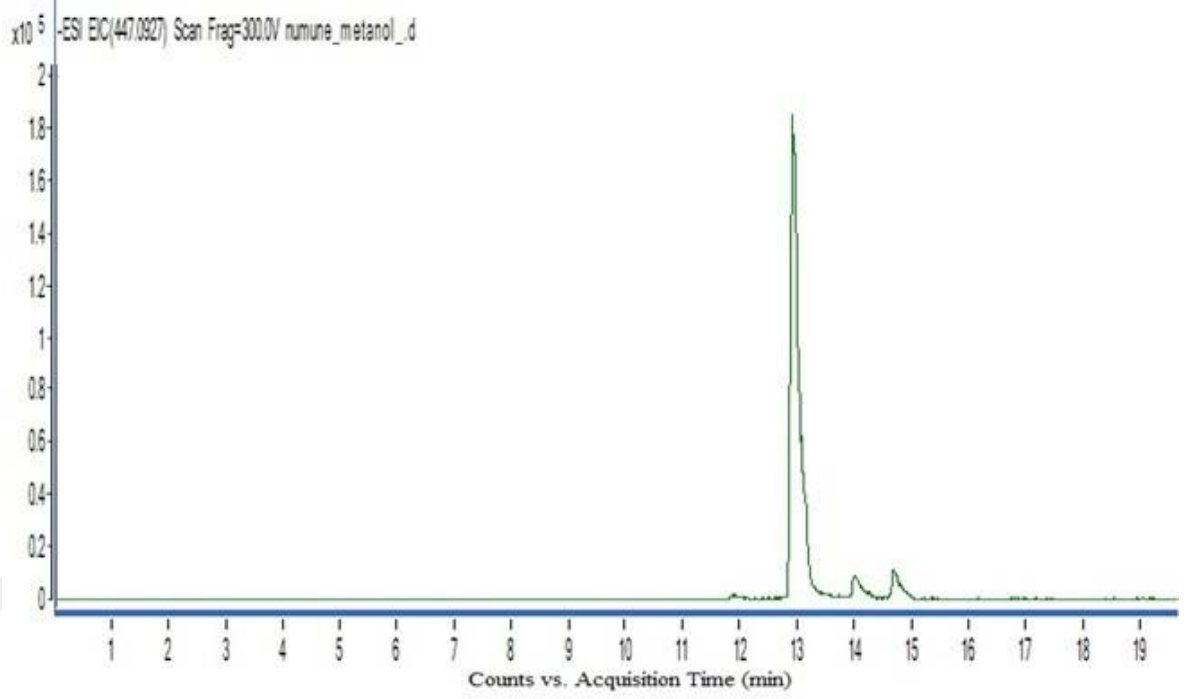


**Şekil 4.2.1.8.** Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı

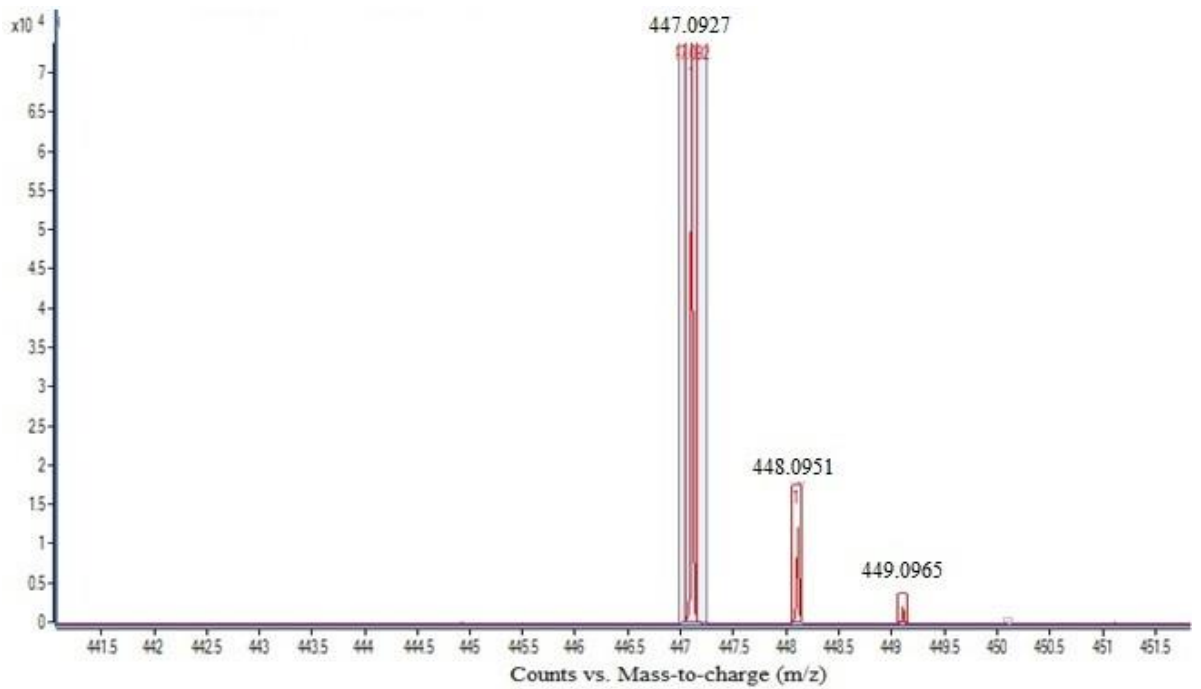


**Şekil 4.2.1.9.** Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin) bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu

