



# Tunceli dağ sarımsağı (*Allium tuncelianum*) farklı ekstraksiyonlarında LC-MS/MS ile fenolik bileşik miktarlarının karşılaştırılması

## Comparison of amount of phenolic compounds by using LC-MS / MS in Tunceli mountain garlic (*Allium tuncelianum*) different extracts

Kasım TAKIM<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya A.B.D, Şanlıurfa, Türkiye

### To cite this article:

Takım, K., Koyuncu, M. & Sayaslan, A. (2020). Tunceli dağ sarımsağı (*Allium tuncelianum*) farklı ekstraksiyonlarında LC-MS/MS ile fenolik bileşik miktarlarının karşılaştırılması. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 24(1): 44-52.  
DOI: 10.29050/harranziraat.591171

**Address for Correspondence:**  
Kasım TAKIM  
**e-mail:**  
kasimtakim@harran.edu.tr

**Received Date:**  
12.07.2019

**Accepted Date:**  
24.02.2020

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

### ÖZ

Bu çalışmada ekstraksiyon yöntemi ve çözügen farklılığının, Tunceli Dağ Sarımsağı'nda fenolik bileşen karakterizasyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Fenolik bileşiklerin karakterizasyonu için; 25 fenolik bileşik kullanılarak, yeni bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve bu metod Tunceli Dağ Sarımsağı (TDS) için kullanılmıştır. Ekstraksiyon yöntemi olarak; infüzyon ve hidrolizasyon metodu, çözügen olarak; etanol, metanol, su ve etanol/su (% 50 [v/v]) olmak üzere 4 farklı çözücü kullanılmıştır. TDS içerisinde 25 farklı fenolik bileşen aranmış ve bunlardan 16 fenolik bileşenin var olduğu tespit edilmiştir. TDS'nin major bileşenlerinin; pirokatekol ( $14018.98 \pm 3.61 \mu\text{g L}^{-1}$ ), vanilik asit ( $1887.24 \pm 0.397 \mu\text{g L}^{-1}$ ) ve fumarik asit ( $1812.34 \pm 0.211 \mu\text{g L}^{-1}$ ) olduğu belirlenmiştir. TDS nin fenolik içeriğinin çeşitlilik açısından zengin, ancak miktar açısından fakir olduğu görülmüştür. Genel olarak en iyi çözügenin etanol ve en ideal ekstraksiyon yönteminin ise hidrolizasyon olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, farklı analiz tekniği, farklı ekstraksiyon işlemi ve farklı çözügen kullanımının; *Allium tuncelianum* için, fitokimyasal içerik üzerine oldukça önemli etkilerinin olduğu anlaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sarımsak, Fitokimyasal İçerik, Fenolik, LC-MS/MS, Ekstraksiyon

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effect of extraction methods and solvent differences on phenolic component characterization in Tunceli Mountain Garlic. For the characterization of phenolic compounds; A new LC-MS / MS method was developed using 25 phenolic compounds and this method was used for Tunceli Mountain Garlic (TDS). As extraction method; infusion and hydrolization method, as solvent; ethanol, methanol, water and ethanol / water (50 % [v/v]), including four different solvents were used. In TDS, 25 different phenolic components were searched and 16 phenolic components were found out of them. Major components of TDS; pyrocatechol ( $14018.98 \pm 3.61 \mu\text{g L}^{-1}$ ), vanilic acid ( $1887.24 \pm 0.397 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and fumaric acid ( $1812.34 \pm 0.211 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The phenolic content of TDS was found to be rich in diversity but poor in quantity. In general, the best solvent was ethanol and the most ideal extraction method was hydrolization. As a result, different analysis technique, different extraction process and different solvent use; For *Allium tuncelianum*, it was found to have significant effects on phytochemical content.

**Key Words:** Garlic, Phytochemical content, Phenolic, LC-MS / MS, Extraction

### Giriş

Son zamanlarda hastalıkların tedavisinde doğal bitkilerin kullanımı önem kazanmaktadır (Işık ve ark., 2015). Tıbbi bitkilerin ve bu bitkilere ait

fenoliklerin ve uçucu yağların saf ve özellikle ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi hem bilimsel hem de ekonomik yönden oldukça önemlidir (Demir ve ark., 2017). Sağlık açısından birçok faydası bulunan sarımsak üzerinde uzun

yıllardan beri birçok araştırma yapılmış ve hala yapılmaktadır (Paka, 2003). Bitkilerin yetiştikleri bölgedeki çevresel şartlar, tarımsal faktörler gibi dış etkenler ve genetik faktörler gibi iç etkenler bitkilerin kimyasal içerikleri üzerinde oldukça etkilidir (Aydın ve Köçkar, 2008; ; Yıldırım ve Atasoy, 2017). Ayrıca bitkilerden elde edilen özütlerin fitokimyasal içeriğinde; ekstraksiyon yöntemi ve kullanılan çözümler oldukça etkilidir (Çetintaş ve ark., 2012 ; Ramluckan ve ark., 2014; Kesen, 2019).

