

**T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov
Bitkisinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması**

Ali DAĞ

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY




**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

RİZE 2014

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov
Bitkisinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması

Bu çalışma, 26/03/2014 tarihinde yapılan sınav ile Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, Soyadı	İmzası
TezDanışmanı	: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY	
JüriÜyesi	: Prof. Dr. Oktay TORUL	
JüriÜyesi	: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	


Prof. Dr. Fatih YILMAZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programında yapılmıştır.

Eğitim hayatımın bu önemli döneminde bana yardım eden herkese,

Özellikle tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY'a,

Çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzman Adem DEMİR'e, aynı laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Fatih KOCAİMAMOĞLU'na, Ufuk BÜK'e, Gözde KILIÇ'a, Kübra ÇAKIR'a,

Bitkilerin toplanıp bize ulaştırılmasında yardımcı olan değerli hocamız Öğr. Gör. Hüseyin BAYKAL'a,

Bütün hayatım boyunca bana güvenip her türlü desteği sağlayan Aileme,

Sonsuz Teşekkürler.

ÖZET

***Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov Bitkisinin Fenolik Bileşiklerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması**

Doğal antioksidan maddelerden fenolik bileşikler için bitkiler potansiyel kaynaklardır. Fenolik maddeler, antikanserojen, antimutajen ve antimikrobiyal aktivite göstermeleri bakımından da insan sağlığı ile yakından ilişkilidir. Bu sebeple son yıllarda bitkilerden fenolik maddelerin elde edilmesi ve bunların biyoaktivitelerinin araştırılması üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmektedir.

Cephalaria türünün üyelerinin içerdiği çeşitli ikincil metabolitlerin yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin fenolik bileşimi HPLC-UV ile incelenmiştir. Rize Verçenik yaylasından toplanan bitki örnekleri, güneş almaksızın kurutulup çiçek, tepe, yaprak ve sap kısmı ayrı ayrı öğütüldü. Toz haline getirilen kısımlar metanol ile ekstrakte edildi. Çözücüleri uçurulup sulu ortama alınarak dietil eter, etil asetat ve n-bütanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı. Kalan sulu çözelti dahil dört ayrı fraksiyona ayrıldılar. Yalnızca çiçek kısmında organik fazlar birlikte toplandı ve böylece çiçek kısmının organik ve sulu olmak üzere iki fraksiyonu elde edildi.

Ekstraktlar optimize edilen gradiyent elüsyon yöntemiyle HPLC-UV de analiz edilerek sonuçlar mg eşdeğer standart/g ekstrakt olarak ifade edildi. En yüksek miktarda klorojenik asit olmak üzere, protokatekuik asit ve kafeik asit bitkinin tüm kısım ve tüm çözücü ekstraktlarında gözlenmiştir. Bitkinin tepe kısmında isoramnetin, yaprak ve sap kısmında, p-OH benzoik asit ve vanilik asit, çiçek kısmında kuersetin ve sap kısmında ferulik varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fenolik asitler, Flavonoidler, *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov, HPLC-UV

SUMMARY

Elucidation of Phenolic Compounds of the plant *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov by HPLC-UV

Plants are potential source for phenolic compounds from natural antioxidant substance. Phenolic substances are closely related with human health in terms of their functions as anticarcinogenic, antimutagen and antimicrobial, are related with the human health. Therefore, it's obviously seen that, the studies on obtainment phenolic substance from the plants and the research of their bioactivities have accelerated recently.

It's determined that various secondary metabolites in the members of *Cephalaria* species, have been used in conventional medicine for ages. In this thesis, phenolic component of *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov was analyzed by HPLC-UV. The plant samples, picked from Rize Verçenik plateau, were dried away from the sun lights and separated parts of flower, top, leaf and stem of the plant were grinded. Pulverized parts were extracted with methanol. Obtained extracts were taken aqueous solutions following evaporation of their solvent and subjected liquid- liquid extraction with diethyl ether, ethyl acetate and n-butanol, successively. They were separated four individual fractions including aqueous residue. The organic fractions collected together only for flower part of the plan and two fractions as organic and aqueous were obtained for flower part.

Extracts were carried out by HPLC-UV using optimised gradient elution method and the results were expressed as mg standard equivalent /g extract. chlorogenic acid, as the most amount, protocatechuic acid and caffeic acid were observed in the whole parts of the plant and all solvent extracts. It was also observed other phenolic compounds in the plant parts such as isoramnetin in the top part, p-OH benzoic acid and vanilic acid in the leaf and stem parts, quercetin, in the flower part and ferulic acid in the stem part.

Keywords: Phenolic acids, Flavonoids, *Cephalaria Gigantae* (Ledeb.) Bobrov, HPLC-UV

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
ÖZET	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. Antioksidanlar	2
1.3. Fenolik Bileşikler	3
1.3.1. Fenolik Asitler	3
1.3.2. Flavonoidler	4
1.3.3. Antosiyanidinler	5
1.3.4. Flavonlar ve Flavonollar	6
1.3.5. Kateşinler	7
1.3.6. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)	7
1.4. Hidrolize Olabilen Tanenler	8
1.5. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu	9
1.5.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu	11
1.5.2. Fenolik Bileşiklerin Analizleri	12
1.6. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi	13
1.7. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov	15
1.8. Literatür Özeti	17
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1. Bitkilerin Toplanması	19
2.2. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	19
2.3. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri	20
2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller	20

2.3.2. HPLC-UV Koşulları	20
2.3.3. Standartlar ve Kalibrasyon.....	21
2.3.4. Örneklerin Kodlanması.....	21
3. BULGULAR ve TARTIŞMA	22
3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu	22
3.2. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov Bitki Ekstraktlarının Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri	24
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	36
5. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı.....	5
Şekil 2. Flavilyum katyonu.....	5
Şekil 3. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 4. Flavonlar ve flavonolların kimyasal yapısı.....	6
Şekil 5. Kateşin ve epikateşinin kimyasal yapıları.....	7
Şekil 6. Prosiyanidin ve prodelfidin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 7. Hidrolize olabilen tanenlerin kimyasal yapıları.....	9
Şekil 8. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi.....	15
Şekil 9. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin görüntüsü.....	15
Şekil 10. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin Türkiye üzerindeki yayılışı.....	16
Şekil 11. HPLC-UV tarafından 280 nm’de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.....	22
Şekil 12. HPLC-UV tarafından 315 nm’de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar.....	23
Şekil 13. Yaprak ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi.....	25
Şekil 14. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin yaprak kısmının sulu ekstraktının 315 nm’de HPLC-UV kromatogramı.....	26
Şekil 15. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin yaprak kısmının sulu ekstraktının 280 nm’ de HPLC-UV kromatogramı.....	26
Şekil 16. Sap kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi.....	27
Şekil 17. Tepe kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi.....	28
Şekil 18. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının eter, etil asetat ve bütanollü ekstraktlarının 315 nm’ de HPLC-UV kromatogramı.....	29
Şekil 19. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının eter, etil asetat ve bütanollü ekstraktlarının 280 nm’ de HPLC-UV kromatogramı.....	29
Şekil 20. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının sulu ekstraktının 315 nm’ de HPLC-UV kromatogramı.....	30
Şekil 21. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının sulu ekstraktının 280 nm’ de HPLC-UV kromatogramı.....	30
Şekil 22. Çiçek kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi.....	31

Şekil 23. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmının organik fazlarının 315 nm'deki HPLC-UV kromatogramı.	32
Şekil 24. <i>Cephalaria gigantea</i> (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmının organik fazlarının 280 nm'deki HPLC-UV kromatogramı	33
Şekil 25. Bilinmeyen B ₃ pikinin UV-VİS spektrumu.	34
Şekil 26. Bilinmeyen B ₁ pikinin UV-VİS spektrumu.	35
Şekil 27. Bilinmeyen B ₂ pikinin UV-VİS spektrumu.....	35

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.	4
Tablo 2. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri.....	24
Tablo 3. HPLC-UV ile yaprak ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları.....	25
Tablo 4. HPLC-UV ile sap ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları.	27
Tablo 5. HPLC-UV ile tepe ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları.....	28
Tablo 6. HPLC-UV ile çiçek ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları.	31

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

vd.	: Ve diğerleri
dak.	: Dakika
CV	: Yüzde bağıl standart sapma
C18	: Oktadesil
D	: Dağılma katsayısı
FA	: Formik asit
MeOH	: Metil alkol
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC- UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviöle Dedektör
HCl	: Hidroklorik asit
RP-MPLC	: Ters Faz-Orta Basınç Sıvı Kromatografisi
L	: Litre
LOD	: Tespit sınırı (limit of detection)
LOQ	: Tayin sınırı (limit of quantitation)
M	: Molarite
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
nm	: Nanometre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
UV	: Ultraviöle
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
CUPRAC	: Cu(II) indirgeme antioksidan kapasitesi
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
MS	: Kütle spektroskopisi
IR	: İnfrared spektroskopisi
EPA	: U. S. Environmental Protection Agency

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Canlılarda, reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği zararları ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmaların savunmada yetersiz kalması sonucunda ortaya çıkabilecek hastalıklardan korunmak için antioksidan etkiye sahip meyve, sebze ve şifalı bitkilerin tüketilmesinin insan sağlığı açısından faydalı olduğunu gösteren çok sayıda araştırma vardır.

Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda, antioksidan yapıların etki mekanizmaları ile birçok hastalığı önleyebildiği belirlenmiştir. Son zamanlarda araştırmacılar doğal antioksidan olarak değerlendirebileceğimiz, bitkilerde bulunan polifenoller ve flavanoidlere daha çok ilgi göstermektedir (Frankel ve Finley, 2008; Moon ve Shibamoto, 2009).

İşlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için sentetik antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara neden oldukları belirlenmiştir. Son yıllarda işlenmiş gıdalarda koruyucu olarak kullanılmak üzere doğal kaynaklı antioksidanların bulunması amacı ile yapılan araştırmalar artmıştır.

Vitamin E ve C, karotenoidler ve fenolik bileşikler antioksidan özellikleri ile dikkat çeken maddelerdir. Vitamin C, süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil ve peroksil kökleri ile singlet oksijen formundaki aktif oksijenlerin temizlenmesinde en etkili antioksidandır. Vitamin E ise hidroksil, alkoksil, peroksil kökleri ve singlet oksijen gibi aktif oksijen formlarının neden olduğu oksidasyonu önler. β -karoten antioksidan özelliğini singlet oksijen aktivitesi (vücudun ışığa hassasiyet reaksiyonu) ve peroksil köklerine karşı göstermektedir (Yücel ve Ötleş, 2011).

Bitkilerden antioksidanların eldesi ve saflaştırılmaları bu bileşenlere kaynak oluşturma açısından önemlidir. Bitki özütlerindeki antioksidanların, kromatografik olarak ayırmaları ve tanımlanması için ultraviyole dedektöre (UV) bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) etkin şekilde kullanılmaktadır.

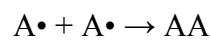
Dev pelemir olarak bilinen *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisi Dipsacaceae familyasına ait çiçekli bir bitki türüdür. Yapılan çalışmalar bu bitkinin fenolik bileşenler açısından zengin bir tür olduğunu göstermektedir (Movsumov vd., 2006; Mustafaeva vd., 2008).

Bu tez çalışması, Rize'nin Verçenik yaylasından (orta yayla üstü) toplanan *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin, çiçek, tepe kısmı, yaprak ve sap kısımlarının fenolik bileşenlerinin HPLC-UV yöntemi ile aydınlatılması üzerine yapılmıştır. HPLC-UV yöntemi ile fenolik bileşiklerin analizleri için uygun koşullar sağlanmıştır. Bu koşullar altında kademeli şekilde sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fenolik bileşiklerin analizleri gerçekleştirilmiştir.

1.2. Antioksidanlar

Antioksidanların birçok tanımı yapılmakla beraber en genel tanımı, insan vücudundaki ve gıdalardaki serbest radikallerin olumsuz etkilerini ve oluşumunu durduran veya yok eden maddelerdir. Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftelenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri" de denmektedir. Yaşamsal olayların devamlılığı için gerekli olan oksijen aynı zamanda birçok hastalık ve dejeneratif gelişimin nedeni olarak görülmektedir. İnsanlarda metabolik olaylar sırasında oksijen kullanımına bağlı olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH^-), peroksil (ROO^-), alkoksil (RO^-), semikuinon (Q^-), nitrik oksit (NO^-) kökleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi aktif oksijen formları meydana gelmektedir. Ayrıca radyasyon, çeşitli gazlar, ağır metaller, herbisitler, pestisitler ile tedavi amaçlı kullanılan birçok ilaç, oksidatif stres nedeni olarak gösterilen aktif oksijen oluşumuna neden olurlar. Oksidatif stres, normal metabolik faaliyetler için gerekli olan aktif oksijen-antioksidan dengesini aktif oksijen lehine bozarak; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerde hasara yol açmakta ve başta koroner hastalıklar, kanser, diyabet ve akciğer tahribatı olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır (Yücel ve Ötleş, 2011).

Antioksidan radikaller, peroksi,oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler.



- Antioksidanlar hücrelere zarar veren bu reaksiyon sistemlerini inhibe ederek toksik olmayan ürünlere çevirmektedir.

- Antioksidan takviyesi ve antioksidanca zengin bir beslenme ile serbest radikallerin ve aktif oksijenin meydana getirdiği oksidatif hasar engellenebilmektedir.

- Antioksidanlar, yağların oksidasyonunu önlemeyi veya yavaşlatmayı sağlarlar. Gıdalardaki antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu engelleyici veya mevcut olan serbest radikalleri etkisiz hale getirici özelliğe sahiptir (URL-1, 2013).

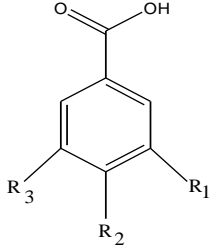
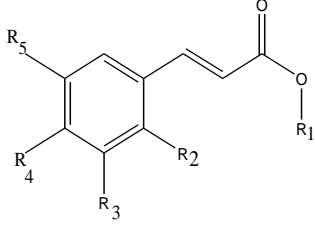
1.3. Fenolik Bileşikler

Benzen halkasına bağlı hidroksil grupları içeren organik maddeler genel olarak fenolik bileşikler olarak adlandırılmakta olup bunlar bitkiler tarafından sentezlenen ikincil metabolitlerdir. Kimyasal açıdan flavonoid olmayanlar (hidroksisünamik, hidroksibenzoik asit ve türevleri, fenolik alkoller) ve flavonoidler (antosüyaninler, flavan-3-ol monomerleri ve polimerleri, flavonlar, flavonoller ve proantosüyanidinler) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Benzoik asitlerin esterleşmesi sonucu oluşan hidrolize olabilen tanenler ve proantosüyanidinler (kondense tanenler), tanenler kategorisinde yer alan fenolik bileşiklerdir (Ribéreau-Gayon vd., 2000).