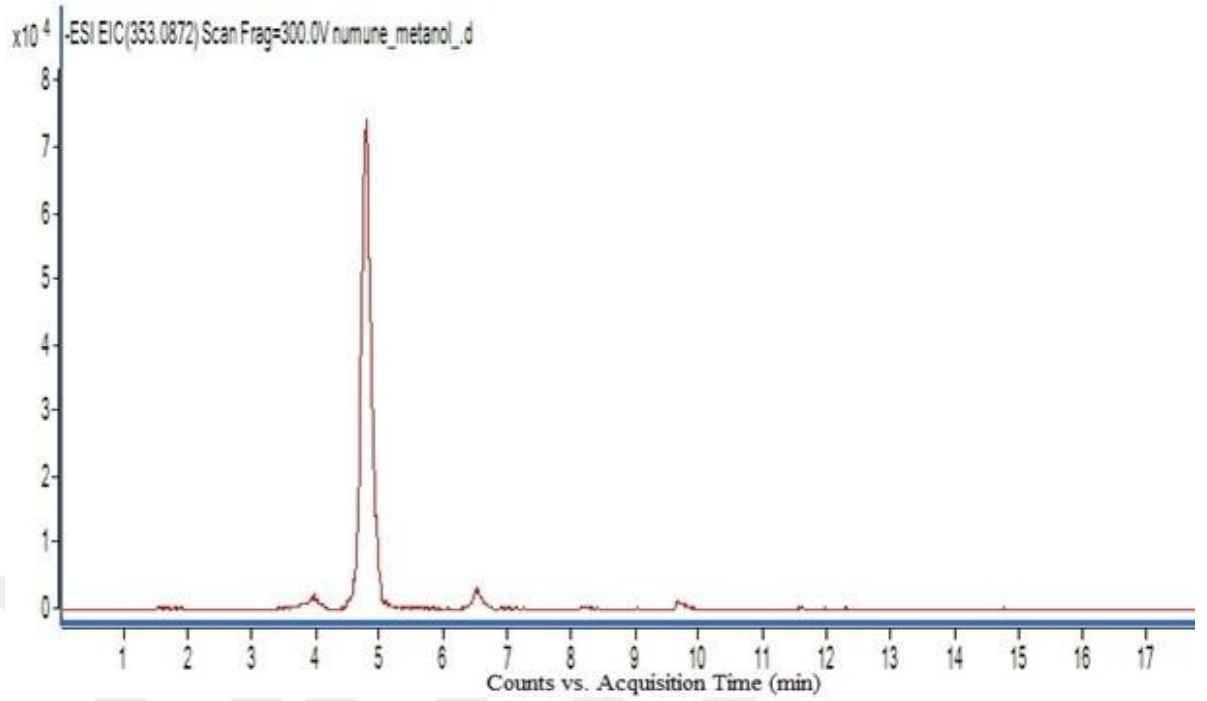




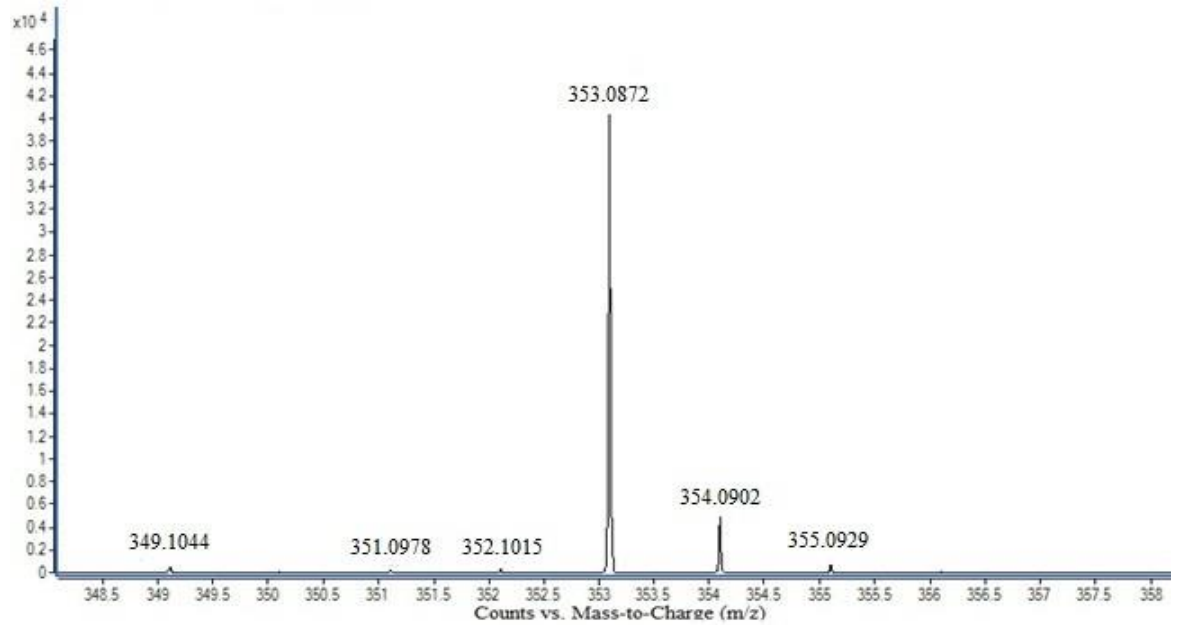
Şekil 4.2.1.10. Luteolin-7-O-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı



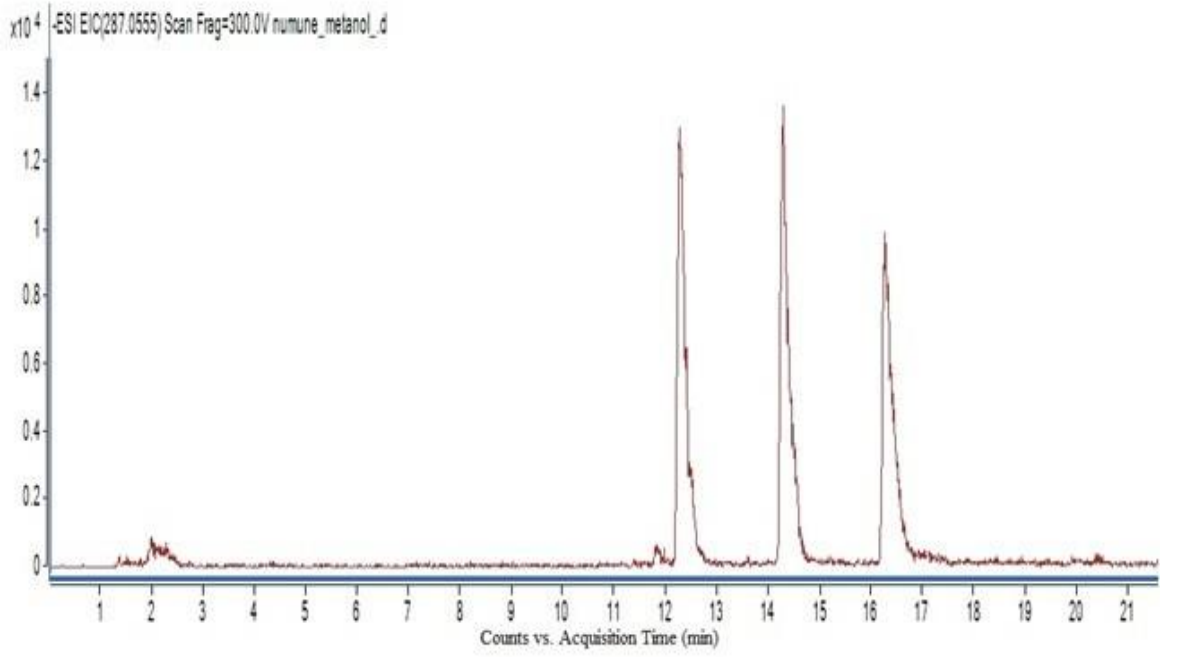
Şekil 4.2.1.11. Luteolin-7-O-glikozit bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu



**Şekil 4.2.1.12.** Kripto-klorojenik asit (4-O-kafeolkuinik asit) bileşiminin LC-QTOF-MS kromatogramı

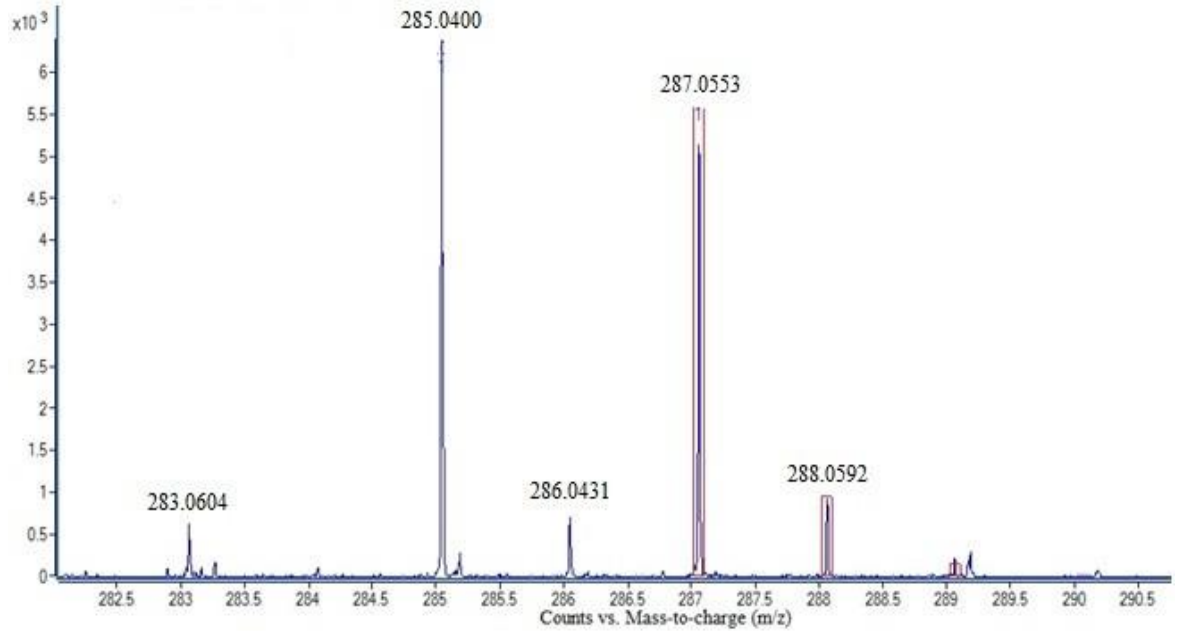


**Şekil 4.2.1.13.** Kripto-klorojenik asit (4-O-kafeoluinik asit) bileşiminin LC-QTOF-MS kütle spektrumu



**Şekil 4.2.1.14.** Eriyodiktiyol bileşiğinin LC-QTOF-MS kromatogramı

Şekil 4.2.1.14'te eriyodiktiyol bileşiğine ait 3 pik görülmektedir. Görülen 3 pik aynı kütle spektrumuna sahip eriyodiktiyol bileşiğinin yapı izomerleri ait olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 4.2.1.15.** Eriyodiktiyol bileşiğinin LC-QTOF-MS kütle spektrumu