*Allium tuncelianum*, Tunceli ili Munzur Dağları eteklerinde yer alan Ovacık ve Pülümür ilçelerinde, yaygın olarak yetişen endemik bir bitki türüdür (Özhatay, 2002). Tunceli Sarımsağı olarak bilinen bu endemik sarımsak türünün kimyasal yapısının, kültür sarımsağına (*A. sativum*) benzer olması nedeniyle yöre halkı tarafından dağlardan toplanıp tamamlayıcı tıp alanlarında kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramalarında Elazığ ve Tunceli bölgesinde endemik bir bitki olarak yetişen Tunceli Dağ Sarımsağı (*Allium tuncelianum*) yapısında bulunan fitokimyasal bileşiklerin antibakteriyel ve antikanser etkilerinin önemli oranda olduğu bildirilmiştir (Kasım, 2015). *Allium tuncelianum* (*A. Tuncelianum*); monocotyledonea (tek çenekliler) sınıfının, Liliaceae familyasının *Allium* cinsi içerisinde yer almaktadır. *A. tuncelianum* endemik bir bitki türü olup ilk kez *Allium Macrochaetum*'un bir alt türü olarak tanımlanmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda; bunun farklı bir tür olduğu anlaşılmış ve tür düzeyine yükseltilecek *Allium tuncelianum* adı verilmiştir. *A. tuncelianum*; tek dişlidir, kabuk sayısı kültür sarımsağından azdır (1-2 adet) ve başları 18-20 °C'de uzun süre saklanabilir. Bu özellikleri sayesinde, taze tüketim ve endüstride kullanım şansına sahip bulunmaktadır (Hirschegger ve ark., 2010; Kasım, 2015).

Fenolik bileşikler bitkiler âleminde en yaygın bulunan maddeler grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmakta ve günümüzde 8000'den fazla fenol bileşiği yapısı bilinmektedir (Yünlü ve Kır, 2016; İnanç ve Yüksel, 2018). Kromatografi

tekniklerindeki ilerlemeler sonucunda fenolik bileşikler üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Çeşitli gıdalardaki fenolik bileşiklerle ilgili fazla sayıda araştırma yapılmasına rağmen, *Allium tuncelianum* için böyle bir çalışma bulunmamıştır. Bitkilerde fitokimyasal bileşiklerin tanımlanması için çeşitli teknikler kullanılır. Bunlardan başlıcaları; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS)'dir (Pandey ve ark., 2011).

Bu çalışmada, *A. tuncelianum*'un su, etanol, metanol etanol/su (1/1) ve HCl ile hidroliz edilmiş ekstraktlarının; LC-MS/MS teknikleri ile fenolik bileşiklerin karakterizasyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon yöntemi olarak hidrolizasyonun tercih edilmesinin nedeni daha fazla fenolik bileşik tanımlayabilmektir. Çünkü bitkilerdeki fenolik bileşikler çoğunlukla karbonhidrat, protein ve diğer organik bileşiklerle bağ yapmış halde bulunurlar, hidrolizasyon işlemi sırasında bu bağlar, sıcaklık ve hidroklorik asit etkisiyle parçalanır ve saf fenolik bileşikler elde edilir. Bu çalışmada da bu hipotez Tunceli Dağ Sarımsağı kullanılarak araştırılacaktır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Bu çalışma için kullanılan *A. tuncelianum*, Tunceli ilinde bulunan Munzur Dağı'nın Ovacık ilçesi yönüne bakan yamaçlarından ağustos ayının ikinci haftası içerisinde toplandı. İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı tarafından tür tespiti doğrulandı. Ekstrakte edilene kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Kuru madde miktar belirleme işlemi Ağbaş ve ark., (2013) yöntemi esas alındı. Sarımsak örnekleri etüv fırınında 103°C'de 3 saat bekletmek suretiyle sabit tartıma getirildikten sonra kuru madde miktarları belirlendi.