1.3.1. Fenolik Asitler

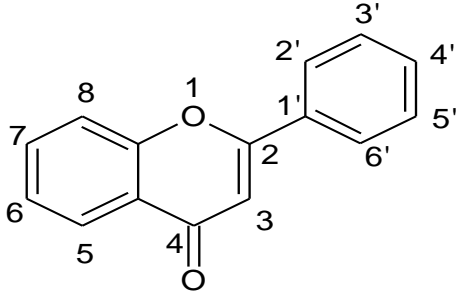
Fenolik asitler, kimyasal yönden hidroksisünamik (sünamik) ve hidroksibenzoik (benzoik) asitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Tablo 1). Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ (fenilmetan), hidroksisünamik asitler ise C₆-C₃ (fenilpropan) yapısındadır. Benzoik asit türevlerine örnek olarak, protokatekuik asit, *p*- hidroksibenzoik asit, vanilik asit, salisilik asit ve gensitik asit verilebilir. Kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sünapik asit ise sünamik asit türevlerindedir (Ribéreau-Gayon vd., 2000; Yücel ve Ötleş, 2001; Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

Tablo 1. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları (Jackson, 2000; Fraga, 2010)

Fenolik bileşik tipleri	Genel yapıları	Adları	R ₁	R ₂	R ₃		
Benzoik tip		Gallik asit	OH	OH	OH		
		Protokatekuik asit	OH	OH	H		
		<i>p</i> -OH Benzoik asit	H	OH	H		
		Vanilik asit	OCH ₃	OH	H		
		Şirincik asit	OCH ₃	OH	OCH ₃		
Sinamik tip		Adları	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
		Sinamik asit	H	H	H	H	H
		<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	H	OH	H
		<i>o</i> -Kumarik asit	H	OH	H	H	H
		Klorojenik asit	kuinik asit	H	OH	OH	H
		Kafeik asit	H	H	OH	OH	H
		Ferulik asit	H	H	OCH ₃	OH	H
		Sinapik asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

1.3.2. Flavonoidler

Flavonoidler (flavon türevleri) yapısında C6-C3-C6 (difenilpropan) formunda iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşur ve 15 karbon atomu içerirler. Antosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, kateşinler, lökoantosiyanidinler ve protoantosiyanidinler olmak üzere 5 alt grupta incelenen flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Ribéreau-Gayon vd., 2000; Yücel ve Ötleş, 2001; Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).



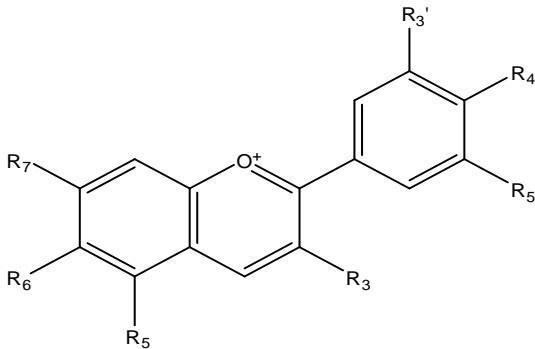
Şekil 1. Flavonoidlerin genel yapısı (Fraga, 2010)

1.3.3. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, doğada şekerlere bağlı olarak bulunurlar ve antosiyanin olarak da adlandırılırlar. Antosiyaninler, meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir. Antosiyaninler, bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).

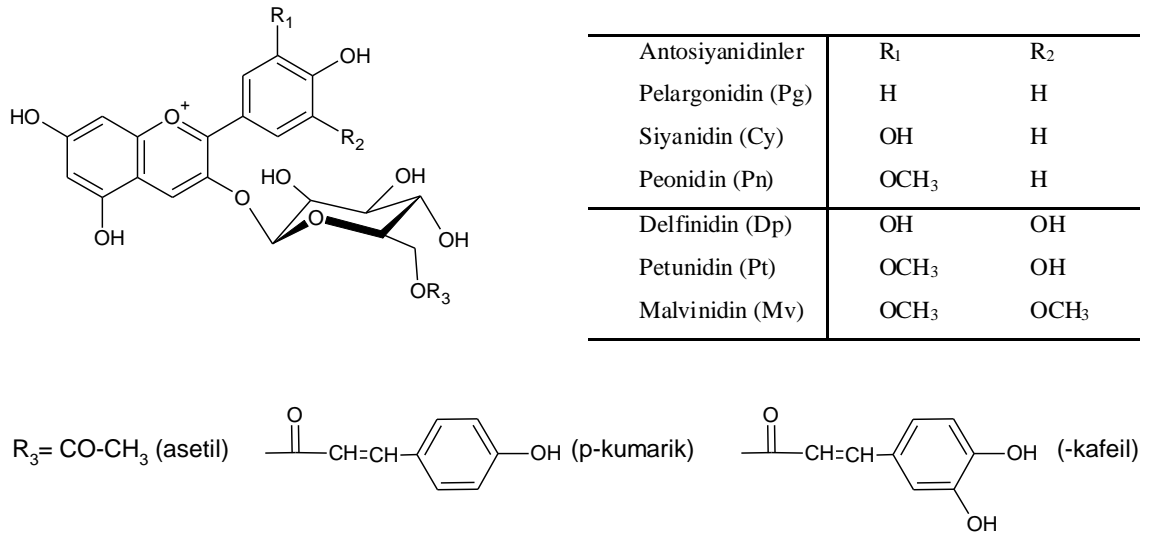
Antosiyanin molekülündeki hidroksil grubu (-OH) sayısı arttıkça renk maviye doğru dönmekte, metoksil grubu (-OCH₃) sayısındaki artış kırmızı tonun güçlenmesine neden olmaktadır. Örneğin, renkteki kırmızılık siyanidinden peonidine doğru artış göstermektedir (Canbaş, 1983). Antosiyanin bileşiklerinin pH'ya bağlı renk kaybının pH: 3,2 - 3,5 aralığında en fazla olduğu belirlenmiştir. Antosiyaninler asitli ortamda kırmızı renkli flavilyum katyonu halindeyken, nötr ve bazik ortamlarda mavi renkli bileşikler haline dönüşmektedir (Ribéreau-Gayon vd., 2000).

Flavonoidlerin genel sınıfları içinde katyonik flavilyum yapısı ile karakterize edilen antosiyanidin yapısı Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. Flavilyum katyonu (Fraga, 2010)

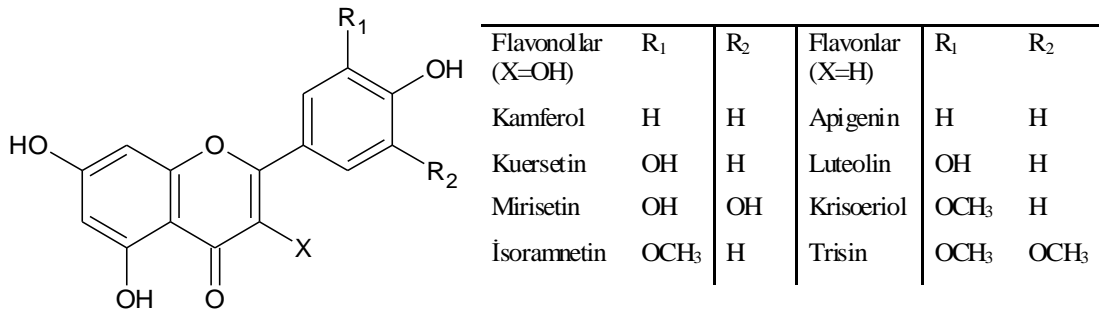
Antosiyaninler bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşur. Şeker kısmı genellikle ramnoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdan meydana gelir (Şekil 3). Ayrıca *p*-kumarik, kafeik ve ferulik asit gibi asitlerle de açillenmiş olabilir. Açillenmiş antosiyaninlerin, açillenmemiş olanlara göre daha kararlı olduğu belirlenmiştir (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).



Şekil 3. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı (Jackson, 2000; Moreno-Arribas ve Polo, 2009; Fraga 2010)

1.3.4. Flavonlar ve Flavonollar

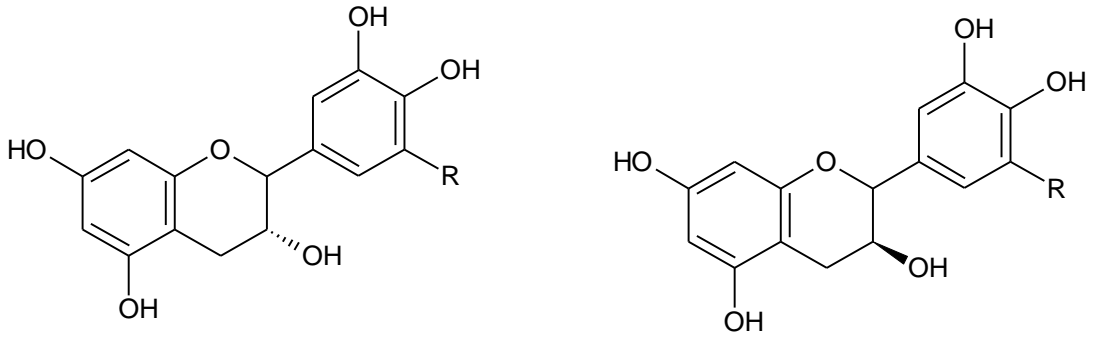
Temel flavonoid molekülünde orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır. Antosiyanidinler gibi bunlarda şekerlerle glikozit halinde bağlanmış olarak bulunurlar (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010).



Şekil 4. Flavonlar ve flavonolların kimyasal yapısı (Jackson, 2000; Fraga, 2010)

1.3.5. Kateşinler

Hidroksil grubu ve üçüncü karbon atomunda doymuş bağ içeren flavonoidler, flavanoller olarak bilinir. Flavan-3,4-diol'ler ve flavan-3-ol'ler bu gruba dahildir. Bunların meyvelerde bulunanları; (+)-kateşin, (-)-epikatesin, (+)-gallokatesin ve (-)-epigallokatesindir (Margalit, 2004). Kateşinler, hem kimyasal hem de enzimatik olarak oksijen ile kolaylıkla birleşerek proantosiyanidinleri oluştururlar (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).



(-)-epikatesin: R=H

(+)-kateşin: R=H

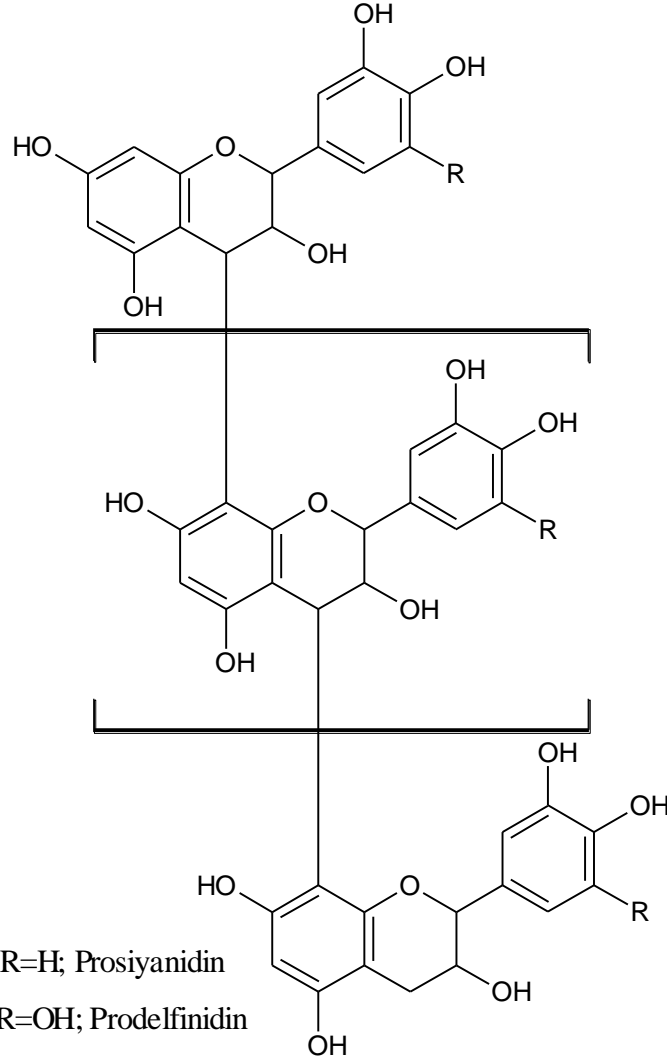
(-)- epigallokatesin: R=OH

(+)-gallokatesin: R=OH

Şekil 5. Kateşin ve epikateşinin kimyasal yapıları (Jackson, 2000; Fraga, 2010)

1.3.6. Proantosiyanidinler (Kondense Tanenler)

Kateşin, epikateşin veya onların gallik asit esterlerinin oluşan dimerleri ve ya oligomerlerine proantosiyanidinler adı verilir. Bu yapı, sadece epikateşin ve kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin ve gallokatesin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin adını alır. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyanidinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir (Nizamlioğlu ve Nas, 2010).



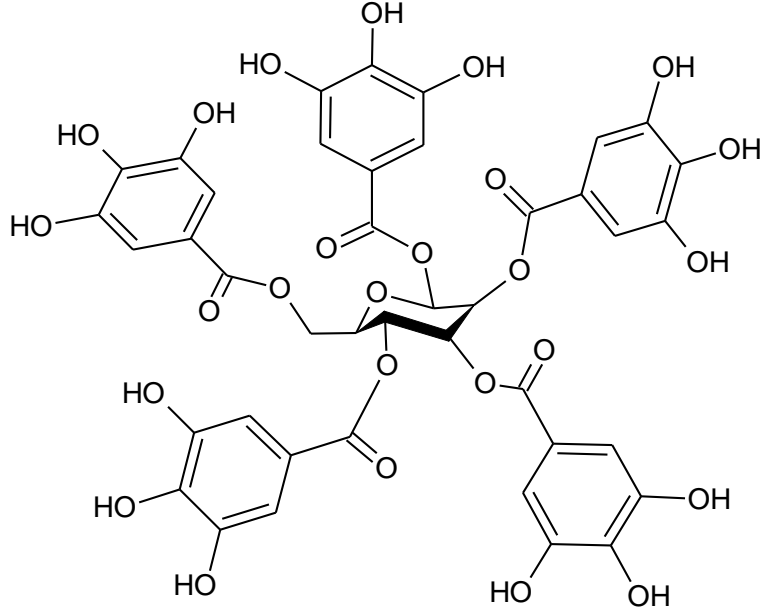
Şekil 6. Prosiyanidin ve prodelfinidin kimyasal yapısı (Fennema, 1996)

1.4. Hidrolize Olabilen Tanenler

Hidrolize olabilen tanenler, gallik asitin ve hegzahidroksidifenik asitin glikoz poliesterleridir. En önemlileri glikozun gallik asitle bağlanmış formu ve bu dimerin lakton formu olan elajik asittir. Yapılarındaki şeker genellikle D-glikozdur. Asit, alkali ortamda veya enzim aktivitesi ile hidrolize olabilirler. Gallotanenin hidrolizi sonucu gallik asit, elajitaninlerin hidrolizi sonucu ellajik asit ortaya çıkar (Fennema, 1996; De Man, 1999).

Fenolik bileşikler gıdalarda buruk (prosiyanidinlerin 6-8 monomerli olanları) ve acı (prosiyanidinlerin 3-5 monomerli olanları) tadın kaynağıdır. Bu bileşikler, proteinlerle kompleks yaparak tortu oluşturabilir ve berraklığı olumsuz etkileyebilirler.