**Çizelge 4.2.1.1.** Enginar yaprağında LC-QTOF-MS ile belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanları ve standartlarla karşılaştırması

No	Fenolik Maddeler	Alıkonma zamanı (dk)	İyonlaştırma modu	STD ile karşılaştırma
1	Gallik asit	1.60	Negatif	Evet
2	Vanilik asit	2.40	Negatif	Evet
3	Kafeik asit	2.79	Negatif	Evet
4	Siringik asit	3.15	Negatif	Evet
5	3-Kumarik asit	3.78	Negatif	Evet
6	4-Kumarik asit	3.78	Negatif	Evet
7	Neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit)	4.79	Negatif	Evet
8	Klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit)	4.79	Negatif	Evet
9	Kriptoklorojenik asit (4-O-kafeolkuinik asit)	4.79	Negatif	Hayır
10	Ferulik asit	5.10	Negatif	Evet
11	Hidroksitirosol	6.36	Negatif	Evet
12	Epigallokateşin	9.65	Negatif	Evet
13	Kateşin	7.16	Negatif	Evet
14	Tirosol	10.36	Negatif	Evet
15	Luteolin-7-O-glukuronit	10.82	Negatif	Hayır
16	Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin)	11.80	Negatif	Hayır
17	Kuersitrin	12.98	Negatif	Evet
18	Luteolin-7-O-glikozit (Sinarosid)	12.98	Negatif	Hayır
19	Naringin	13.07	Negatif	Evet
20	Naringenin-7-O-glikozit (Prunin)	13.22	Negatif	Hayır
21	Apigenin-7-O-rutinozit (izorhoifolin)	13.96	Negatif	Hayır
22	Luteolin-7-O-rutinozit	14.10	Negatif	Hayır
23	Apigenin-7-O-glikozit (Apigetrin,kozmozin)	14.14	Negatif	Hayır
24	Narirutin (Naringenin 7-O-Rutinosit)	14.20	Negatif	Hayır
25	Eriyodiktiyol	14.33	Negatif	Hayır
26	cis-resveratrol	15.84	Negatif	Evet
27	Kamferol	16.26	Negatif	Evet
28	Luteolin	16.26	Negatif	Evet
29	Apigenin	17.55	Negatif	Evet
30	Kuersetin	17.75	Negatif	Evet
31	Krisoeriyol (skoparol)	17.83	Negatif	Hayır

STD: Standart

**Çizelge 4.2.1.2.** Enginar yaprağında tespit edilen fenolik bileşiklerin LC-QTOF molekül iyon kütleleri [M-H] ve molekül ağırlıkları

No	Fenolik Maddeler	Alıkonma zamanı (dk)	m/z	[M-H]	MA (g/mol)
1	Gallik asit	1.60	170.0215	169.0147	170
2	Vanilik asit	2.40	168.0422	167.0348	168
3	Kafeik asit	2.79	180.0422	179.0351	180
4	Siringik asit	3.15	198.0528	197.0454	180
5	3-Kumarik asit	3.78	164.0473	163.0339	164
6	4-Kumarik asit	3.78	164.0473	163.0339	164
7	Neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit)	4.79	354.0950	353.0883	354
8	Klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit)	4.79	354.0950	353.0878	354
9	Kriptoklorojenik asit (4-O-kafeolkuinik asit)	4.79	354.0950	353.0872	354
10	Ferulik asit	5.10	194.0579	193.0558	194
11	Hidroksitirosol	6.36	154.0629	153.0557	154
12	Epigallokateşin	9.65	306.0739	305.0666	306
13	Kateşin	7.16	290.0790	289.0718	290
14	Tirosol	10.36	138.0680	137.0599	138
15	Luteolin-7-O-glukuronit	10.82	462.0798	461.0715	462
16	Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin)	11.80	178.0266	177.0192	178
17	Kuersitrin	12.98	448.1005	447.0928	448
18	Luteolin-7-O-glikozit (Sinarosid)	12.98	448.1005	447.0928	448
19	Naringin	13.07	580.1791	579.1718	272
20	Naringenin-7-O-glikozit (Prunin)	13.22	434.1213	433.1126	434
21	Apigenin-7-O-rutinozit (izorhoifolin)	13.96	578.1635	577.1558	578
22	Luteolin-7-O-rutinozit	14.10	514.1584	513.1504	594
23	Apigenin-7-o-glikozit (Apigetrin,kozmozin)	14.14	432.1056	431.0979	432
24	Narirutin (Naringenin 7-O-Rutinosit)	14.20	580.1791	579.1715	580
25	Eriyodiktiyol	14.33	288.0633	287.0553	288
26	cis-resveratrol	15.84	228.0786	227.0715	228
27	Kamferol	16.26	286.0477	285.0409	286
28	Luteolin	16.26	286.0477	285.0408	286
29	Apigenin	17.55	270.0528	269.0458	270
30	Kuersetin	17.75	302.0426	301.0356	302
31	Krisoeriyol (skoparol)	17.83	300.0633	299.0557	300