### Metot

#### İnfüzyon ile ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi LC-MS/MS çalışmaları için; su, metanol, etanol ve % 50 (v/v) etanol-su çözücü karışımları kullanıldı. Havanda iyice ezilen

sarımsak üzerine Sarımsak/çözücü oranı 1/10 olacak şekilde çözücü ilave edilip ağzı kapalı olarak 24 saat çalkalayıcıda karıştırıldı. Sarı-yeşil renkte ekstreler elde edildi. Ekstreler süzme işlemine tabi tutulup, evaporatör ve liyofilizatör kullanılarak çözümleri uzaklaştırıldı. Yaş sarımsaktan 10 g alınarak ekstraksiyon yapıldı ve 1.5-2.5 g aralığında kuru ekstreler elde edildi. Evaporatör ve liyofilizatörde çözümleri uzaklaştırılarak elde edilen kuru maddenin hava ile fazla temasına izin verilmeden +4°C de buzdolabında, analiz zamanına kadar muhafaza edildi (Takım ve ark., 2018). LC-MS/MS analiz sonuçları hesaplanırken toplam kuru madde oranı dikkate alınarak hesaplandı. Ayrıca sonuçların standart sapma ( $\pm$ ) değeri = Analit değeri sonucu \*U değeri/100 formülü ile hesaplandı (Taban ve ark., 2013; Agar ve ark., 2015).

#### *Hidrolizasyon ile ekstraksiyon*

Bu yöntemde Hertog ve ark., (1992) kullandığı metot, Tunceli Dağ Sarımsağı için uyarlanmıştır. Tunceli Dağ Sarımsağı örnekleri havanda iyice parçalandıktan sonra 10 g tartılmıştır. Bir erlen içerisine alınarak üzerine; 40 mL % 62.5 metanol ve 10 mL 6 M HCl eklenmiştir. Ağzı kapalı olarak su banyosunda; 80 °C'de, 2 saat bekletilmiştir. Biraz bekleyip örnek soğuduktan sonra Whatman No:4 filtre kağıdından süzülüp 0.45  $\mu$ m lik filtreden geçirilmiştir. Süzüntünün 20  $\mu$ L'si LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir.

#### *Fenolik bileşiklerin LC-MS / MS ile tayini*

Bu kapsamda *Allium tuncelianum* ekstrelerinde biyoaktif bileşen analizi, LC-MS/MS ile analizi yapılmıştır. 25 fenolik madde kullanılarak geliştirilen yöntemin validasyon çalışmaları ve analizleri; Harran Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Bitki materyallerinde yaygın olan bu fenolik bileşikleri flavonoidler, flavonoid glikozitler, hidroksisünamik ve hidroksibenzoik asitler olarak sınıflandırmak mümkündür. LC-MS/MS ile fenolik bileşiklerin analizi, ikili MS cihazı bağlanmış bir Nexera modeli Shimadzu HPLC kullanılarak yapıldı. Sıvı kromatografisi LC-30AD ikili pompa, DDU-20A3R

degazör, KTO-10AS vp kolon fırını ve SIL-30AC otomatik örnekleyici ile donatılmıştır. Kromatografik ayırma, C18 ters-faz analitik kolonu Inertsil ODS-4 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 3  $\mu$ m) ile gerçekleştirildi. Kolon sıcaklığı 40°C'de sabit tutuldu. Elüsyon gradienti mobil faz A (su, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ve mobil faz B (metanol, 5mM amonyum format ve % 0.1 formik asit) ile oluşturuldu. Gradient programı B çözücüsünün aşağıdaki değerlerine göre t (dk) uygulanmıştır. B %: (0.40), (20.90), (23.99), (24.40), (29.40). Çözücü akış hızı: 0.5 mL/dk olarak uygulandı ve enjeksiyon hacmi 4 $\mu$ L olarak ayarlandı. MS tespiti Shimadzu LC-MS 8040 modeli üçlü, dört kutuplu ve hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında ESI kaynak işletimi ile donatılmış kütle spektrometresi kullanılarak yapıldı. LC-MS/MS verileri Lab Solutions yazılımı (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ile elde edilerek hesaplamalar yapıldı. Çoklu reaksiyon takip işlemi (MRM) modu analizi ölçmek için kullanıldı. Deneyde her bir bileşik analizi için üç kez uygulama yapıldı. Birinci kantitatif sonuçlar için ikinci ve üçüncü analizler ise teyit için yapıldı. Optimum Electrospray Ionization (ESI) parametreleri; 350°C ara yüz sıcaklığı, 250°C DL sıcaklığı, 400°C ısı bloğu sıcaklığı, 3L/dk. Nebullizer gaz akışı ve 15 L/dk. kurutucu gaz akışı olarak belirlendi (Köksal ve ark., 2017).

#### **Araştırma Bulguları ve Tartışma**

##### *Kuru madde analiz sonuçları*

Sarımsak örneklerinin kuru madde miktarları analizi sonucu; % 61.92 oranında nem ve % 38.08 oranında kuru madde içerdiği tespit edildi. Sonuçlar bu oran dikkate alınarak hesaplandı. Bitki örneklerinde içerik analizi yapılırken, kuru madde miktarının belirlenmesi sonucun daha anlamlı ve hesaplanabilir olabilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Literatürde sarımsakla ilgili diğer içerik analiz çalışmalarında da kuru madde esas dikkate alınarak hesaplanmıştır. Taban ve ark., (2013) yaptıkları çalışmada; Sarımsak yumrularında kuru madde ilkesine göre 3.535-9.330 mg kg-1 selenyum saptamışken, bu

değer taze ağırlık ilkesine göre hesaplandığında; 0.884-2.333 mg kg-1 arasında belirlenmiştir. Genel ortalama, kuru madde ilkesine göre 6.488 mg Se kg-1 iken, taze ağırlık ilkesine göre ise 1.622 mg Se kg-1 olarak saptandığını rapor etmişlerdir.