Ayrıca, renk değişimlerinde (enzimatik esmerleşmeler ve şaraplarda siyah kirlenme) önemli rol oynarlar (Yücel ve Ötleş, 2001).



Şekil 7. Hidrolize olabilen tanenlerin kimyasal yapıları (Moreno-Arribas ve Polo, 2009)

1.5. Fenolik Bileşiklerin Bitkilerden Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi, grubu veya istenmeyen safsızlıkları ayırmak için uygulanan bir işlemdir. Ekstraksiyon işleminde çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu ve ekstraksiyon süresi en önemli parametrelerdendir.

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerde olması gereken özellikler şöyle sıralanabilir:

- Ekstrakte edilecek bileşenler için seçici olması,
- Doygunluk derişiminin yüksek olması,
- Viskozitenin ve yüzey geriliminin düşük olması,
- Kaynama noktasının düşük, donma noktasının 0 °C'nin altında olması,
- Yoğunluğunun düşük olması,
- Enerji tasarrufu açısından spesifik ısısının düşük olması,
- Korozif, toksik ve patlayıcı olmaması,
- Taşınması, depolanması ve kullanılması kolay olmalıdır.

Su, yukarıdaki özellikleri sağlayan ve en çok kullanılan çözücü olmakla birlikte, bazı bitkisel hammaddeler için etilalkol, aseton, petrol eteri, hekzan, kloroform gibi organik çözücüler de sıkça kullanılır.

Bitkilerden fenolik maddelerin ekstraksiyonu için suyun yanı sıra etanol, metanol ve bunların su ile çeşitli oranlarda karışımlarının oluşturduğu çözeltiler, aseton, n-bütanol, dietil eter, etil asetat çözeltileri de kullanılmaktadır (Kallithraka vd., 1995; Kähkönen vd., 1999; Lapornik vd., 2005).

Ekstraksiyon sırasında kullanılacak çözücü/katı oranı çalışılan bitkiye ve ekstraksiyon yöntemine göre farklılık gösterir. Yüksek çözücü/katı oranı, daha fazla maddeyi çözmesine rağmen, son çözeltilinin düşük derişimlerde elde edilmesine neden olur. Bu ise çözücü geri kazanımı sırasında daha çok çözücünün buharlaştırılmasını ve daha fazla enerji kullanılmasını gerektirir.

Sıcaklık arttıkça ekstraksiyon verimi genellikle artar. Sıcaklığın artışı, ekstrakte edilecek madde ve çözücünün viskozitesini azaltıcı etkisinin yanında çözünürlüğün artmasına neden olur. Herhangi bir ekstraksiyon ortam sıcaklığının, kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığına bağımlı bir üst sınırı bulunmaktadır. Çünkü ekstraksiyon ortamının sıcaklığı, çözücünün kaynama sıcaklığına yaklaştıkça çözücü buharlaşması artacağından ekstraksiyon için yararlı çözücü miktarı azalır. Bunun için uygulamada ekstraksiyon ortamının sıcaklığı kullanılan çözücünün kaynama sıcaklığından 10–12°C daha düşük tutulur. Ayrıca fenolik bileşiklerin doğal yapılarını korumaları açısından da sıcaklığın gereğinden yüksek olmamasına dikkat edilir.

Ekstraksiyon süresi, bitkinin çözücü ile temas ettiği süredir. Partikül içindeki çözücü ile dışındaki çözücü dengeye ulaşması için partikül ile her bir kademede çözücü arasındaki yeterli temas süresi sağlanmalıdır (List ve Schmidt, 2000; Kalender, 2002; Mc Cabe vd., 1993; Shing ve Rizvi, 1995; Wan ve Wakelyn, 1997).

Çözeltilerden ayrışması istenen madde veya grubun çözücü yardımı ile alınması sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı materyalden herhangi bir madde veya grubun uygun bir çözücü kullanılarak ayrılması ise katı-sıvı ya da katı faz ekstraksiyonu olarak adlandırılır. Fenolik bileşiklerin bitkilerden ekstraksiyonu için hem sıvı-sıvı hem de katı faz ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında sıvı-sıvı ekstraksiyonu uygulandığından bu yöntem detaylı incelendi.

1.5.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, karışmayan iki sıvıda çözünen bir maddenin bu iki fazdaki konsantrasyonları oranının belli bir sıcaklıkta sabit olması şeklinde tanımlanan dağılma kanunu temeline dayanır. Sıvı faz içindeki bir madde bu maddeyi daha çok çözen ve ilk sıvı ile hiç karışmayan ikinci bir sıvı kullanılarak çekilir. Örneğin suda çözülmüş olan bir organik madde daha çok çözünebileceği ve su ile karışmayan eter ya da kloroform gibi organik sıvılarla ekstrakte edilir.

Birbiri ile karışmayan çözücüler arasındaki dağılma dengelerine dayanan üç tip ayırma işlemi; basit ekstraksiyon, tam ekstraksiyon (sürekli ekstraksiyon) ve ters akım ekstraksiyonudur.

Basit ekstraksiyon, bir karışımdaki bir türün dağılma oranı diğer türlerinkinin 5-10 veya daha fazla katı kadar büyük ise ve diğer türlerin dağılma oranı oldukça küçük ($<0,001$) ise, ekstraksiyonla basit, hızlı ve kantitatif şekilde ayırma yapılabilir. Analit içeren çözelti, altı defa yeni çözücü ile artarda ekstrakte edilir. Sıradan bir ayırma hunisi kullanılır, analiz tamamlandığında ayırma hunisinde ya ekstrakt ya da orijinal çözelti kalabilir (Uyan, 2007).

Tam ekstraksiyon (sürekli ekstraksiyon) ile bir karışımda dağılma oranı nisbeten küçük olan bir bileşeni ($D<1$) dağılma oranları sıfıra yaklaşan bileşenlerden ayırmak mümkün olur. Bu tip ekstraksiyonda organik çözücünün otomatik olarak damıtılmasını, yoğunlaşmasını ve sürekli olarak sulu tabakadan geçirilmesini sağlayan bir cihaz kullanılır. Böylece bu cihazla taze çözücü ile birkaç yüz ekstraksiyona eşdeğer bir ekstraksiyon bir saat veya daha az bir sürede fazla bir dikkat gerekmeden yapılabilir (Uyan, 2007).

Ters akım ekstraksiyonu, yüzlerce artarda ekstraksiyonun yapılmasını sağlayan otomatik düzenekler geliştirilmiştir. Bu düzeneklerle, fraksiyonlama ters akım prensibine göre ekstraksiyon yapılır. Burada bir seri farklı basamaklarda iki fazın taze kısımları arasında dağılma meydana gelir. Tam bir ekstraksiyonla, ters akım tekniği arasındaki fark, tam ekstraksiyonda sadece bir fazın taze kısımlarının kullanılıyor olmasıdır. Ters akım metodu ile dağılma oranları hemen hemen aynı olan bileşenlerin ayrılması mümkün olur (Uyan, 2007).

Fenolik bileşiklerin sıvı-sıvı ekstraksiyonlarında dietil eter ve etil asetat yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çözücüler, sulu ortama alınmış olan ekstraktın fenolik bileşenlerinin izolasyonunda etkilidir. Dietil eter ve etil asetatın ekstraksiyonu da

bileşiklerin türüne göre değişmektedir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda ardışık olarak değişen polaritede çözücülere alınan bileşiklerin ayrımı sağlanır. Bu ayrım sayesinde ekstraktların kalabalık bileşen içerikleri farklı çözücülere dağılarak bileşenlerin kromatografik analizleri kolaylaşır. Bu amaçla pek çok çalışmada ham metanol, etanol ya da aseton gibi ekstraktların çözücüleri uçurularak sulu çözeltiye alınan ekstrakt diklorometan, hekzan ya da kloroform gibi apolar çözücüler ile öncelikle vaks, yağlar ve terpenler gibi fenolik olmayan grupların uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Ardından dietil eter, etil asetat, n-bütanol çözücüleri ile ardışık olarak uygulanan sıvı-sıvı ekstraksiyonu sayesinde fenolik bileşikler alt gruplarına ayrılmaktadırlar (Termentzi vd., 2006).

1.5.2. Fenolik Bileşiklerin Analizleri

Fenolik bileşiklerin analizleri spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanidin gibi sonuçları grup içindeki tek bir fenolik bileşen eşdeğeri cinsinden sunulan yöntemler ile yapıldığı gibi her bir bileşenin tespitine yönelik uygun dedektör kullanılarak kromatografik olarak da yapılmaktadır.

UV (Ultraviyole) ya da MS (kütle spektroskopisi) dedeksiyonuyla birlikte HPLC bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için seçilen bir yöntemdir. Bitki materyalinin analizi yapılırken, her bir bileşiğin detaylı özelliği bilinse de, bileşikler çoğu zaman maksimum absorbanlara göre gruplanırlar; fenolik asit ve flavanoller (280 nm), flavonoller (260 veya 365 nm) ve antosiyaninler (520 nm) (Shi vd., 2002). Gıda fenolikleri çoğunlukla UV-Vis ve Diyot serili dedektörleri (DAD) ile belirlenir (Shahidi ve Naczki, 2003). DAD dedektörü ile bileşiğin tüm UV-Vis spektrumu alınır ve standart bileşiklerin spektrumuyla eşleştirilir, böylece pik tanımlanması daha güvenilir olmaktadır (Shi vd., 2002). Fenolikleri belirlemek için kullanılan diğer dedektörler elektrokimyasal kolorimetrik dedektörü, florimetrik dedektördür (Shahidi ve Naczki, 2003).

Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH_3CN , ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren sulu hareketli faz ile çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Hareketli fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını garantilemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H_3PO_4) gibi asitler asidik modifiye ediciler olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün gelişmesi sağlanır.

Bu çalışmada, UV dedektör ve HPLC'in birleşmesiyle oluşan HPLC-UV sistemiyle *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitki ekstraktlarının fenolik içerikleri analiz edildi.

1.6. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografik ayırma teknikleri arasında yaygın kullanım alanına sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi, sıvı fazda çözünebilen analitlerin kolon materyaline olan ilgilerine göre kolondan farklı sürelerde çıkma prensibine dayalı bir tekniktir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi önemlidir ve çözülmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki dolgu materyali olarak tanımlanır. Çözülmüş bileşenler ile sabit ve hareketli fazlar arasında istenilen etkileşim, hareketli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Özellikle diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur. Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir (Henden vd., 2001).

HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Bu sistemin önemli bir bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir.

HPLC uygulamalarında hareketli faz ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan hareketli fazların ortak özellikleri şunlardır; yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, uygun fiyat.

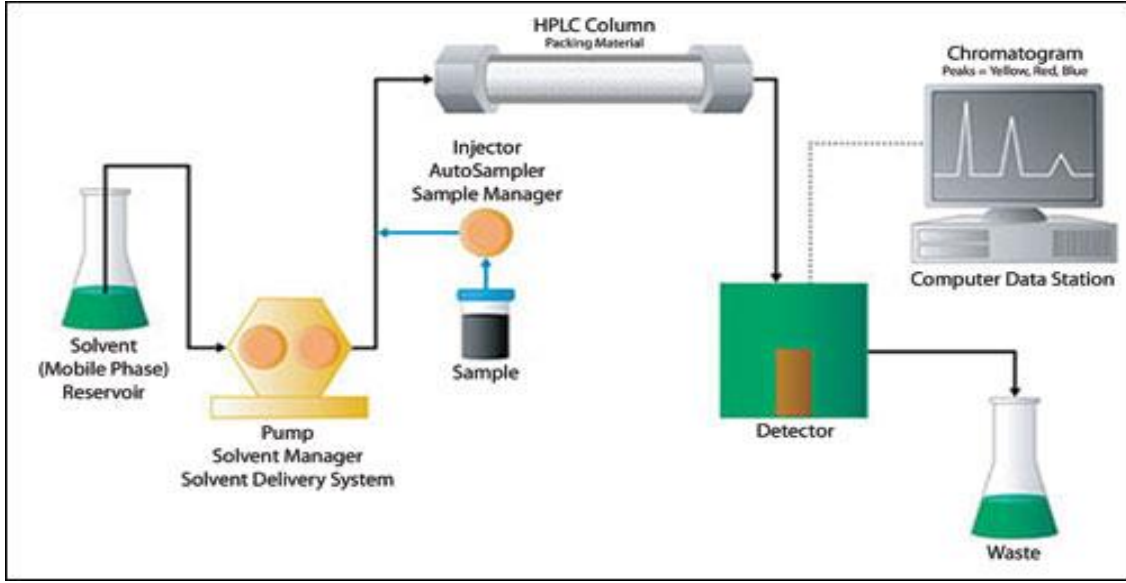
Her bir HPLC türünde kullanılan hareketli fazların özel farklılıkları vardır. İyon değişim kromatografisi ve hidrofobik etkileşim kromatografisinde genellikle farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltileri hareketli faz olarak kullanılır. Normal-

faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücü karışımları hareketli faz olarak kullanılır (Skoog vd., 1997). Boyut eleme kromatografisinde ise kullanılan çözücü, polimer örneğini çözebilmeli ama dolgu materyali ile kimyasal etkileşime girmemelidir. Doğru molekül ağırlığı tayininde bu çok önemlidir.

HPLC analizlerinde yaygın olarak UV dedektörler kullanılır. Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (Vis) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir (URL-2, 2014). Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanır. Bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin kantitatif tayininde kullanılır. Absorpsiyon spektroskopisi:

1. Hem organik hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik,
2. 10^{-4} M'dan 10^{-5} M'a kadar değişen tipik duyarlılık değerleri,
3. Orta-derecede seçimlilik,
4. İyi bir doğruluk,
5. Veri toplama kolaylığı ve elverişliliği gibi özelliklerinden dolayı kantitatif analiz için elverişli olan en yararlı ve en yaygın kullanılan araçlardan biridir.

Bir ultraviyole dedektörüne bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC-UV) cihazı şematik olarak Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 8. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi (URL-3, 2014)

1.7. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisi Dipsacaceae familyasına ait çiçek bir bitki türüdür. Bitkinin yöresel adı dev pelemir olup genellikle tüylü veya tüsüz bir şekilde 3,5 m kadar boylanabilen çok yıllık bir türdür. Alt yaprakları ile çiçeğin tepe kısmı arası 20-40 cm olabilmektedir. Tepe kısmı 4-6 cm çapında olup bir kubbeyi andıran görünüme sahiptir. Çiçekleri solgun sarı ya da krem renklidir (Davis, 2008).



Şekil 9. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin görüntüsü (URL-4, 2014)

Dipsacaceae ailesine ait 94 *Cephalaria* cinsi olup bunların çoğunun Avrupa, Doğu Asya, Doğu Akdeniz ve Kuzey Afrika'da yayılmış olduğu görülmektedir. Bu türlerden 40 tanesinin Türkiye'de de bulunduğu ve bunların 24 tanesinin endemik olduğu bildirilmiştir (Devis, 2008).

Yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanılan çeşitli ikincil metabolitler, flavonoidler, triterpenler, alkoloidler ve lignanlar'ın, *Cephalaria* cinsinin üyelerinin içerdiği tespit edilmiştir (Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2010; Movsumov vd., 2009; Mustafaeva vd., 2008; Tabatadze vd., 2007; Godevac vd., 2006; Pasi vd., 2002; Kırmızıgül ve Anil, 2002; Kırmızıgül ve Rose, 1997; Kırmızıgül vd., 1996). *Cephalaria* cinsinin antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri gösterdiği tespit edilmiştir (Tabatadze vd., 2007; Godevac vd., 2004; Kırmızıgül vd., 1996).

Genel olarak *Cephalaria* cinsi; Kuzey ve Kuzey Doğu Anadolu'dan Ermenistan'a kadar, Kastamonu Ilgaz Dağının kuzey bölümü 1350 m rakımlarında, Trabzon Hamsiköy civarları, Rize Verçenik Yaylası 2800 m rakımlarında, Kars Sarıkamış ilçesine bağlı Karaorgan bucağının 7 km çevrelerinde, Artvin Şevval Tepe'nin yukarılarında, Kafkasya ve Karadeniz dağlarının çevrelerinde sıkça görülmektedir (Davis, 2008). Bitkinin bulunduğu bölgeleri gösteren harita Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin Türkiye üzerindeki yayılışı (URL-5, 2014)

1.8. Literatür Özeti

Fenolik bileşikler için günümüze kadar, saflaştırma ve onların tanınmasını sağlayacak birçok araştırma yapılmıştır. Fenolik bileşiklerin HPLC-UV yöntemiyle analizi için şimdiye kadar bir çok yöntem geliştirildi ve bu yöntemlerin bazıları sadece spesifik olup ekstrakte edilen materyale uygun olarak geliştirilmiştir.

Movsumov vd. (2006) yaptıkları çalışmada kağıt kromatografisi yöntemi ile luteolin, kuersetin, sinarosit, kuarsimeritrin ve yeni bir flavanol türü gigantosit A izole edilmiştir. Gigantosit A' nın spektral özellikleri ve kimyasal yapısının kuersetin-7-O-[α -L-arabinopiranozil(1-6)]- β -D-glukopiranozit benzer olduğu belirlenmiştir. ^1H , ^{13}C NMR, DEPT ve iki boyutlu NMR (COSY, HMQA, HMBC, NOESY) spektrumları kullanılarak yapıları aydınlatılmıştır. Gigantosit A' nın asidik hidroliziyle D-glukoz ve L-ramnoz karbonhidratlarının yapıdan ayrıldığı görülmüştür. PMR ve ^{13}C NMR spektrumlarına göre, bu glikozitin kuersetin türevi olduğu ve D-glukoz ile L-arabinoz karbonhidratlarını içerdiği rapor edilmiştir. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinden flavanoidlerin izolasyonunda; kuru çiçekler % 80 etanol ile 3 saat su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar yoğunlaştırıldıktan sonra kloroform, eter, etil asetat, ve n- bütanol ile artarda fraksiyonlama yapılmıştır.

Ege Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada, *Cephalaria* cinsi 28 türle temsil edilmiştir. Önceki çalışmalardan farklı olarak tek bir *Cephalaria* cinsinde araştırma yapılmış ve bunların farmakolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. Çalışmada *Cephalaria transilvanika* türünün cephalaria saponin B bileşimini izole edilmiş ve yapısını açıklanmıştır (Alankuş Çalışkan ve Anıl, 1994).

Sarıkahya vd. (2011) *Cephalaria scoporia*, *paphlagonica*, *isaurica* ve *stellipilis* türlerinin toprak üstü kısımlarındaki bileşenlerin kimyasal yapılarını araştırmıştır. *Scoparia* türünde 11 fenolik bileşik, flavanoid, triterpen-tip glikozit ile beraber 2 yeni triterpen glikozit (scoposide F ve G) izole edilmiştir. Bunların yapıları temel spektroskopik cihazlarla aydınlatılmıştır. DPPH• ve CUPRAC metotları ile antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Askorbik asit ve Trolox® standartları antioksidan kapasitesi belirlemede referans olarak kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteleri ise MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) metodu ile test edilmiştir. Yeni triterpen glikozit scoposidler (F ve G) ve daha önce test edilmemiş *paphlagonica* A, B ve isakosidin Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu

gözlenmiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon kısmı detaylı bir fraksiyonlama içermektedir. Çiçeklerin üst kısımlarından toplanan materyal 1 hafta oda sıcaklığında gölgede kurutulmuştur. Kurutulan çiçekler toz haline getirilerek 3 kez metanol ile oda sıcaklığında 1 gece ekstrakte edilmiştir. Daha sonra n-bütanol ve suyla ekstrakte edilmiştir. Bütanol ekstraktı RP-MPLC (ters faz orta basınç sıvı kromatografisi) ile MeOH-H₂O çözücü sistemiyle yürütülerek 10 ana fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7) ile silikajelde yürütülerek 30 adet alt fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların NMR, MS ve IR spektrumları incelenmiştir.

Kırmızıgül vd. (1995) daha önceki bazı izolasyon çalışmalarında *Cephalaria* cinsleri çalışılmış ve bunların halk arasında ağrı kesici, ateş düşürücü, rahatlatıcı etkisi nedeniyle kullanıldığı belirtilmiştir. Antimikrobiyal ve antifungal özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Transilvanosit E ve F diye adlandırılan 2 yeni triterpen glikozit çalışılmıştır. İzolasyon ve saflaştırma işlemlerini ise kurutulan çiçekleri 3 kez % 80 MeOH ile birer gün süreyle ekstrakte edilmiştir. Çözücü uçurulduktan sonra ekstrakt Hegzan ve Kloroform ile yıkanarak non-glikozit yapıları uzaklaştırılmıştır. Bütanolde çözülen ekstrakt CHCl₃-MeOH-H₂O çözücü sistemiyle silikajelde yürütülmüştür. Amorf yapıda tozlar elde edilmiştir. Bu tozlarda MS, ¹H ve ¹³C NMR ile yapı aydınlatması yapılmıştır.

Leibovich vd. (2012) İsrail'e özgü Assaf koyunlarında sindirimi kolaylaştıran ve sütünün besin değeri açısından buğday silajı yerine belirli karışımlarda *Cephalaria joppensis* verilmiştir. *Cephalaria joppensis*'in benzer buğdaya göre verimi % 37 daha fazladır. Taze kesilen buğday ve *Cephalaria joppensis* belirli zaman aralıklarıyla dişi koyunlara verilmiştir. Sonuç olarak vücut ağırlığı ve diğer fonksiyonların benzer olduğu fakat *Cephalaria joppensis* yeminin süt salgılanması açısından daha kaliteli yem olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitki ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin aydınlatılması hedeflendi. Bunun için HPLC-UV yöntemi geliştirildi. Fenolik asitler ve flavonoidlerden oluşan 18 standart fenolik bileşik kullanılarak geliştirilen HPLC-UV yöntemi kullanıldı. Kromatografik ayırma öncesinde uygun ekstraksiyon yöntemleri seçilerek bitki bileşenleri çeşitli fraksiyonlarına ayrılmıştır. Böylece daha keskin pikler elde edilerek ayırım güçlendirilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Bitkilerin Toplanması

Deneyleerde kullanılan *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisine ait örnekler, Temmuz 2012'de Verçenik yaylasından 2600 m'den toplanarak güneş almayacak şekilde ve laboratuvar ortamında kurutuldu. Bitkinin çiçek kısmı ayrılarak diğer kısımlarını ekstraksiyon verimini artırmak için yüzey alanının genişletilmesi amacıyla öğütme makinesinden geçirilerek partikül boyutları küçültüldü. Kurutulan bitki örnekleri analizleri yapılana kadar uygun şartlarda (nem almayacak şekilde) muhafaza edildi. Bitki örnekleri etüvde 100 °C' de 5 saat bekletilerek ihtiva ettikleri nem miktarı % 11,73 olarak belirlendi.

2.2. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov Bitkisinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Bitkinin; çiçek kısmı, sap kısmı, yaprak kısmı ve tepe (tohumları ihtiva eden bölge) kısımları ayrıldı. Fenolik bileşiklerin bitkiden ekstraksiyonunda, çiçek ve diğer kısımları için aynı yöntem kullanıldı fakat çiçek kısmında farklı olarak 0,5 g numuneyle başlandı ve çözücü miktarları yarı yarıya azaltıldı.

Kullanılan yöntem:

2 g numuneye 20 mL metanol eklenerek 50 °C'de 2 saat geri soğutucu altında manyetik karıştırıcı ısıtıcıda bekletildi. Sonrasında mavi süzgeç kâğıdı ile süzüldü. Kalan kısım 5 mL metanol ile iki kez yıkama işlemi yapıldı, metanol buharlaştırılarak 20 mL 100 °C kaynar su ilave edildi. Soğuduktan sonra kolonda meydana gelebilecek kirlilikleri önlemek için 10 mL n-hekzan eklenerek oluşan faz alındı. Bu işlemde sonra sulu faz üzerine 5'er mL olmak üzere ikişer kez sırasıyla dietil eter, etilasetat ve n-bütanol ile sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapıldı (Termentzi vd., 2006). Farklı balonlara alınan 10'ar mL'lik örneklerin çözücüleri buharlaştırılarak desikatöre konuldu. Ekstraktlar 3 mL metanolde çözüldü ve suyla uygun oranlarda seyreltilerek 0,2 mikron HPLC filtrelerinden geçirilip HPLC-UV analizleri gerçekleştirildi.

2.3. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov Ekstraktlarında Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri

2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller

Tüm analitik seviyedeki fenolik standartlar Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasından temin edilirken vanilik asit Fluka marka kullanıldı. HPLC seviyesindeki asetonitril, metanol, etanol, etil asetat, asetik asit ve eter ise Merck (Darmstad, Almanya) firmasından alındı. HPLC şırınga filtreleri (RC-membrane, 0.2 µm) Filtre Sartorius Minisart RC 15, Sartorius'dan satın alındı.

Bu çalışmada, kimyasal madde ve bitki örneklerini tartmak için And GR200 analitik terazi, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Wise Clean ultrasonik su banyosu, çöktürme işlemi için Thermo Scientific Heroeus Multifuge 3SR+ santrifüj, kurutma işlemleri için Oven etüv, çözeltileri karıştırmak için Velp Scientifica vorteks, ultra saf su temini için Human Corporation su destile sistemi kullanıldı. Ekstraksiyon sonrası çözücüyü uzaklaştırmak amacıyla Heidolph Laborota 4000 marka buharlaştırıcı kullanıldı.

2.3.2. HPLC-UV Koşulları

HPLC-UV analizleri için ters faz kolon C-18 (150 mm × 4.6 mm iç çap, 5 µm partikül; Fortis, France) Thermo Finnigan Surveyor HPLC kullanıldı. Gradyent elüsyon için kullanılan HPLC yöntemi Akyüz Turumtay vd. (2014) tarafından geliştirildi. Hareketli faz (A) %2 asetik asidin sulu çözeltisi ve (B) 70:30 asetonitril/su çözeltilerinden oluşmakta. Gradyent çalışmalarda sistem 0-3 dak. %5 B; 3-8 dak. %5-15 B; 8-10 dak. %15-20 B; 10-12 dak. %20-25 B; 12-20 dak. %25-40 B; 20-30 dak. %40-80 B şeklinde ayarlanıp daha sonra başlangıç seviyesine geri dönecek şekilde gerçekleştirildi. Enjeksiyon hacmi 25 µL ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30°C'ye ayarlandı. Akış hızı 1,2 mL/dak. olarak ayarlandı, dedektör 280 ve 315 nm'de çalıştırıldı. Benzoik asit türevleri (gallik, protokatekuik, *p*-hidroksibenzoik, vanilik ve şirincik asit) ve flavanoller (kateşin ve epikateşin) 280 nm, sinamik asit türevleri (klorojenik, kafeik, *p*-kumarik ve ferulik asit), flavon (apigenin), flavonoller (mirisetin, fisetin, kamferol, kuersetin ve isoramnetin) ve flavonol glikozit (rutin) 315 nm'de analiz edildi.

2.3.3. Standartlar ve Kalibrasyon

Kalibrasyon çözeltileri farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 5, 10, 20 ve 30 mg/L) hazırlandı. Dış kalibrasyon eğrileri tüm standartlar için uygulandı ve doğrusallıkları (R^2) hesaplandı.

Kalitatif tespit sınırı (LOD) ile kantitatif belirlenme sınırı (LOQ), mg/L cinsinden EPA metoduna göre hesaplandı. LOD değeri hesaplanırken her bir analit sinyalinin gürültüye oranının (S/N) 3 katı, LOQ değeri için ise S/N oranının 10 katı alınarak belirlendi. Standart karışımlarının konsantrasyonları: gallik asit, protokatekuik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve şirincik asit için 0,5 mg/L; klorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik, rutin, fisetin, mirisetin, kuersetin, apigenin, kamferol ve isoramnetin için 1 mg/L; kateşin ve epikateşin için ise 2 mg/L olarak ayarlandı. LOD, LOQ ve tekrarlanabilirlik değerlerinin belirlenmesi için bu karışım 7 kez analiz edildi. Tekrarlanabilirlik parametreleri olarak pik alanı ve alıkonma zamanlarının yüzde bağlı standart sapmaları hesaplandı.

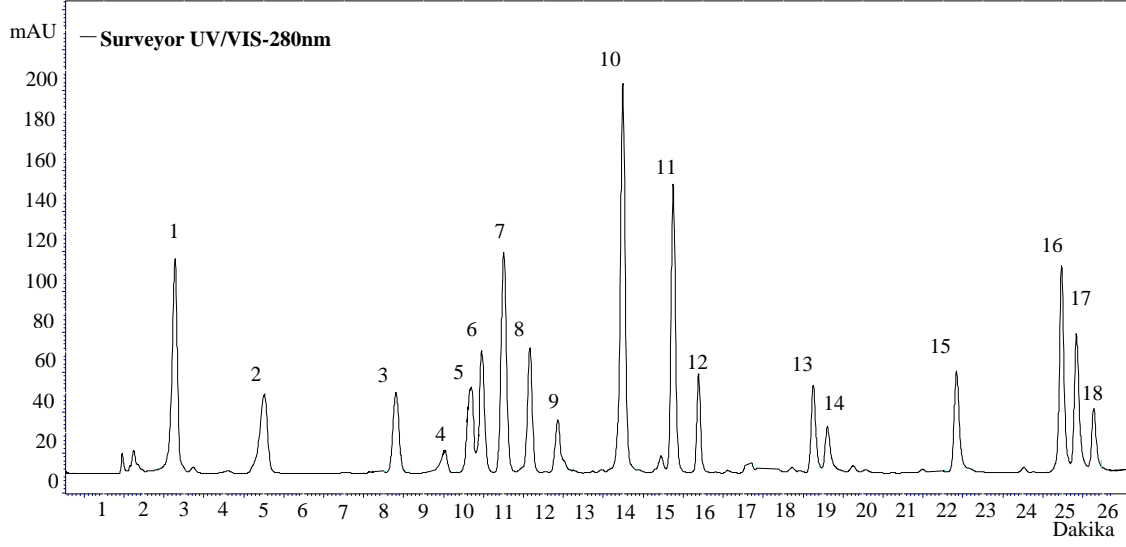
2.3.4. Örneklerin Kodlanması

Çalışmada *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinden elde edilen ekstraktları deneylere başlanan çözücü, ekstraksiyon koşulları bilgisini içerecek şekilde kısaca kodlandı. Bitkinin çiçek kısmı için; Ç ana kodu kullanıldı ve sulu ve organik faz olmak üzere iki ekstraktın analiz kodu Ç-S ve Ç-O (çiçek sulu, çiçek organik) şeklinde verildi. Yaprak kısmı için ana kod Y kullanılarak fazlar içinse; Y-S, Y-E, Y-EA ve Y-B (yaprak sulu, yaprak eter, yaprak etil asetat, yaprak bütanol) şeklinde kodlandı. Sap kısmı için ana kod S kullanılarak fazlar içinde; S-S, S-E, S-EA ve S-B (sap sulu, sap eter, sap etil asetat, sap bütanol) şeklinde kodlandı. Tepe kısmının ana kodu T olup fazlar içinse; T-S, T-E, T-EA ve T-B (tepe sulu, tepe eter, tepe etil asetat ve tepe bütanol) şeklinde kodlandı.