**Çizelge 4.2.1.3.** Enginar yaprağındaki fenolik maddelerin farklı fraksiyonlardaki miktarları (mg/kg kuru madde)

Fenolik Maddeler	%70 MeOH	SU	BUTANOL	ETİL ASETAT	KLOROFORM
Gallik asit	-	+	+	0.67	-
Vanilik asit	3.54	1.87	1.69	1.90	-
Kafeik asit	0.28	0.18	0.03	0.27	-
Siringik asit	3.05	2.45	0.60	0.76	0.085
4-Kumarik asit	0.44	0.32	-	0.62	-
Neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit)	18.25	15.99	7.12	0.56	-
Klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit)	8.08	7.73	3.20	0.25	-
Ferulik asit	0.06	0.08	-	0.12	0.035
3-Kumarik asit	0.06	0.04	-	0.0005	-
Epigallokateşin	0.15	0.09	0.12	-	-
Kateşin	-	0.04	-	0.05	-
Hidroksitirosol	-	0.003	-	0.004	-
Tirosol	0.30	-	-	0.02	0.58
cis-resveratrol	-	-	-	-	0.02
Kuersetin	0.10	0.03	-	0.05	0.08
Kamferol	80.44	23.31	3.66	47.75	3.045
Naringin	25.00	26.98	28.32	10.82	-
Luteolin	80.33	24.21	3.22	47.99	2.175
Apigenin	110.25	28.75	-	17.55	51.235
Kuersitrin	+	+	+	+	+
Apigenin-7-o-glikozit (Apigetrin,kozmozin)	+	+	-	+	+
Naringenin-7-O-glikozit (Prunin)	+	+	+	+	-
Kriptoklorojenik asit (4-O-kafeolkuinik asit)	+	+	+	+	-
Luteolin-7-O-rutinozit	+	+	+	+	+
Luteolin-7-O-glikozit (Sinarosid)	+	+	+	+	+
Narirutin (Naringenin 7-O-Rutinosit)	+	+	+	+	-
Apigenin-7-O-rutinozit (izorhoifolin)	+	+	-	+	+
Luteolin-7-O-glukuronit	+	+	+	+	+
Eskuletin (6,7-dihidroksi kumarin)	+	+	-	-	+
Eriyodiktiyol	+	+	+	+	+
Krisoeriyol (skoparol)	+	+	+	+	+

+ : Tespit edildi

- : Tespit edilemedi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1. LC-QTOF-MS Sonuçları

#### 5.1.1. Enginar (*Cynara scolymus*) Yaprağında Tespit Edilen Fenolik Maddeler

Bu çalışmada *Cynara scolymus* türü enginarın yaprağında bulunan fenolik maddeler LC-QTOF-MS cihazı ile kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmiştir. *Cynara scolymus* türünde LC-QTOF-MS analizleri sonunda bulunan fenolik maddeler Çizelge 4.2.1.1’de verilmiştir. Enginar yaprağındaki fenolik maddelerin farklı fraksiyonlardaki miktarları ise Çizelge 4.2.1.3’de gösterilmiştir. %70 metanol, su ve etil asetat ekstraktlarında tespit edilen fenolik bileşikler, diğer ekstraktlara göre daha fazla bulunmuştur.

Enginar yaprağında 31 adet fenolik maddenin bulunması LC-QTOF-MS tekniğinin bu çalışma için oldukça faydalı olduğunu bizlere kanıtlamıştır. Bu teknik, örnek fiziksel özelliklerine göre ayrıldıktan sonra iyonlaştırılarak hem kuadropol hem de uçuş zamanlı dedektörler ile çok düşük derişimde bile örneğin içindeki fenolik maddenin tespitini mümkün hale getirmektedir.

Yüksek ayırma gücüne sahip olması ve veri kütüphanesinin oldukça geniş olması tekniğin en önemli özellikleridir. Fenolik bileşiklerin m/z (monoizotopik kütle) değerlerinden yola çıkarak bu teknik ile kalitatif tayin gerçekleştirilmiştir. Enginar yaprağında miktarları tespit edilen fenolik bileşikler için ise standart madde kullanılmıştır. Bu teknik sayesinde tek bir yöntem ile enginar yaprağındaki fenolik maddeleri tespit etmek oldukça kolay olmuştur.

Enginar yaprağı ekstraktlarında en önemli bileşikler olarak; luteolin, naringin, apigenin, kamferol, klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit) ve neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit) belirlenmiştir. Luteolin ve kamferol çalışılan 5 farklı fraksiyonda da (%70 metanol, su, butanol, etil asetat ve kloroform) tespit edilmiştir. Luteolin, *Cynara scolymus* türü enginar yaprağının %70 metanol ekstraktında 80,33 mg/kg kuru madde, su ekstraktında 24,21 mg/kg kuru madde ve etil asetat ekstraktında 47,99 mg/kg kuru madde bulunmuştur. Apigenin, *Cynara scolymus* türü enginar yaprağının %70 metanol

ekstraktında 110,25 mg/kg kuru madde, su ekstraktında 28,75 mg/kg kuru madde ve etil asetat ekstraktında 17,55 mg/kg kuru madde bulunmuştur. Naringin, *Cynara scolymus* türü enginar yaprağının %70 metanol ekstraktında 25,00 mg/kg kuru madde, su ekstraktında 26,98 mg/kg kuru madde ve butanol ekstraktında 28,32 mg/kg kuru madde olarak bulunmuştur.