### Standart karışımın LC-MS/MS validasyon çalışma bulguları

Standart karışımında bulunan; 25 fenolik bileşiğe ait LC-MS/MS validasyon çalışmasının sonuçları Çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1. Standart karışımın LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreleri.

Table 1. Analytical parameters of the standard mixture for LC-MS/MS analysis method.

Standartlar Standards	Ana iyon (m/z) <sup>a</sup> Main ion (m/z) <sup>a</sup>	RSD % <sup>b</sup> RSD % <sup>b</sup>	LOD/LOQ (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup> LOD/LOQ (µg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Geri kazanım (%) Recovery (%)	U <sup>d</sup> U <sup>d</sup>	RT <sup>e</sup> RT <sup>e</sup>	R <sup>2</sup> <sup>e</sup> R <sup>2</sup> <sup>e</sup>	Denklemler Equation
Kuersetin Quercetin	300.90	0.0136	22.5/25.7	1.00130	0.0298	6.091	0.999	Y=(13.7831)X+(-146.951)
Asetohidroksamik Asit Acetohydroxamic Acid	43.01	0.0082	2.8/8.2	1.00075	0.0167	1.986	0.999	Y = (150.982)X + (23.1833)
Kateşin Hidrat Catechin hydrate	152.95	0.0236	8.2/11.4	0.99404	0.0523	4.958	0.999	Y = (79.2933)X + (-2406.22)
Vanililik Asit Vanillic Acid	166.90	0.0062	125.5/142.2	1.00093	0.0208	6.026	0.997	Y = (48.0522)X + (-876.904)
Resveratrol Resveratrol	227.0	0.0131	9.0/13.6	0.9985	0.0265	5.713	0.997	Y = (46.4361)X + (-1314.61)
Fumarik Asit Fumaric Acid	115.00	0.0047	25.2/31.3	0.99748	0.0116	3.674	0.998	Y = (20.2986)X + (-762.592)
Gallik Asit Gallic acid	168.85	0.0136	0.90/1.6	1.00004	0.0288	4.134	0.999	Y = (65.3835)X + (-2699.84)
Kafeik Asit Caffeic Acid	178.95	0.0137	6.3/10.7	1.00917	0.0254	5.283	0.996	Y = (124.785)X + (-487.132)
Floridzin Dihidrat Floridzin Dihydrate	436.5	0.0564	61.0/207.0	1.0001	0.1272	5.646	0.998	Y = (33.4069)X + (-1396.90)
Oleropin Oleuropein	377.123	0.0694	0.05/1.0	0.997	0.1364	5.643	0.998	Y = (25.9240)X + (-558.916)
4-Hidroksisinamik Asit 4-Hydroxy Cinamic Acid	222.95	0.0139	8.7/16.1	1.00164	0.0281	5.738	0.995	Y = (13.1516)X + (717.421)
Elagik Asit Elagic Acid	301.00	0.0856	0.101/0.333	1.00232	0.154	5.895	0.999	Y = (5.25903)X + (-1167.31)
Mirisetin Myricetin	317.00	0.0079	55.4/59.6	0.99982	0.0148	5.858	0.999	Y = (37.0934)X + (2684.23)
Protokateşik asit Protocatechuic acid	152.95	0.0129	30.3/35.4	1.01070	0.0243	4.96	0.997	Y=(307.55)X + (31226.26)
Silimarin Silymarin	482.00	0.0138	0.5/1.2	0.9984	0.0302	5.987	0.995	Y = (31.9969)X + (-1823.79)
2-Hidroksi 1.4Naftakinon 2-Hydroxy 1.4 Naphthaquinone	206.5	0.0121	0.5/1.5	0.9989	0.0256	6.58	0.997	Y = (203.469)X + (29033.1)
Pirokatekol Pyrocatechol	109.00	0.0134	22.7/28.6	0.9998	0.0258	6.42	0.998	Y=(32.87)X + (15856)
Naringenin Naringenin	270.95	0.0205	5.4/6.4	0.99883	0.0521	6.104	0.995	Y = (317.241)X + (33733.3)
Luteolin Luteolin	284.75	0.0057	0.5/2.5	1.00772	0.0174	6.19	0.997	Y = (34.6668)X + (3721.79)
Kemferol Kemferol	284.75	0.0144	206.6/214.3	0.99971	0.0209	6.288	0.999	Y = (2.63905)X + (-206.494)
Kurkumin Curcumin	369.30	0.0598	0.1/0.75	1.0121	0.1023	6.516	0.996	Y = (227.706)X + (-10111.1)
Timokinon Thymoquinone	165.08	0.0766	1.5/4.5	0.9986	0.1482	6.632	0.999	Y = (60.4553)X + (2285.92)
Alizarin Alizarin	239.05	0.035	65.2/77.5	0.9667	0.0794	6.800	0.998	Y = (3.97487)X + (1614.23)
4-Hidroksibenzoik Asit 4-Hydroxybenzoic Acid	136.95	0.0154	30.5/40.25	0.99662	0.0426	6.130	0.998	Y = (735.804)X + (-498.102)
Salisilik Asit Salicylic acid	136.95	0.0124	4.2/7.6	1.00989	0.0258	6.104	0.999	Y = (746.369)X + (6072.41)