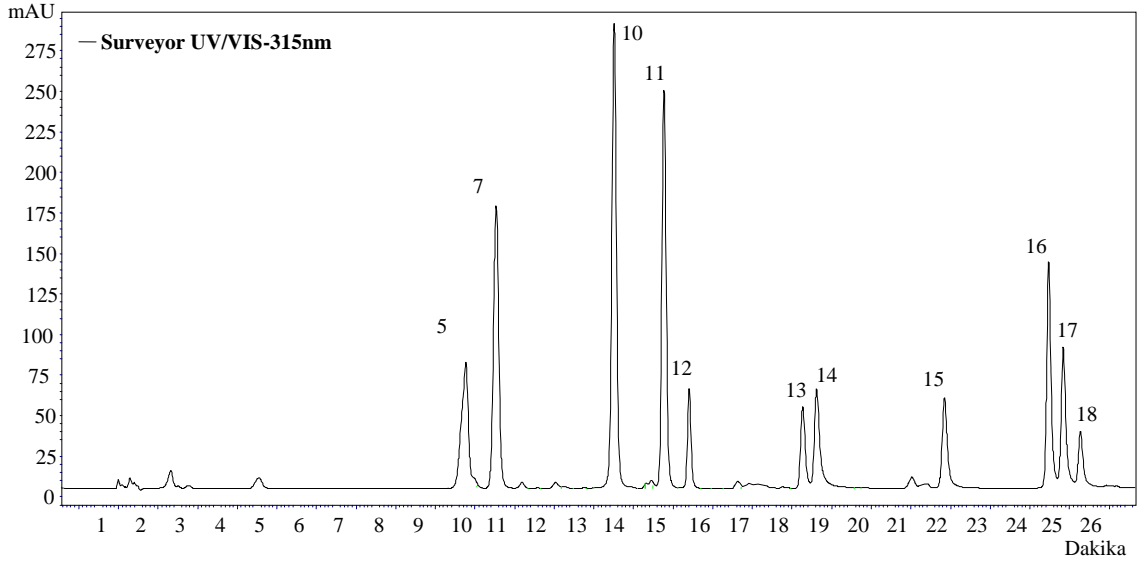
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Fenolik Bileşiklerin Analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen HPLC-UV metodu kullanılarak 18 standart fenolik bileşiğinin analizine örnek Şekil 11 ve Şekil 12’ de verildi. Numaralandırılan standart fenolik bileşiklerin Tablo 2’de isimleri ve alıkonma zamanları verildi.



Şekil 11. HPLC-UV tarafından 280 nm’de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Koşullar: Kolon: C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm), hareketli faz: (A) suda % 2 asetik asit, (B) 70:30 asetonitril/su. Enjeksiyon hacmi: 25 µL, sıcaklık: 30°C.



Şekil 12. HPLC-UV tarafından 315 nm’de 5 mg/L fenolik standartların piklerinin analizi için elde edilen kromatogramlar. Koşullar: Kolon: C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm), hareketli faz: (A) suda % 2 asetik asit, (B) 70:30 asetonitril/su. Enjeksiyon hacmi: 25 µL, sıcaklık: 30°C.

HPLC-UV ile 18 fenolik standardın analiz edildiği metot hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği LOD için hazırlanan standart karışımının 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. Pik alanları ve alıkonma zamanlarının yüzde bağıl standart sapmaları (CV) tekrarlanabilirlik olarak değerlendirildi. Ayrıca analitin mevcut olup olmadığını belirlemek için gerekli en küçük miktar (LOD) ve güvenilir kantitatif analiz yapabilmek için gerekli en küçük miktar olan tayin sınırı (LOQ) değerleri Tablo 2’de mevcuttur. Standart konsantrasyonuna karşı elde edilen pik alanlarının doğrusallığı R^2 olarak değerlendirildi (Tablo 2).

Tablo 2. Optimize edilen HPLC-UV metodunun parametreleri

No	RT _{ort.}	Bileşik	CV (RT)	CV (ALAN)	R ²	LOD*	LOQ*
1	2,78	Gallik asit	0,30	2,05	0,998	0,03	0,11
2	5,18	Protokatekuik asit	0,24	2,78	0,999	0,04	0,14
3	8,61	<i>p</i> -OH benzoik asit	0,65	1,19	0,999	0,02	0,06
4	9,66	Kateşin	0,58	2,10	0,999	0,12	0,39
5	10,28	Klorojenik asit	0,29	1,50	0,998	0,04	0,15
6	10,73	Vanilik asit	0,35	0,87	0,999	0,01	0,05
7	11,15	Kafeik asit	0,24	0,83	0,999	0,03	0,09
8	11,87	Şirincik asit	0,36	1,49	0,999	0,02	0,07
9	12,46	Epikateşin	0,38	1,33	0,999	0,08	0,26
10	14,17	<i>p</i> -Kumarik asit	0,11	0,56	0,999	0,02	0,06
11	15,41	Ferulik asit	0,23	0,63	0,999	0,02	0,07
12	15,82	Rutin	0,53	1,15	0,999	0,03	0,11
13	18,88	Mirisetin	0,26	4,09	0,999	0,08	0,27
14	19,28	Fisetin	0,25	2,56	0,999	0,05	0,18
15	22,55	Kuersetin	0,21	1,78	0,999	0,04	0,13
16	25,54	Apigenin	0,15	1,49	0,999	0,05	0,17
17	26,08	Kamferol	0,14	2,68	0,999	0,07	0,22
18	26,66	Isoramnetin	0,14	6,34	0,998	0,13	0,45

* : mg/L

Tablo 2’de görüldüğü gibi alıkonma zamanlarının yüzde bağıl standart sapması en yüksek *p*-OH benzoik asit (0,65), kateşin (0,58) ve rutin (0,53) bileşiklerinde elde edildi. Diğer bileşenlerin CV (RT) değerleri daha düşük yani tekrarlanabilirlikleri daha yüksek bulundu. Pik alanlarının CV değerleri mirisetin ve isoramnetinde 5’ e yakın iken diğer bileşenlerde 5’ den küçük bulundu. Tekrarlanabilirler fenolik bileşiklerin bitki ekstraktlarında analizleri için genel olarak uygun aralıktadır. Kalibrasyon eğrilerinin doğrusallığı olan R² 0,99’ dan büyük bulundu. Metodun kalitatif tespit sınırı LOD (<0,13) ve kantitatif tespit sınırı LOQ (<0,45) değerleri oldukça küçük olup bitki ekstraktlarının fenolik bileşen analizi için uygun aralıktadır.

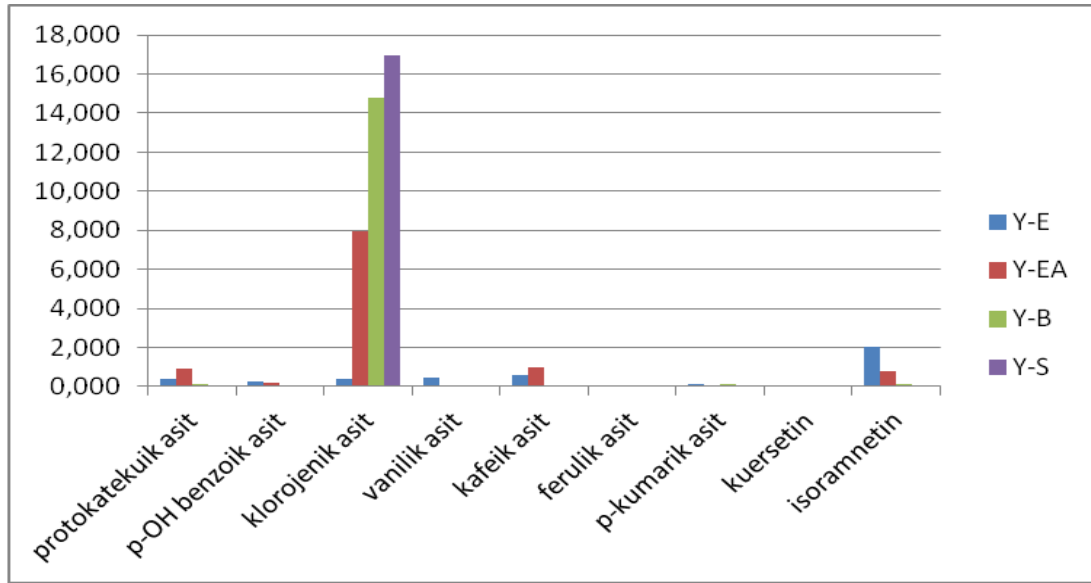
3.2. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov Bitki Ekstraktlarının Fenolik Bileşiklerin HPLC-UV Analizleri

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin yaprak, sap, tepe ve çiçek kısımlarının fenolik içeriklerinin HPLC-UV sonuçları sırasıyla Tablo 3, Tablo 4, Tablo

5 ve Tablo 6’da verildi. Bu sonuçlara ait bar grafikleri de Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15 ve Şekil 16’da sırasıyla verildi.

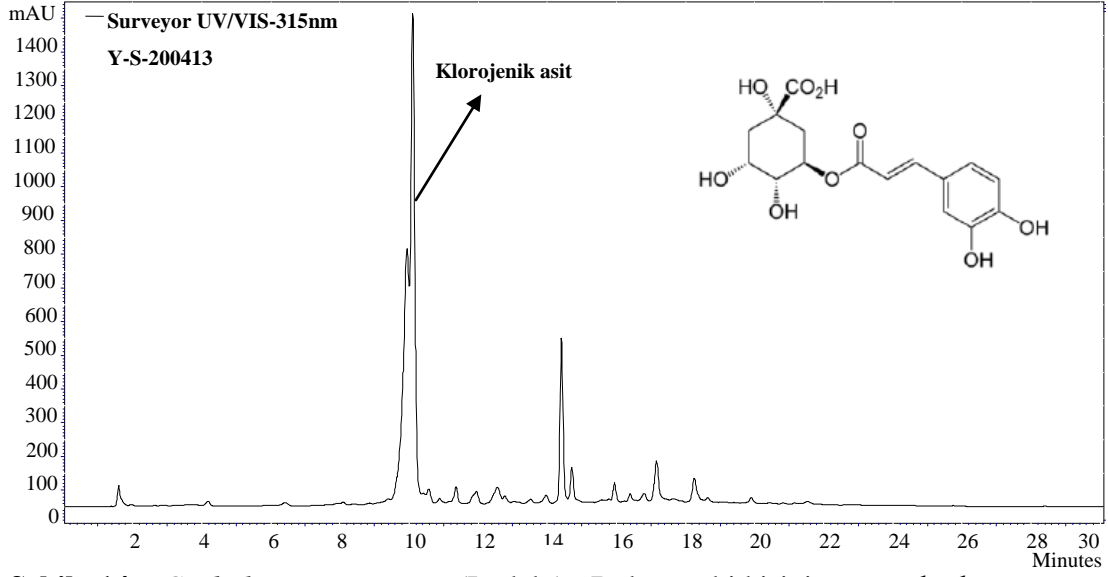
Tablo 3. HPLC-UV ile yaprak ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları (mg /g ekstrakt)

Bileşikler	Y-E	Y-EA	Y-B	Y-S
protokatekuik asit	0,36	0,91	0,13	0,06
p-OH benzoik asit	0,22	0,15	0	0
klorojenik asit	0,38	7,97	14,75	16,92
vanilik asit	0,48	0	0	0
kafeik asit	0,56	0,98	0,04	0,04
ferulik asit	0	0	0	0
p-kumarik asit	0,12	0	0,13	0,07
kuersetin	0	0	0	0
isoramnetin	2,05	0,75	0,12	0,03

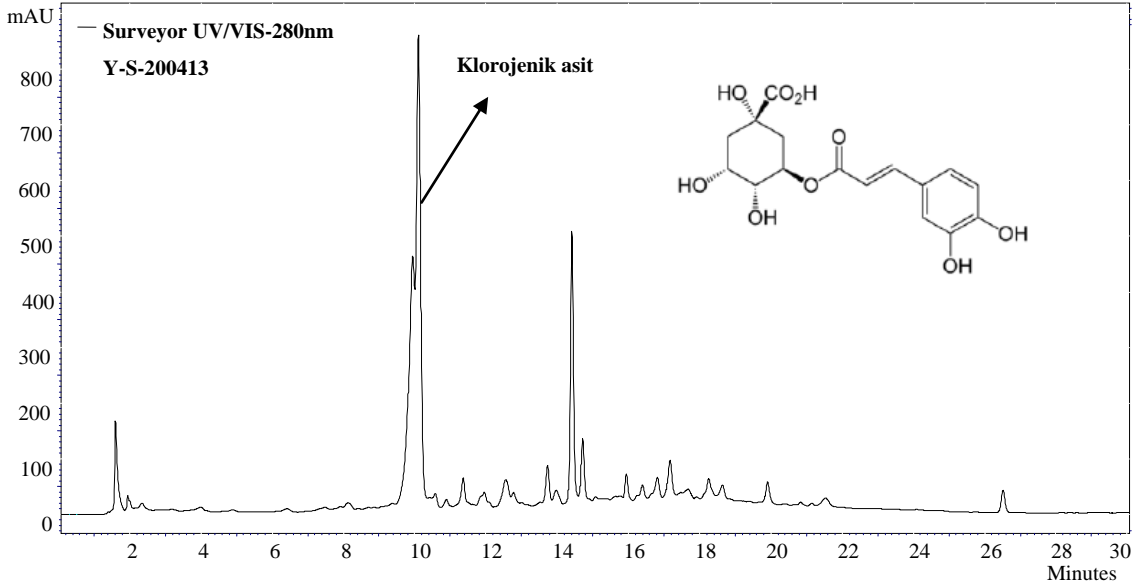


Şekil 13. Yaprak ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi

Yaprak ekstraktının HPLC-UV sonuçlarına (Tablo 3 ve Şekil 13) bakıldığında başlıca klorojenik asit, protokatekuik asit, kafeik asit ve isoramnetin fenolik bileşikleri görüldü. Yaprak sulu (Y-S) ve yaprak bütanol (Y-B) ekstraktları klorojenik asit açısından diğer ekstraktlara göre daha zengindir ve sulu ekstraktlar bu bileşikleri en yüksek miktarda içerir. Bu durum klorojenik asidin organik çözücülerden daha ziyade suyu tercih ettiği görüldü. Şekil 14 ve şekil 15’de yaprak kısmının 315 ve 280 nm’ deki HPLC-UV kromatogramları da klorojenik asidin piklerini göstermektedir.