*Cynara scolymus* türü enginar yaprağında fenolik asit olarak; klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit), neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit), siringik asit, vanilik asit, 3-kumarik asit, 4-kumarik asit ve gallik asit tespit edilmiştir. Çalışılan *Cynara scolymus* türü enginar yaprağındaki fenolik asitler incelendiğinde, neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit) ve klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit) en yüksek miktarda tespit edilmiştir. Bu bileşiklerin ardından vanilik asit ve siringik asit gelmektedir. Enginar yaprağı ekstraktları incelendiğinde klorojenik asit ve neoklorojenik asit en çok su ve %70 metanol ekstraktlarında tespit edilmiştir. Vanilik asit kloroform ekstraktında tespit edilemezken diğer ekstraktlarda yakın değerlerde gözlenmiştir. Siringik asit ise su ve %70 metanol ekstraktlarında diğer ekstraktlara oranla daha fazla oranda tespit edilmiştir.

Flavonoid grubuna dahil olan fenolik bileşikler olarak ise; luteolin, apigenin, naringin, kamferol, kuersetin, kuersitrin, eriodictiyol, krisoeriyol (skoparol), luteolin-7-O-glikozit (sinarosid), apigenin-7-O-rutinozit (izorhoifolin), luteolin-7-O-rutinozit, apigenin-7-o-glikozit, Narirutin (naringenin-7-O-Rutinosit) ve sis-resveratrol tespit edilmiştir. Flavonoid grubu incelendiğinde ekstraktlarda en yüksek oranda bulunan fenolik bileşikler luteolin, apigenin, naringin ve kamferol olarak bulunmuştur. Diğer flavonoid türlerinde kalitatif tayin gerçekleştirilmiştir.

Ekstraktlardaki flavonoid miktarları incelendiğinde, kamferol ve luteolin bileşiklerinin etil asetat ekstraktında, apigeninin %70 metanol ekstraktında, naringinin ise su ekstraktında en yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. Kalitatif olarak tespit edilen luteolin-7-O-glikozit, luteolin 7-O-rutinosit, kuercitrin, eriodiktiyol ve skoparol enginar yaprağı ekstraktlarının tamamında tespit edilmiştir.



Literatüre bakıldığında, *Cynara scolymus* türü enginarla ilgili daha önce yapılan çalışmalarda (Rabaneda ve ark. 2003, Wang ve ark. 2003) tespit edilen fenolik bileşiklerin çoğu çalışmamızda tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde enginar yaprağındaki fenolik bileşik miktarlarında farklılıklar göze çarpmaktadır. Bu farklılık yetiştirilme koşulları, bitkinin toplanmış olduğu bölgenin farklı oluşu ve kullanılan ekstraksiyon tekniğinin farklılığından ileri gelmektedir.

### **5.1.2. Ekstraksiyon İşlemlerinde Kullanılan Çözücülerin Etkisi**

Çözücü ekstraksiyonu bitkilerde bulunan fenolik asitler ve flavonoidlerin analizinde yaygın olarak kullanılan bir ekstraksiyon yöntemidir. Fenolik bileşikler çoğunlukla polar özellik gösterdiklerinden dolayı bu bileşiklerin ekstraksiyon aşamasında su, metanol, etil asetat ve bunların farklı oranlardaki karışımları kullanılır. Bitkilerde bulunan fenolik maddelerin ekstraksiyon verimi, bu fenolik maddelerin kullanılan çözücülerdeki çözünürlüğüne bağlı olarak değişmektedir.

Enginar yaprağındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyon aşamasında su, %70 metanol, butanol, etil asetat ve kloroform çözücülerini kullanarak, fenolik maddelerin ekstraksiyonunda polar ve apolar çözücülerin etkisi karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.2.1.3 incelendiğinde çözücü polaritesinin fenolik bileşiklerin ekstraksiyon veriminde etkili olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon işlemi su ve %70 metanol çözücülerini kullanıldığında genel olarak daha fazla miktarda fenolik bileşik ekstrakte edilmiştir.

Klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit) ve neoklorojenik asit (5-O-kafeolkuinik asit) su ekstraktında %70 metanol ekstraktına göre daha fazla miktarda bulunurken, luteolin, apigenin ve kamferol %70 metanol ekstraktında daha fazla miktarda tespit edilmiştir. Luteolin ve kamferol, etil asetat ekstraktında en yüksek oranda bulunmuştur. Sonuçları incelediğimizde su ve %70 metanol çözücülerinin enginar yaprağındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda en uygun çözücüler olacağını söyleyebiliriz.

## 5.2. UV-VIS Sonuçları

### 5.2.1. Toplam Fenol Sonuçları

Enginar yaprağı ekstraktlarının (su, %70 metanol, butanol, etil asetat ve kloroform) toplam fenol tayini spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. *Cynara scolymus* yaprağının toplam fenol tayininde gallik asit eşdeğerine göre sonuçlar elde edilmiştir. Enginar yaprağının farklı ekstraktlarındaki toplam fenol içeriklerinde bariz miktarsal farklılıklar göze çarpmıştır. *Cynara scolymus* yaprağının ekstraktlarındaki toplam fenol değerleri karşılaştırıldığında, %70 metanol ve su ekstraktlarında diğer ekstraktlara göre daha yüksek oranda toplam fenol bulunmuştur. Bu sonuçlardan enginar yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin su ve %70 metanol çözücülerinde daha iyi ekstrakte edilebildikleri gerçeği ortaya çıkmaktadır. En yüksek oranda bulunan %70 metanol ekstraktındaki toplam fenol değeri  $864,80 \pm 2,12$  mg gallik asit/g kuru madde olarak bulunurken, su ekstraktında  $397,91 \pm 0,80$  mg gallik asit/g kuru madde olarak bulunmuştur. Etil asetat, butanol ve kloroform ekstraktlarının toplam fenol içeriği ise daha az miktarda tespit edilmiştir.