<sup>a</sup> Ana iyon(m/z): Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), <sup>b</sup> RSD: Bağlı standart sapma, <sup>c</sup> LOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayin sınırı, <sup>d</sup> U (%): 95% güven seviyesinde bağlı standart belirsizlik (k=2), <sup>e</sup> RT: Alıkonma zamanı, <sup>f</sup> R<sup>2</sup>: Belirleme katsayısı

<sup>a</sup> Main ion (m/z): Molecular ions of standard compounds (m / z ratio), <sup>b</sup> RSD: Relative standard deviation, <sup>c</sup> LOD/LOQ (µg/L): Determination limit / Detection limit, <sup>d</sup> U (%):Relative standard uncertainty at 95% confidence level (k=2), <sup>e</sup> RT: Retention time, <sup>f</sup> R<sup>2</sup>: Determination coefficient

Analitik yöntemin uygulanabilirliği ve standart bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayini bu verilerle doğrulanmıştır. Çalışılan standart bileşiklerin doğrusal regresyon alıntıları ve doğrusallık aralıkları Çizelge 1'de verilmiştir. Korelasyon

katsayıları 0,99'dan yüksek bulunmuştur. Analitik yöntemin tespit limiti (LOD) ve nicelik limiti (LOQ), Çizelge 1'de gösterildi. İncelenen bileşikler için, LOD; 0.5–206.8 µg/L arasında değişti ve LOQ; 0.1-214.3 µg/L arasında değişti. Ayrıca, fenolik

bileşiklerin geri kazanımları; % 96.6 ile % 101.1 arasında değişmektedir. Literatürde fenolik bileşen analizi için yapılan metod validasyon çalışmaları fazlasıyla mevcuttur. Bizim validasyon sonuçlarımız, literatürdeki verilerle paralellik arz etmektedir ve korelasyon aralıkları literatür verilerindeki sınırlar içerisinde bulunmuştur. Zhu ve ark., (2012) yaptıkları metod validasyon çalışmasında; tüm kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayıları 0,9990'dan yüksek, geri kazanımların ise % 95.9 ile % 106 arasında değişmekte olduğunu belirlemişlerdir. Yine Agar ve ark., (2015) *Achillea* türleri için yaptıkları LC-MS/MS validasyon çalışmasında; LOD: 0.05–25.8  $\mu\text{g L}^{-1}$  ve LOQ: 0.17-85.9  $\mu\text{g L}^{-1}$  arasında değiştiğini, ayrıca, fenolik bileşiklerin geri kazanımları; % 96.9 ile % 106.2 arasında değiştiğini rapor ederek, bizim sonuçlarımızla örtüşen veriler elde etmişlerdir.

#### TDS farklı ekstraksiyonlarının LC-MS/MS ölçüm sonuçları

TDS farklı ekstraksiyonlarının LC-MS/MS sonuçları Çizelge 2' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; toplam 25 fenolik bileşik içerisinde, 16 tanesi TDS farklı ekstraktları içerisinde tespit edilebilmiştir. Etanol ekstresinde 15; Metanol ekstresinde 12; etanol/su (1/1) ekstresinde 15; su ekstresinde 11 ve hidrolize edilmiş ekstre içerisinde ise 13 fenolik bileşik tespit edilmiştir.