Şekil 14. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin yaprak kısmının sulu ekstraktının 315 nm’de HPLC-UV kromatogramı



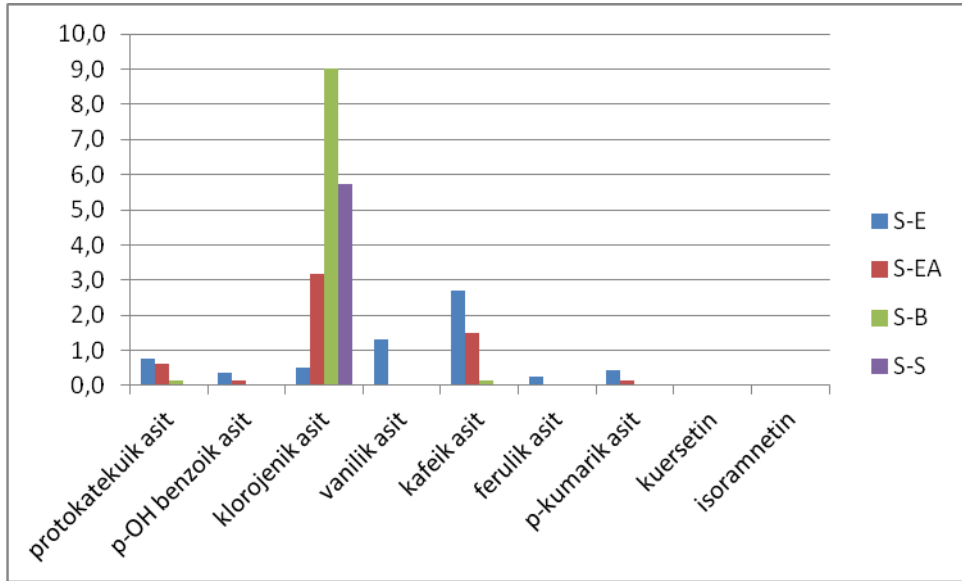
Şekil 15. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin yaprak kısmının sulu ekstraktının 280 nm’de HPLC-UV kromatogramı

İsoramnetinin kromatogramda geç gelmesinden de çıkarılabileceği gibi polaritesinin daha düşük olması ve sulu kısımdan ziyade organik kısımlarda bulunması beklenen sonuçtur ve deneysel olarak da yaprak eter (Y-E) ve yaprak etil asetat (Y-EA)’ta daha fazla olduğu gözlemlendi.

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin sap kısımlarından fenolik bileşiklerin HPLC-UV analizlerinin sonuçları Tablo 4’ de ve grafiksel olarak gösterimi Şekil 16’ da verilmiştir.

Tablo 4. HPLC-UV ile sap ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları (mg /g ekstrakt)

Bileşikler	S-E	S-EA	S-B	S-S
protokatekuik asit	0,75	0,61	0,13	0,02
p-OH benzoik asit	0,37	0,15	0	0
klorojenik asit	0,51	3,18	9,01	5,73
vanilik asit	1,31	0	0	0
kafeik asit	2,70	1,51	0,13	0
ferulik asit	0,25	0	0	0
p-kumarik asit	0,45	0,12	0	0
kuersetin	0	0	0	0
isoramnetin	0	0	0	0



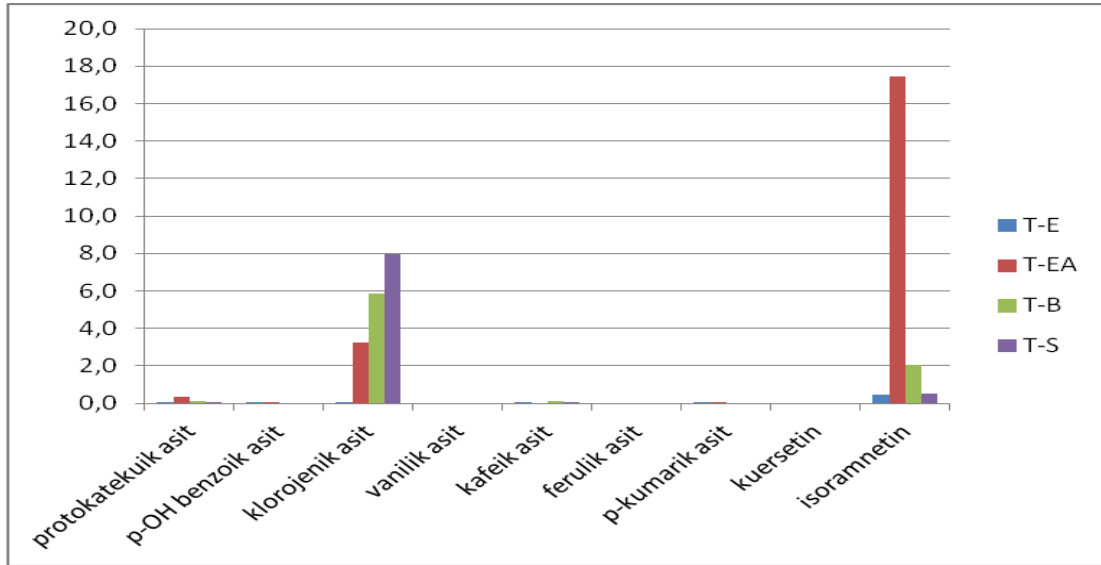
Şekil 16. Sap kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi

Grafiksel sonuçlara (Şekil 16) bakıldığında sap kısmında başlıca klorojenik asit, kafeik asit ve vanilik asit belirlendi. Yaprak ekstraktındaki klorojenik asidin bütanol ekstraktındaki miktarının sulu ekstrakta göre daha fazla olduğu belirlendi. Kafeik asit ise en fazla eter ekstraktında belirlendi.

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısımlarından fenolik bileşiklerin HPLC-UV analizlerinin sonuçları Tablo 5’ de ve grafiksel olarak gösterimi Şekil 17’ de verilmiştir.

Tablo 5. HPLC-UV ile tepe ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları (mg /g ekstrakt)

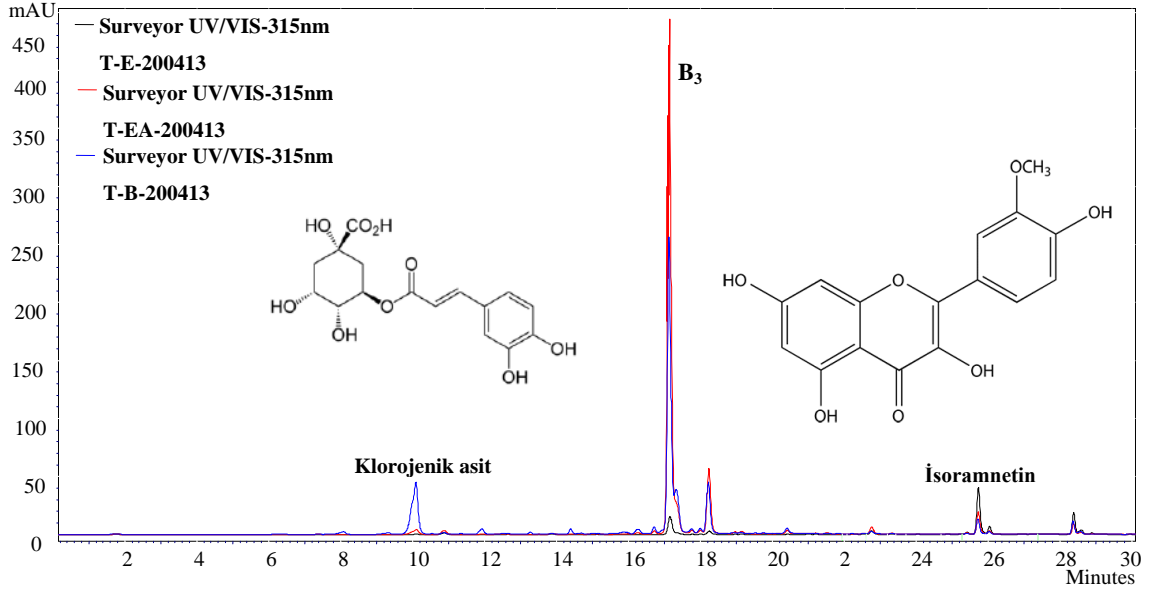
Bileşikler	T-E	T-EA	T-B	T-S
protokatekuik asit	0,01	0,34	0,09	0,08
p-OH benzoik asit	0,01	0,07	0	0
klorojenik asit	0,02	3,21	5,88	7,93
vanilik asit	0	0	0	0
kafeik asit	0,06	0	0,09	0,02
ferulik asit	0	0	0	0
p-kumarik asit	0,01	0,07	0	0
kuersetin	0	0	0	0
isoramnetin	0,47	17,47	2,07	0,51



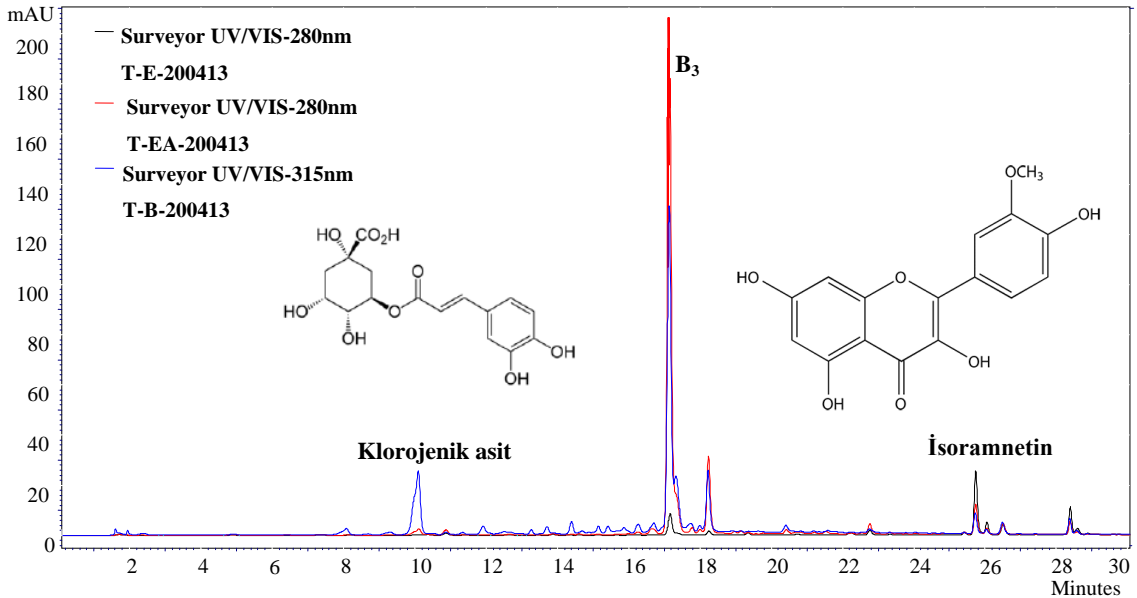
Şekil 17. Tepe kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi

Grafiksel sonuçlara Şekil 17’ye bakıldığında tepe kısmı ekstraktının isoramnetin fenolik bileşiği yönünden zengin olduğu ve etil asetat fazında en çok olduğu belirlendi. Klorojenik asit yine eter fazında çok az olmakla birlikte tüm fazlarda su>bütanol>etil asetat>eter azalan sırasıyla gözlemlendi.

Bitkinin tepe kısımlarının karşılaştırılmalı olarak incelemek için eterli, etil asetatlı ve bütanollü fazların analizleri aynı kromatogramda verildi. Her üç fazda da klorojenik asit ve isoramnetin varlığı Şekil 18 ve Şekil 19'daki kromatogramlarda görüldü.

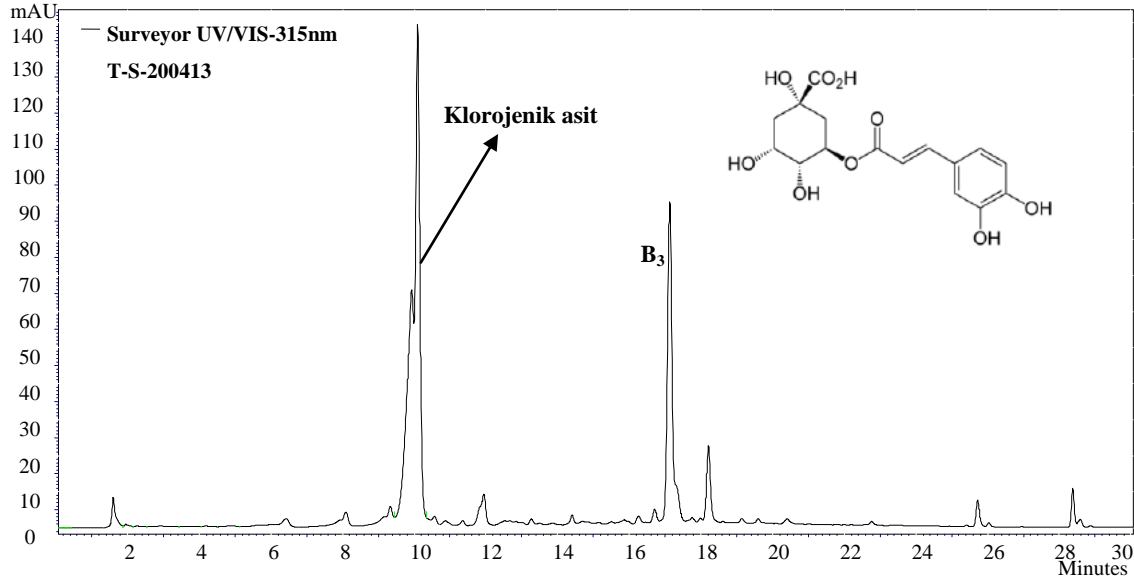


Şekil 18. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının eter, etil asetat ve bütanollü ekstraktlarının 315 nm’de HPLC-UV kromatogramı

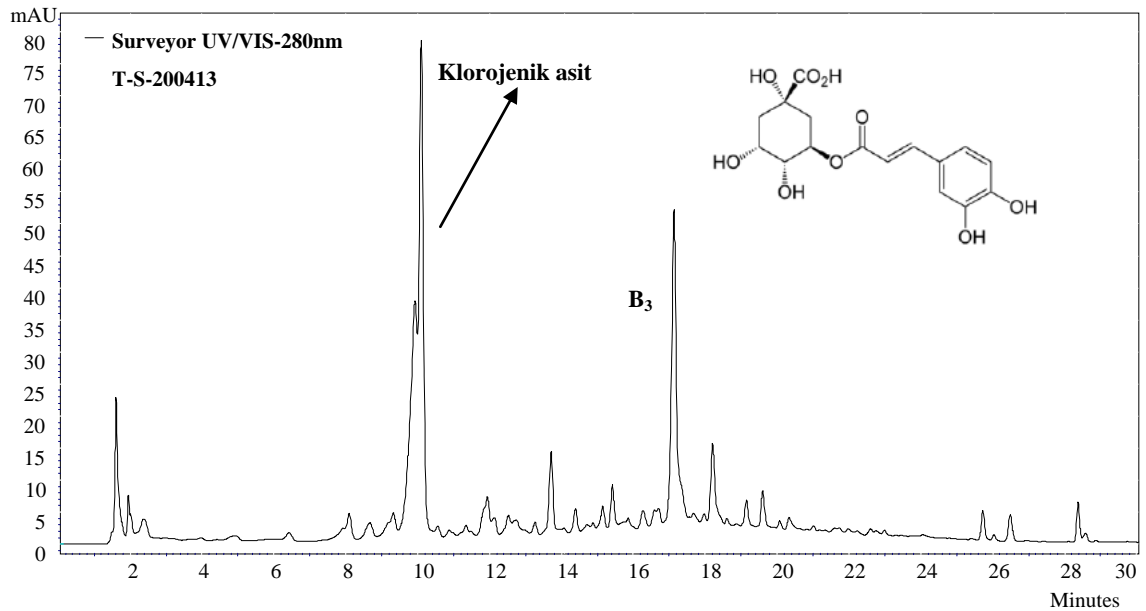


Şekil 19. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının eter, etil asetat ve bütanollü ekstraktlarının 280 nm’de HPLC-UV kromatogramı

Tepe kısmının sulu ekstraktının HPLC-UV analizine bakıldığında klorojenik asit pikinin her iki dalga boyunda da belirgin ve şiddetli olduğu Şekil 20 ve Şekil 21’de görüldü.