### 5.2.3. Antioksidan Kapasite Sonuçları

*Cynara scolymus* yaprağı ekstraktlarının (su, %70 metanol, butanol, etil asetat ve kloroform) antioksidan kapasitesi CHROMAC metodu uygulanarak troloks eşdeğerine göre (mg troloks/g kuru madde) hesaplanmıştır. Antioksidan kapasite sonuçları incelendiğinde toplam fenol tayinindeki sonuçlarla orantılı olduğu görülmektedir. %70 metanol ve su ekstraktlarının antioksidan kapasite değerleri toplam fenol tayininde olduğu gibi diğer ekstraktlardan daha yüksek bulunmuştur. En yüksek antioksidan kapasiteye sahip %70 metanol ekstraktında  $270,00 \pm 9,02$  mg troloks/g kuru madde, su ekstraktında ise  $128,68 \pm 2,85$  mg troloks/g kuru madde olarak bulunmuştur. Etil asetat, butanol ve kloroform ekstraktlarında ise antioksidan kapasite değerleri daha az seviyede tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlardan daha polar çözücülerin antioksidan kapasitelerinin daha yüksek bulunduğu gözlenmiştir. Ekstraktların toplam fenol değerleri ile antioksidan kapasite değerleri incelendiğinde, aralarında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir.

### 5.3. Sonuç

Günümüzde sağlıklı bir yaşam sürdürmede etkili faktörler, hastalıkların önlenmesi ve tedavisi ile ilgili pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir. Antioksidan olarak fenolik bileşikler; kalp hastalıkları, kanser, diyabet gibi bir çok hastalığın önlenmesinde en etkili maddelerdir. Kötü beslenme alışkanlıkları, stres, hava kirliliği, sigara kullanımı gibi faktörler sebebiyle vücutta biriken toksik ögeleri uzaklaştırmak için antioksidan içeren maddelerin tüketimi önem arz etmektedir. Antioksidan maddelerin tüketimiyle vücutta metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin zararlı etkisi ortadan kaldırılmış olur. Bu sebeple birçok çalışmada bitkilerde bulunan fenolik maddelerin içerikleri ve antioksidan özellikleri üzerine vurgu yapılmaktadır.

Yakın dönemdeki çalışmalar *Cynara scolymus* türü enginar yaprağı ekstraktının antioksidatif, antikarsinojen, antigenotoksik, antibakteriyel, kolesterol düşürücü, diüretik ve koleretik aktivite içeren önemli tıbbi bulgulara sahip olduğunu göstermiştir. Sağlık üzerine önemli yararları olan bu bitki türü Bursa ilinden temin edilmiştir. 5 farklı çözücü ile (su, %70 metanol, butanol, etil asetat ve kloroform) sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi uygulanarak toplam fenol, antioksidan kapasite ve fenolik bileşiklerin tespiti çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar ile hangi çözücülerde hangi fenolik maddelerin olduğu, toplam fenol ve antioksidan kapasitelerinin hangi çözücülerde daha iyi sonuç verdiği amaçlanmıştır.

Enginar brakte yaprağındaki fenolik bileşikler LC-QTOF-MS cihazı ile tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda *Cynara scolymus* türünün yaprağında 31 adet fenolik madde tayin edilmiştir. Enginar yaprağındaki 31 adet fenolik maddenin tespiti kullanılan tekniğin çok faydalı olduğunu bizlere kanıtlamıştır. 19 adet fenolik madde kantitatif olarak tayin edilmiştir. Çalışmalar sonucu luteolin, apigenin, naringin ve kamferol enginar yaprağındaki temel fenolik bileşikler olarak belirlenmiştir. Neoklorojenik asit, naringin ve kamferol ilk defa kantitatif olarak belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular incelendiğinde *Cynara scolymus* yaprağında en yüksek miktarda tespit edilen fenolik maddenin apigenin olduğu tespit edilmiştir. Bu maddeden sonra sırayla luteolin, kamferol, naringin ve neoklorojenik asit gelmektedir.

Çalışmalar sonucu antioksidan kapasite ile toplam fenol değerleri arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Ekstraksiyon verimi en fazla %70 metanol ve su ekstraktlarında elde edilmiştir. %70 metanol ve su ekstraktlarında antioksidan kapasite değerleri yüksek miktarda bulunmuştur. Ayrıca CHROMAC yöntemi ilk defa enginar yaprağı ekstraktlarına uygulanmıştır. Bu da çalışmamızın orijinalliği açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmalar neticesinde *Cynara scolymus* yaprağının yüksek miktarda fenolik madde içeriğine ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Fenolik madde içeriği açısından zengin olan bu bitki aynı zamanda güçlü antioksidan kapasite özelliğine sahip olması sebebiyle gıda endüstrisinde ürüne fonksiyonel özellik kazandırması bakımından kullanıma uygundur. Bu çalışmalar enginar yaprağının antikanser, antienotoksik, antibakteriyel, kolesterol düşürücü ve koleretik aktivite özellikleri içeren bir ilaç hammaddesi olması yönünde gelecek çalışmalara bir kaynak niteliği taşıyacaktır.