Çizelge 2'de yeralan sonuçlara göre; TDS'nin major fenolik bileşiklerinin; pirokatekol, vanilik asit ve fumarik asit olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca 4-Hydroxycinnamic asit, kuersetin ve kafeik asitin ikincil major bileşenler oldukları anlaşılmaktadır. TDS nin fenolik içeriğinin çeşitlilik açısından zengin, ancak miktar açısından fakir olduğu belirlenmiştir. Alarcón-Flores ve ark., (2014) kültür sarımsağı (*Allium sativum*) için yaptıkları fenolik bileşen analizinde, major bileşen olarak; kafeik asit (1.7 ila 28.3  $\text{mg kg}^{-1}$ ) ve kuersetin (9.0 ila 18.9  $\text{mg kg}^{-1}$ ) bileşiklerini belirlemiştir. Onlarda tıpkı bizim gibi, genel olarak sarımsağın toplam içeriğinin, diğer matrislere göre çok daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Simin ve ark., (2013) *Allium flavum* metanol ekstraktları

için yaptıkları LC-MS/MS ile fenolik bileşen analizinde, major bileşen olarak; ferulik, p-kumarik, kafeik, p-hidroksibenzoik, vanilik, protokatekik ve siringik asit, rutin, kuersetin ve kaempferol bileşiklerini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre bizim çalıştığımız sarımsak türünde tespit ettiğimiz fenolik bileşenler, hemen hemen ortak olmakla beraber, major bileşen noktasında birbirlerinden farklılık arz ettikleri görülmektedir. Farklı sarımsak türlerinin major bileşenleri birbirinden farklı olabilmektedir. Nitekim Emir ve ark., (2020) yaptıkları çalışmaya göre; *Allium nigrum* L. ve *Allium subhirsutum* L. sarımsak türlerinin major bileşenleri; 3-hidroksibenzoik asit, kumarik asit ve epigallocateşin gallat olarak bulunmuştur. Phan ve ark (2019), Avusturalya'da yetiştirilen kültür sarımsağında (*Allium Sativum* L.) yaptıkları LC-MS/MS analizinde, major bileşenin para-kumarik asit ve ferulik asit olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçlar bizim çalıştığımız TDS'ndeki sonuçlarla farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar ise; bu sarımsak türünün, kültür sarımsağı ve diğer endemik sarımsaklardan içerik olarak farklı olduğuna işaret etmektedir.

Ekstraksiyonda çözücü farklılığının major bileşeni belirlemede oldukça önemli olduğu görülmüştür. Çünkü saf etanol ve metanol çözücüleri kullanıldığında major bileşen; vanilik asit iken, çözücü olarak su tercih edildiğinde major bileşenin; pirokatekol ve fumarik asit olduğu belirlenmiştir. Diğer bileşenler için ise; çözücü değişiminin, bileşenin miktarına oldukça önemli değişiklikler kattığı anlaşılmıştır. Ekstraksiyon yöntemi değiştiğinde; fenolik bileşiklerin çeşitliliğinde arttığı görülmüştür. Bu durum ise, bitkilerdeki fenolik bileşen karakterizasyonunda, farklı yöntemler kullanılmasının, oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Literatür verileri de bizim sonuçlarımızı desteklemektedir (Hamuel, 2012; Noda ve ark., 2013; Khoddami ve ark., 2013). Fenolik asitler genellikle bitkilerde serbest, esterleşmiş veya glikosile edilmiş formda bulunur. Asidik ve alkali hidroliz, fenoliklerin bitkilerden izole edilmesinde kullanılır ve fenoliklerin

ekstrakttaki stabilitesi için önemlidir (Haghi ve Hatami, 2010; Vichapong ve ark., 2010). Yünlü ve Kır (2016) soğan ve sarımsak üzerine yapmış oldukları çalışmada; üç farklı yöntemle hazırlanan örnekler için en iyi ekstraksiyon yönteminin, 1,2 M HCl içeren %50 metanol ile 80 °C'de 2 saat

hidrolizasyon olduğunu bildirmişlerdir. Prinç, buğday, çavdar ve tritikalede yapılan hidrolizasyon çalışmalarında fenolik asitlerin, hidrolize edilmesiyle daha iyi karakterize edildiği gösterilmiştir (Weidner ve ark., 1999).

Çizelge 2. Farklı ekstraksiyon yöntemi ve farklı çözümler kullanılarak, 25'lik yöntemle yapılan LC-MS/MS analizine ait sonuçlar  
Table 2. Results of by using 25 standard compounds LC-MS/MS analysis using different extraction methods and different solvents.