Şekil 20. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının sulu ekstraktının 315 nm’ de HPLC-UV kromatogramı

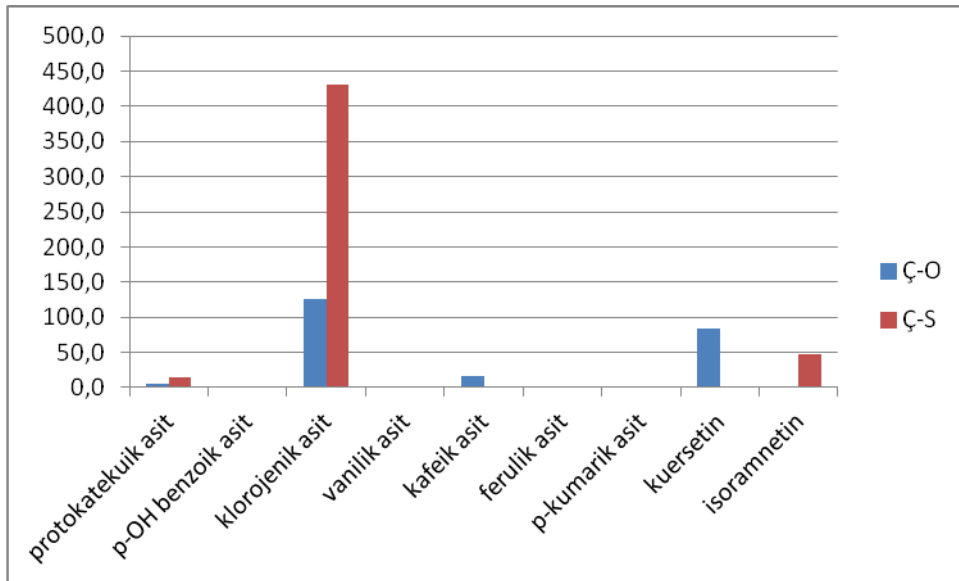


Şekil 21. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin tepe kısmının sulu ekstraktının 280 nm’ de HPLC-UV kromatogramı

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmının fenolik bileşiklerinin HPLC-UV analizlerinin sonuçları Tablo 6’ da ve grafiksel olarak gösterimi Şekil 22’de verilmiştir.

Tablo 6. HPLC-UV ile çiçek ekstraktı fenolik madde analiz sonuçları (mg /g ekstrakt)

Bileşikler	Ç-O	Ç-S
protokatekuik asit	6,20	13,60
p-OH benzoik asit	0	0
klorojenik asit	125,65	431,00
vanilik asit	0	0
kafeik asit	15,94	0
ferulik asit	0	0
p-kumarik asit	1,83	0
kuersetin	83,31	0
isoramnetin	0	47,4

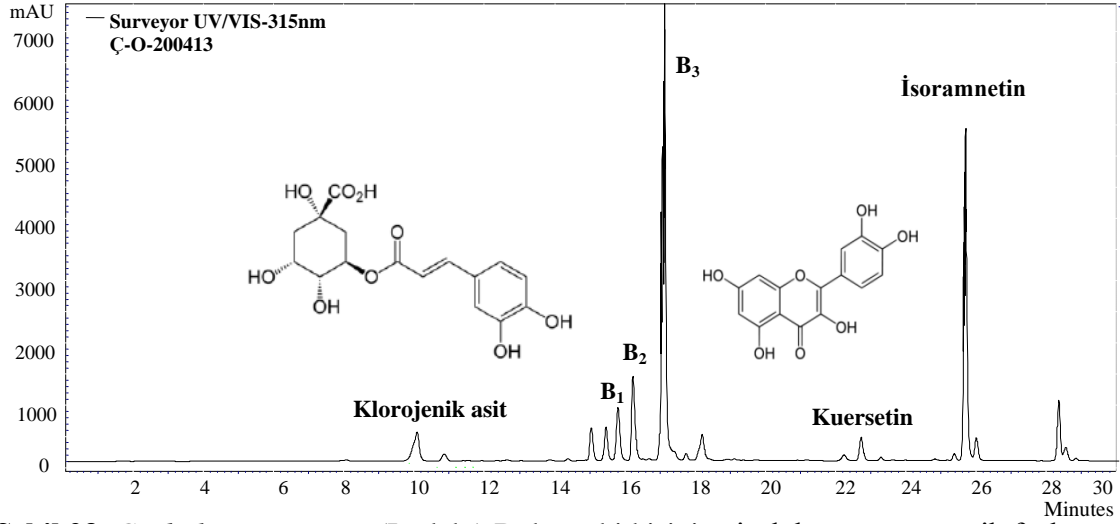


Şekil 22. Çiçek kısmı ekstraktının fenolik madde analizlerinin grafiksel gösterimi

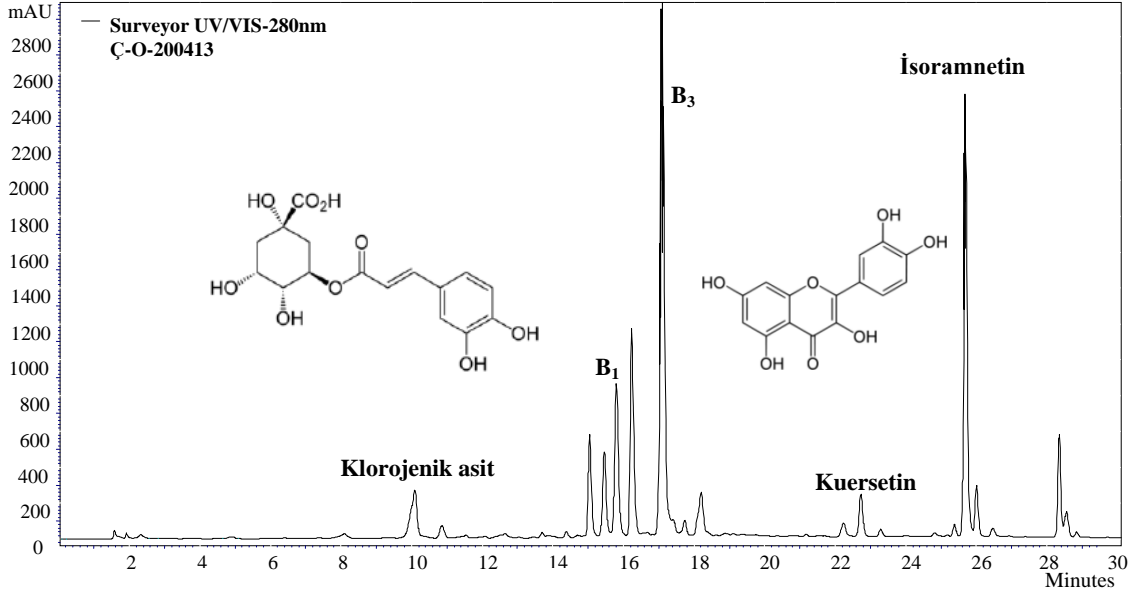
Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmındaki fenolik bileşikler bitkinin diğer kısımlarının ekstraktlarından farklı olarak kuersetinin içerdiği görüldü. Movsumov vd. (2006) yaptıkları çalışmada da *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısımlarının analizinde kuersetin varlığını rapor etmiştir.

Klorojenik asit çiçeğin sulu ekstraktında daha fazla bulundu (Tablo 6 ve Şekil 22). Çiçek kısmının miktar olarak az olmasından dolayı ekstraksiyonunda tüm organik

kısımlar birleştirildi ve sulu kısımlardan ayrı olarak analiz edildi. Böylece klorojenik asidin polar çözücüleri tercih ettiği bir kez daha gözlemlendi. Öte yandan isoramnetinin organik fazlarda değil de sulu fazda bulunması beklenmeyen bir sonuçtur.

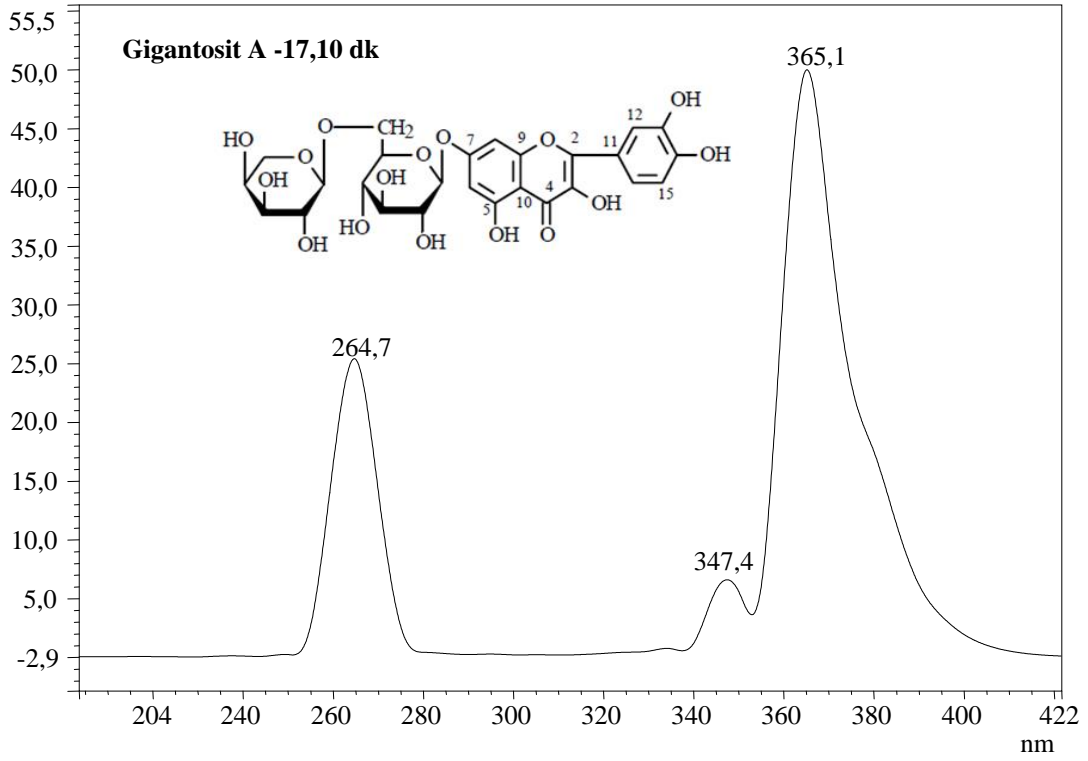


Şekil 23. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmının organik fazlarının 315 nm’deki HPLC-UV kromatogramı



Şekil 24. *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin çiçek kısmının organik fazlarının 280 nm 'deki HPLC-UV kromatogramı

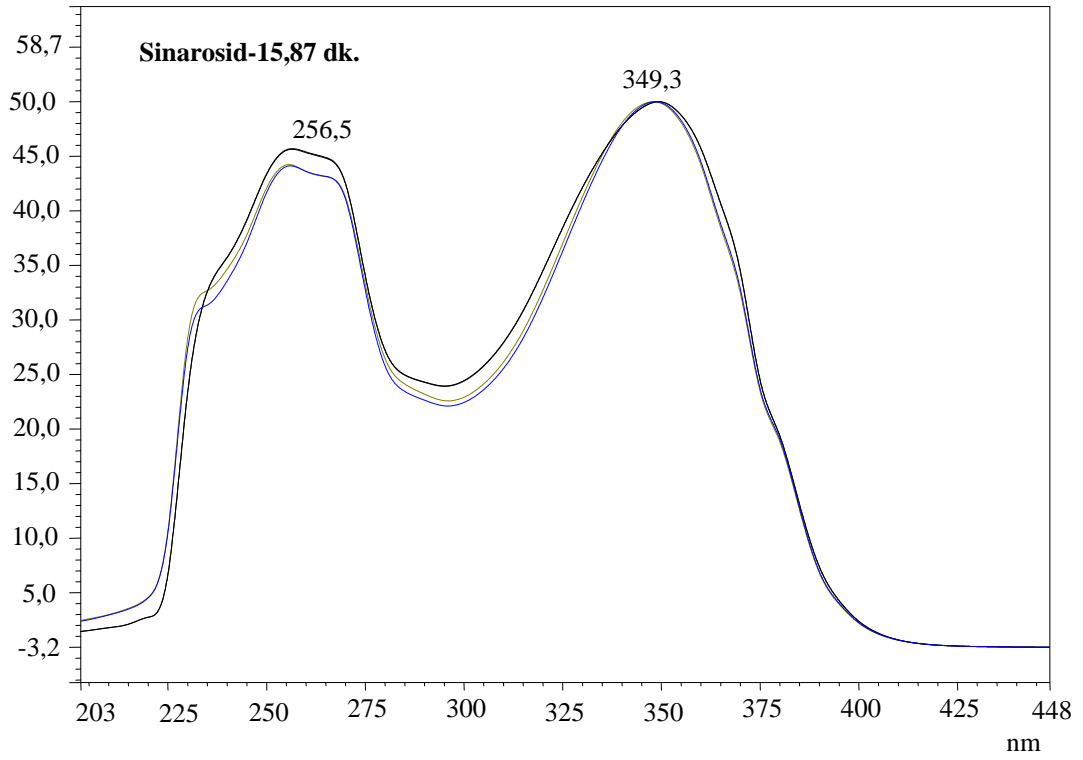
Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin analizlerinde bilinen fenolik bileşiklerin yanında, bilinmeyen pikler gözlemlendi. 17,10 dakikasında gelen B₃ pikine baktığımızda en çok etil asetatlı fraksiyonlarda gözlemlendi. Bitkinin tüm kısımları ele alındığında bilinmeyen B₃ piki en şiddetli olarak çiçek kısmının organik fraksiyonlarında gözlemlendi. Şekil 23'deki kromatograma bakıldığında 315 nm dalga boyunda daha belirgin ve şiddetli olduğu görüldü. Bu pike ait UV-VİS spektrumu Şekil 25' te verildi.