## KAYNAKLAR

- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. 2000.** Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989–1009.
- Adzet, T., Camarasa, J., and Carlos Laguna, J. 1987.** Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl<sub>4</sub> toxicity in isolated rat hepatocytes. *Journal of Natural Products*, 50: 612–617.
- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B.K., Berker, K.I., Özyurt D. 2007.** Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds, and the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006.** Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191–203.
- Bennet, R.C., Wallsgrove, R.M.1994.** Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review No. 72. *New Phytologist*, 127: 617–633.
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V. 2010.** The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. *Molecular Plant Pathology*, 11: 705-719.
- Borneman, Z., Gokmen, V., Nijhuis, H.H. 1997.** Selective removal of polyphenols and brown colour in apple juice using PES/PVP membranes in a single-ultra filtration process. *Journal of Membrane Science*, 134(2): 191-197.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. 2009.** Chemical Studies of Anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859-871.
- Careri, M., Mangia, M., Musci, M. 1998.** Overview of the applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: Naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*, 794: 263–297.
- Davis, P.H., Tan, K. and Mill, R.R. (eds.). 1988.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 10, *Edinburgh Univ. Press*, Edinburgh.
- Eruçar, S. 2006.** Bazı bitkisel çayların fenolik madde profili ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.

**Folin, O., Ciocalteu, V. 1927.** On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73:627-650.

**Gebhardt, R. 1997.** Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144: 279–286.

**Gouveia, S.C., Castillo, P.C. 2012.** Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48: 712–724.

**Harborne, J.B. 1989.** Plant Phenolics. In: Dey PM, Harborne, JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1. London, UK: Academic Pres.

**Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013.** Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119–124.

**Jamet, A. and Ebeling, P.W. 2002.** Stabilization Mechanism for Anthocyanin: The case for Copolymerization Reactions. *Engineering and Food for the 21. St Century*, CRC Press LLC, pp: 1-4.

**Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T. 1998.** Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799: 101–110.

**Lee, H.S. ve Widmer, B.W. 1996.** Phenolic Compounds. In: Nollet LML, ed. *Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc. Vol 1, pp: 821–894.

**Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. 2004.** Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.

**Macheix, J.-J., A. Fleuriet., J. Billot. 1990.** Fruit Phenolics. Boca Raton, USA: CRC Pres., 378 pp.

**Marko-Varga, G., Barcelo, D. 1992.** Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. *Chromatographia*, 34: 146–154.

**Merken, H.M., Beecher, G.R. 2000.** Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 577–599.

**Miccadei, S., Venere, D. D., Cardinali, A., Romano, F., Durazzo, A., Foddai, M. S., Fraioli, R., Mobarhan, S. and Maiani, G. 2008.** Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, 60(2): 276-83.

**Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, A., Vincieri F.F. 2003.** Commercial and Laboratory Extracts from artichoke leaves Estimation of Caffeoyl Esters and Flavonoidic Compounds Content , *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34: 349–357.

**Nacz, M., Shahidi, F. 2004.** Extraction and Analysis of Phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.

**Nacz, M., Shahidi, F. 2006.** Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.

**Öztan, T. 2006.** Mor havuç, konsantresi, şalgam suyu, nar suyu ve nar ekşisi ürünlerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

**Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G., 2011.** Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 148-153.

**Rabameda, F.S., Jauregui, O., Raventos, R.M., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. 2003.** Identification of phenolic compounds in artichoke waste by highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1008: 57–72.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, E.C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radicals Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.

**Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Duboisdeau. 2000.** Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments. John Wiley and Sons Ltd, England.

**Robbins, R. J. 2003.** Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.

**Robards, K., Antolovich, M. 1997.** Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst*, 122: 11R–34R.

**Rodriguez-Arcos, R.C., Smith, A.C., Waldron, K.W. 2002.** Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11): 3197-3203.

**Rodriguez-Delgado, M.A., Malovana, S., Perez, J. P., Borges, T., Garcia Montelongo, F. J. 2001.** Separation of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, 912: 249-257.

**Rowley, J. R., Dahl, A. O., Rowley, J. S. 1981.** Substructure in exines of *Artemisia vulgaris* (Asteraceae). *Review of Palaeobotany and Palynology*, 35: 1-38.

**Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F. 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76: 270-276.

**Schutz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. 2004.** Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC–DAD–ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4090–4096.

**Schmidt, T.J., Merfort, I., Willuhn, G. 1994.** Gas chromatography-mass spectrometry of flavonoid aglycones II. Structure-retention relationships and a possibility of differentiation between isomeric 6- and 8-methoxyflavones. *Journal of Chromatography A*, 669: 236–240.

**Sellapan, S., Akoh, C. C., Krewer, G. 2000.** Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2432-2438.

**Stalikas, D. 2007.** Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30: 3268 – 3295

**Stevanato, R., Fabris, S., Momo, F. 2004.** New enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6287-6293.

**Şahin, S. 2011.** Türkiye’de yetişen *Prunella* L. türlerinin fenolik bileşikleri ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesinde analitik metotlar. *Doktora Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.



**Tuncel, N.B., Yılmaz, N. 2010.** Kaz Dağları'ndan toplanan bazı bitkilerin fenolik asit kompozisyonlarının yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 8(3): 18-23.

**Wallace, G., Fry, S.C. 1994.** Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 151: 229–267.

**Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q.-Y., & Tadmor, Y. 2003.** Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 601–608.

**Waterman, P.G., Mole, S. 1994.** Analysis of Phenolic Plant Metabolites. The Methods in Ecology Series, Blackwell Scientific Publications, Ed.: Lawton, J.H., Likens, Ge, Oxford, UK, 248 pp.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet ULUAD

Doğum Yeri ve Tarihi : Karaman 03.07.1990

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Halkalı Mehmet Akif Ersoy Lisesi, İstanbul, 2004

Lisans : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Kimya Bölümü, Bursa, 2008

Yüksek Lisans : Uludag Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bursa, 2013-2017

İletişim (e-posta) : ahmetuluad@gmail.com