Komponent/Çözgen Component / solvent	Etanol ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Ethanol ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Su ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Water ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Etanol/Su (1/1) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Ethanol/Water (1/1) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Metanol ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Methanol ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Hidroliz ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) Hydrolysis( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Kuersetin <i>Quercetin</i>	145.65±0.43	176.67±0.052	47.95±0.014	109.93±0.033	34.78±0.011
Asetohidroksamik Asit <i>Acetohydroxamic Acid</i>	10.03±0.002	N.D.	11.88±0.002	N.D.	N.D.
Kateşin Hidrat <i>Catechin hydrate</i>	25.69±0.013	33.798±0.017	24,301±0.013	27.336±0.014	18.04±0.009
Vanilik Asit <i>Vanillic Acid</i>	1 554.0±0.24	1 305.96±0.275	1 887.24±0.397	1 627.19±0.338	1 277.84±0.265
Resveratrol <i>Resveratrol</i>	69.1±0.018	31,14±0.008	98.31±0.026	23.88±0.0063	15.61±0.004
Fumarik Asit <i>Fumaric Acid</i>	1 412.2±0.29	1 812.34±0.211	344.08±0.039	576.66±0.066	2 055.02±0.427
Gallik Asit <i>Gallic acid</i>	4.41±0.0012	3.40±0.004	6.11±0.002	3.69±0.001	2.54±0.0007
Kafeik Asit <i>Caffeic Acid</i>	12.18±0.0031	N.D.	10.93±0.002	210.81±0.054	N.D.
Floridzin Dihidrat <i>Floridzin Dihydrate</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Oleropin <i>Oleuropein</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4-Hidroksisinamik Asit <i>4-Hydroxy Cinamic Acid</i>	135.5±0.0381	301.52±0.008	26.19±0.007	171.35±0.048	447.44±0.125
Elagik Asit <i>Elagic Acid</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Mirisetin <i>Myricetin</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Protokateşik asit <i>Protocatechuic acid</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Silimarin <i>Silymarin</i>	7.74±0.0023	12.42±0.0037	N.D.	6.29±0.0019	N.D.
2-Hidroksi 1.4Naftakinon <i>2-Hydroxy 1.4 Naphthaquinone</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.701±0.0004
Pirokatekol <i>Pyrocatechol</i>	N.D.	14018.98±3.61	7509.64±1.937	N.D.	N.D.
Naringenin <i>Naringenin</i>	3.32±0.0017	N.D.	4.37±0.002	N.D.	3.33±0.0017
Luteolin <i>Luteolin</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kemferol <i>Kemferol</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Kurkumin <i>Curcumin</i>	1.25±0.0013	N.D.	1.61±0.0016	1.06±0.0018	0.86±0.0008
Timokinon <i>Thymoquinone</i>	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Alizarin <i>Alizarin</i>	19.98±0.0158	N.D.	17.62±0.013	28.92±0.022	17.62±0.014
4-Hidroksibenzoik Asit <i>4-Hydroxybenzoic Acid</i>	20.06±0.0085	7.87±0.003	29.13±0.012	32.24±0.014	5.51±0.002
Salisilik Asit <i>Salicylic acid</i>	10.12±0.0026	25.91±0.006	20.31±0.005	N.D.	37.35±0.009

N.D.; Tespit edilemedi, ±; standart sapma değeri),  $\mu\text{g}$ ; Mikro gram, L; Litre  
N.D.; No detected, ±; The standard deviation value,  $\mu\text{g}$ ; Micro gram, L; Liter

Farklı çözücüler de fenolik bileşiklerin karakterizasyonunda farklı sonuçlara neden olmaktadır. Çünkü çözücülerin polaritesi birbirinden farklıdır, bu yüzden polaritesi birbirine en yakın olanlar (çözünen/çözgen) birbirinde daha iyi çözünür ve bu durum da sonuca olumlu olarak etki eder. Genellikle metanol en iyi çözücü olarak nitelendirilmektedir. *Potentilla atrosanguinea*'nın farklı çözücülerle ekstraksiyonunun, fenolik bileşenler üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir araştırmada; % 50 sulu etanol çözücüsünün, saf etanol, saf metanol ve % 50 sulu asetonun daha verimli olduğunu göstermişlerdir (Kalia ve ark., 2008). Bu farklılıklar, ilgili bitkilerin fenolik bileşenlerinin özelliklerinden kaynaklanabilir. Optimum ekstraksiyon çözücüsünün seçilmesine ek olarak, bitkilerden elde edilen fenoliklerin verimini etkileyen, zaman ve sıcaklık gibi iki önemli parametre daha vardır. Normal olarak, artan zaman ve sıcaklık, analit çözünürlüğünü arttırır. Bununla birlikte, bitkilerde bulunan fenolikler, uzun ekstraksiyon süreleri ve yüksek sıcaklıklar nedeniyle enzimatik oksidasyon gibi istenmeyen reaksiyonlara maruz kalır ve bozulur (Khoddami ve ark., 2013). Bu sorunlar ise; ekstraksiyon işleminde, bir teknik ve bir çözgenle sınırlı kalınmaması ve tekniklerin çeşitlendirilmesi gerektiği sonucunu doğurmaktadır.

Fenolikleri ekstrakte etmek için en yaygın kullanılan teknikler organik veya inorganik olan solventler kullanmaktır. Ekstraksiyon süresi, sıcaklık, solvent-numune oranı, numunenin tekrarlanan ekstraksiyonlarının sayısı ve ayrıca solvent tipi dahil olmak üzere çeşitli parametreler fenoliklerin verimini etkileyebilir. Su, aseton, etil asetat, alkoller (metanol, etanol ve propanol) ve bunların karışımları gibi özütleme çözücülerinin seçimi, çıkarılan fenoliklerin verimini etkileyeceği literatür verilerinde mevcuttur (Khoddami ve ark., 2013).