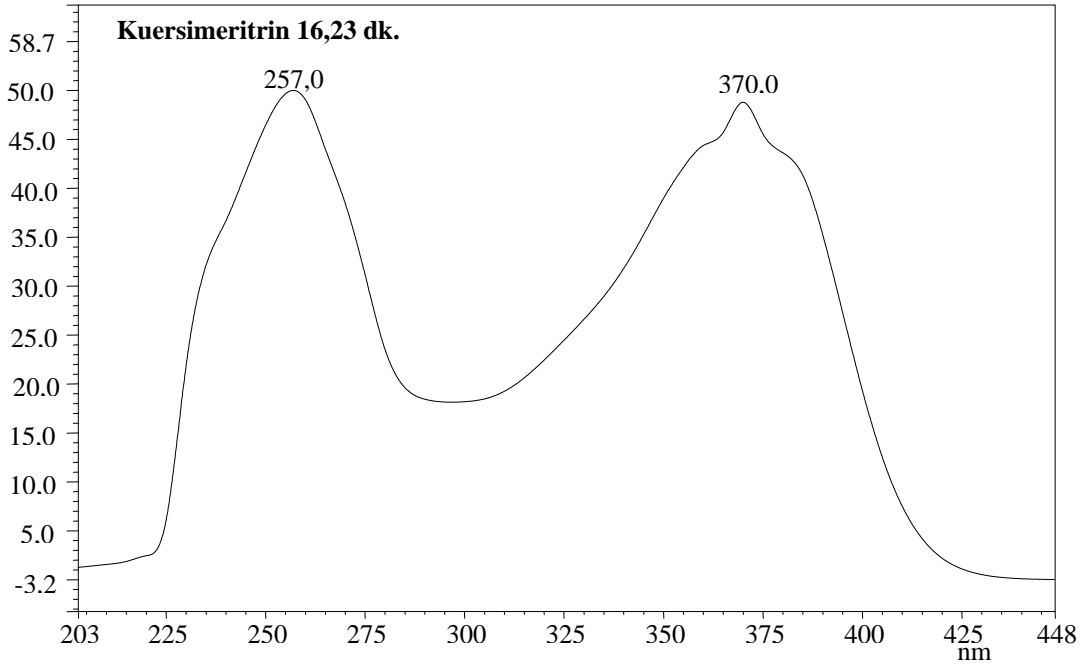
Şekil 25. Bilinmeyen B₃ pikinin UV-VİS spektrumu

Movsumov vd. (2006) *Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov bitkisinin fenolik bileşenlerini araştırdıkları çalışmada yeni bir fenolik bileşik izole edilmiş ve bu bileşiğe Gigantosit A adı verilmiştir. Gigantosit A'nın UV-VİS spektrumuna bakıldığında bilinmeyen B₃ pikine benzer olduğu görüldü. Bu veriler ve literatür bilgilerinden faydalanarak bilinmeyen B₃ pikinin Gigantosit A olduğu söylenebilir (Şekil 25).

Bitkinin çiçek kısmının organik fazında karşılaşılan diğer bilinmeyenlere ait piklerin UV-VİS spektrumları Movsumov vd. (2006) yaptıkları çalışmada bilinmeyen B₁ pikinin Sinarosid, B₂ pikinin ise Kuersimeritrin ile benzer olduğu görüldü (Şekil 26 ve Şekil 27).



Şekil 26. Bilinmeyen B₁ pikinin UV-VİS spektrumu



Şekil 27. Bilinmeyen B₂ pikinin UV-VİS spektrumu

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dipsacaceae ailesine ait 94 tane *Cephalaria* cinsi olup bunların çoğunun Avrupa, Doğu Asya, Doğu Akdeniz ve Kuzey Afrika'da yayılmış olduğu görülmektedir. Bu türlerden 40 tanesinin Türkiye'de de bulunduğu ve bunların 24 tanesinin endemik olduğu bildirilmektedir (Devis, 2008).

Cephalaria cinslerinin içerdiği triterpenoitlerin, flavonoidlerin, glikozitlerin antifungal, antimikrobiyal, antioksidan etkiye sahip olduğu literatürde rapor edilmiştir. Bu yüzden tıp, veterinerlik ve tarımsal alanlarda kullanılmıştır. Fakat literatüre bakıldığında gigantea türüne ait yapılan çalışmaların son derece kısıtlı ve yetersiz olduğu görülmektedir. Bu kapsamda Movsumov vd. (2006) yaptığı çalışma temel olma özelliğine sahiptir.

Cephalaria türleri üzerinde yapılan bu çalışmalara ek olarak fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidleri de içerecek şekilde daha kapsamlı incelendi. Bölgemizde de Verçenik yaylasından sağlanan bu bitkinin çiçek, tepe, sap ve yaprak kısımları ayrı ayrı ekstraksiyona tabi tutuldu. Her bir ekstrakt eter, etil asetat, bütanol ve sulu olmak üzere ayrı fraksiyonlarına ayrılarak HPLC-UV analizlerine tabi tutuldu.

Cephalaria gigantea (Ledeb.) Bobrov bitkisinin fenolik bileşiklerinden bazıları bu tez çerçevesinde aydınlatıldı. Ekstraktlar optimize edilen gradiyent elüsyon yöntemiyle HPLC-UV de analiz edilerek sonuçlar mg eşdeğer standart/g ekstrakt olarak ifade edildi. En yüksek miktarda klorojenik asit olmak üzere, protokatekuik asit ve kafeik asit bitkinin tüm kısım ve tüm çözücü ekstraktlarında gözlemlendi. Bitkinin tepe kısmında isoramnetin, yaprak ve sap kısmında, p-OH benzoik asit ve vanilik asit, çiçek kısmında kuersetin, ve sap kısmında ferulik asit varlığı tespit edildi. Bunların yanında bazı pikler standartları mevcut olmadığından tamamen aydınlatılamadı. Tanımlanamayan piklerin aydınlatılması için HPLC-MS kullanılarak çalışma detaylandırılabilir. Bununla beraber elde edilen pikler fraksiyonlanarak bunların NMR, FTIR spektrumları incelenerek yapıları aydınlatılabilir. Yapısı aydınlatılan bu bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri de incelenerek çalışma genişletilebilir.

Doğu Karadeniz bölgesinin Türkiye üzerinde büyük bir floraya sahip olduğu göz önüne alındığında yapılan çalışmanın bölgemizin bu zenginliğinin ortaya konması yönünden çok önemli olduğu ve bölgemize bir katma değer sağlayacağı öngörülmektedir.

5. KAYNAKLAR

- Alankuş Çalışkan, Ö. And Anıl, H., 1994.** A Bidesmosidic Triterpene Saponin From *Cephalaria Transsylvanica*. J. Nat. Prod. Phytochemistry, ol. 38, No. 6, pp. 1493-1495, 1995
- Akyüz Turumtay, E., İslamoğlu F., Çavuş D., Şahin H., Turumtay H. and Vanholme B., 2014.** Correlation between Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*), Industrial Crops and Products, 52, 687-694.
- Canbaş, A., 1983.** Şaraplarda Fenol Bileşikleri ve Bunların Analiz Yöntemleri. Tekel Enstitüleri, Yayın No: Tekel 279 EM/003, İstanbul.
- Davis, P.H., 2008.** Flora of Turkey And East Aegean Islands, Vol. 4. University Press of Edinburgh, Edinburgh, 582-583, 594-595.
- De Man, J.M., 1999.** Principles of Food Chemistry. 3rd. ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland. 595s.
- Fennema, O. R., 1996.** Food chemistry.3rd ed., Marcel Dekker, New York, 1262 s.
- Fraga, C.G., 2010.** Plant Phenolics and Human Health. Wiley, New Jersey, 593s.
- Frankel, E.N., Finley, J. W., 2008.** How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. J. Agric. Food Chem., 56, 4901–4908.
- Godevac, D., Mandic, B., Vajs, V., Tesevic, V., Menkovic, N., Janackovic, P., Milosavljevic, S., 2006.** Triterpenoid saponins and iridoid glycosides from the aerial parts of *Cephalaria pastricensis*. Biochem. Syst. Ecol. 34, 890–893.
- Godevac, D., Vajs, V., Menkovic, N., Tesevic, V., Janackovic, P., Milosavljevic, S., 2004.** Flavonoids from flowers of *Cephalaria pastricensis* and their antiradical activity. J. Serb. Chem. Soc. 69, 883–886.
- Henden E., Gökçel, İ., Ertas N., 25-29 Haziran 2001.** Eser Analiz Yaz Okulu, İzmir.
- Jackson, R. S., 2000.** Wine Science, Second Edition, Elsevier, 633s.
- Kalender, Ö.B., 2002.** Haşhaş (*Papaver Somniferum* L.) Tohum Yağı Ekstraksiyonu ve Yağın Kompozisyonunun Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi , Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P. And Bakker, J., 1995.** Survey of solvents for the extractions of grape seed phenolics. Phytochem. 6(5), 265-267.
- Kırmızıgül, S., Anıl, H. And Rose, M.E., 1995.** Triterpenoid Glycosides From *Cephalaria transsylvanica*. Phytochemistry, Vol. 39, No. 5, pp. 1171-1174, 1995

- Kırmızıgül, S. And Rose, M.E., 1997.** Hederagenin glycosides from the flowers of *Cephalaria transsylvanica*. *Planta Med.* 63, 51–54.
- Kırmızıgül, S., Anıl, H., Rose, M.E., 1996.** Triterpenoid saponins from *Cephalaria transsylvanica*. *J. Nat. Prod.* 59, 415–418.
- Kırmızıgül, S., Anıl, H., 2002.** New triterpenic saponins from *Cephalaria transsylvanica*. *Turk. J. Chem.* 26, 947–954.
- Kähkönen, M.P., Hpia, A.I., Heikki, J.V., Rauha, J., Pijlaja, K., Kujala, T.S and Heinonen, M., 1999.** “Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds,” *Journal Agriculture Food Chemistry*, 47, 3954-3962.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G., 2005.** Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214–222
- Leibovich, H., Zenou, A., Yosef, E., Nikbachat, M., Kaadan, S., Eshtiwi, H., Nashef, K., Kushnir, U., Miron, J., 2013.** Digestibility by lambs and nutritive value for lactating ewes of a total mixed ration containing *Cephalaria joppensis* silage as wheat silage substitute. *Small Ruminant Research* 112 (2013) 97– 102
- List, P. H. and Schmidt, P.C., 2000.** *Phytopharmaceutical technology*, CRC Press, USA.
- Margalit, I., 2004.** *Concepts in Wine Technology*. The Wine Appreciation Guild, 263, San Francisco.
- McCabe L.W., Smith, J.C. and Harriot, P., 1993.** *Unit Operation of Chemical Engineering*, 614-632, New York, USA.
- Mustafaeva, K., Elias, R., Balansard, G., Suleimanov, T., Mayu-Lede, V., Kerimov, Y., 2008.** Iridoid glycosides from *Cephalaria kotschyi* roots. *Chem. Nat. Comp.* 44, 132-133.
- Moreno-Arribas, M.V. And Polo, M.C., 2009.** *Wine Chemistry And Biochemistry*. Springer Science+Business Media. DOI 10.1007/978-0-387-74118-5_8
- Moon, J.K., Shibamoto, T., 2009.** Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655–1666.
- Movsumov, I. S., Garaev, E. A. and Isaev, M. I., 2006.** Flavanoids From *Cephalaria gigantea* Flowers. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 42, No. 6., UDC 547.944/945
- Nizamlioglu, M.N., Nas, S., 2010.** Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bilesikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, No:1, 5, 20-35.

- Pasi, S., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B., 2002.** A new lignan glycoside and other constituents from *Cephalaria ambrosioides*. *Nat. Prod. Lett.* 16, 365–370.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Duboirdeau., 2000.** Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments. John Wiley and Sons Ltd., England.
- Sarikahya, N.B., Kırmızıgü l, S., 2010.** Antimicrobial triterpenoid glycosides from *Cephalaria scoparia*. *J. Nat. Prod.* 73, 825–830.
- Sarikahya, N.B., Pekmez, M., Arda, N., Kayce, P., Karabay Yavaşoğlu, N.Ü., Kırmızıgü l, S., 2011.** Isolation and characterization of biologically active glycosides from endemic *Cephalaria* species in Anatolia. *Phytochemistry* 4, 415–420
- Shahidi, F., Naczk, M., 2003.** Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press LLC, ABD, 1-14.
- Shi, J., Mazza, G. and Maguer, M.L., 2002.** Functional Foods Biochemical and Processing Aspects Volume2 (Ed: Skrede G. ve Wrolstad R.E), CRC Press, 73-74.
- Shing, R.K, Rivzi, S.H., 1995.** “Bioseparation process in foods,” Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Inc.
- Skoog, D. A., Holler, F. T. And Neiman, T. A., 1997.** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi. 728-736. E. Kılıç, F. Köseođlu ve H. Yılmaz, Enstrümental Analiz İlkeleri. 1997, Bilim Yayıncılık, ISBN: 975-55-041-6, 849s.
- Tabatadze, N., Elias, R., Faure, R., Gerkens, P., De Dauw-Gillet, M.C., Kemertelidze, E., Chea, A., Ollivier, E., 2007.** Cytotoxic triterpenoid saponins from the roots of *Cephalaria gigantea*. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 102–105.
- Termentzi, A., Kefalas, P. And Kokkalou, E., (2006).** Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry*, 98, 599–608.
- URL-1, 2013.** [http://maycalistaylari.comu.edu.tr/maycalistaylari/phocadownload/userupload/lis 2/Danisman/Birsen_Demirata_Ozturk.pdf](http://maycalistaylari.comu.edu.tr/maycalistaylari/phocadownload/userupload/lis%20Danisman/Birsen_Demirata_Ozturk.pdf) (12 Ocak 2013)
- URL-2, 2014.** <http://www.saylor.org/site/wp-content/uploads/2012/07/Chapter1011.pdf> (17 Ocak 2014)
- URL-3, 2014.** <http://www.pharmacelsus.de/hplc/> (23 Ocak 2014)
- URL-4, 2014.** <https://gobotany.newenglandwild.org/species/cephalaria/gigantea/> (23 Ocak 2014)

- URL-5, 2014.** <http://bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Cephalaria> (23 Ocak 2014)
- Uyan C., 2007.** Ayırma ve Zenginleştirme Yöntemleri Ders Notları, Cumhuriyet Üniversitesi, s.27-28.
- Wan P.J., Wakelyn, P.J., 1997.** Technology and Solvents for Extracting Oilseed and Nonpetroleum Oils, AOCS Pressure.
- Yücel, U., Ötleş, S., 2001.** Şarabın bileşimi ve beslenmedeki önemi. Dünya Gıda, 6, 5, 79-82.

ÖZGEÇMİŞ

11.09.1988 tarihinde Sakarya` da doğdu. İlköğrenimini ve orta öğretmini Darıçayırı Şehit Oktay DEMİRCİ okulunda tamamladı. Liseyi Adapazarı Ş. ÜST. Selçuk ESEDOĞLU lisesinde tamamladı. Yükseköğrenimine 2007 yılında Rize Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2012 yılı itibariyle Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinde Kimya Bölümünde lisansüstü eğitimine başlamış olup halen devam etmektedir.