## Sonuçlar

Bu çalışmada; 25 fenolik bileşik kullanılarak, yeni bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. TDS içeriğinde toplam 25 farklı fenolik bileşen

taranmış ve 16 fenolik bileşenin var olduğu tespit edilmiştir. Tek bir çözgen, ya da tek bir yöntemle ortalama 13±2 adet fitokimyasal tespit edilebildiğimiz halde, ekstraksiyon yönteminin ve kullanılan çözgenin değişmesi sonucu, bu sayı 16 adete çıkmıştır. Yani tespit edilen bileşik oranı % 60 artmıştır. Ayrıca tüm parametreler karşılaştırıldığında; ekstraksiyon yöntemi ve çözgen farklılığı, toplam 8 fenolik bileşiğin tespit edilmesini sağlamıştır. Örneğin; 2-Hidroksi 1-4-Naftakinon bileşiği, sadece hidroliz edilen ekstrelerde tespit edilebilmiştir. Ayrıca prokatekol gibi, TDS'ında tespit edebildiğimiz yüksek miktarda bileşik olma özelliğine sahip olan komponent ise; sadece suyun çözücü olduğu sistemlerde görülebilmektedir. Bu verilere göre; sarımsakta fitokimyasal bileşiklerin aranmasında, tek bir çözgen ve yöntemin yeterli olamayacağı sonucuna varılmıştır.

## Ekler

Bu çalışma tamamen Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: 16187) tarafından desteklenmiştir. Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi çalışanlarına ve metod gelişiminin öncüleri olan; Mustafa Abdullah Yılmaz'a ve Eyüp Karaoğul'a teşekkür ederim.

## Kaynaklar

- Agar, O. T., Dikmen, M., Ozturk, N., Yılmaz, M. A., Temel, H., & Turkmenoglu, F. P. (2015). Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected *Achillea* L. species growing in Turkey. *Molecules*, 20(10), 17976-18000.
- Ağbaş, B., Karakuş, D., Adıgüzel, R., Keser, S., & Demir, E. (2013). Tunceli sarımsağının (*Allium tuncelianum*) toplam antioksidan özelliklerinin ve kuru madde içeriğinin normal sarımsak (*Allium sativum*) ile karşılaştırılması. *Bilim ve Gençlik Dergisi*, 1(2), 50-62.
- Alarcón-Flores, M. I., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2014). Determination of phenolic compounds in artichoke, garlic and spinach by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food analytical methods*, 7(10), 2095-2106.
- Aydın, S. Ö., & Köçkar, F. (2008). Farklı genomik dna izolasyon yöntemlerinin satureja (*labiatae*) türlerinde uygulanması. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri*

- Enstitüsü Dergisi*, 10(1), 52-60.
- Çetintaş, Y., Erol, E., Sıcak, Y., Öztürk, M., & Duru, M. E. (2009). Tricholoma terreum (Schaeff.: Fr) Kumm.'un Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Elde Edilen Ekstrelerinde Antioksidan, Antikolinesteraz ve Üreaz, İnhibisyon Aktivitelerinin Araştırılması. *Bioresource Technology*, 100, 1682-1686.
- Demir, Y., Işık, M., Gülçin, İ., & Beydemir, Ş. (2017). Phenolic compounds inhibit the aldose reductase enzyme from the sheep kidney. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(9), <https://doi.org/10.1002/jbt.21935>
- Doughari, J. H. (2012). *Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents*. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher. <https://doi.org/10.5772/26052>
- Emir, A., Emir, C., & Yıldırım, H. (2020). Characterization of phenolic profile by LC-ESI-MS/MS and enzyme inhibitory activities of two wild edible garlic: Allium nigrum L. and Allium subhirsutum L. *Journal of Food Biochemistry*, e13165.
- Haghi, G., & Hatami, A. (2010). Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(20), 10812-10816. <https://doi.org/10.1021/jf102175x>
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., & Venema, D. P. (1992). Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9), 1591-1598. <https://doi.org/10.5772/26052>
- Hirschegger, P., Jakše, J., Trontelj, P., & Bohanec, B. (2010). Origins of Allium ampeloprasum horticultural groups and a molecular phylogeny of the section Allium (Allium: Alliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 488-497. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.030>
- Isik, M., Korkmaz, M., Bursal, E., Gulcin, I., Koksai, E., Tohma, H., ... & Guclu, K. (1993). Antioxidant properties of phenolic compounds. *International Journal of Pharmacology*, 11(4), 7915-7922. <https://doi.org/10.3923/ijp.2015.366.371>
- İnanç, A., Yüksel, D., (2018). İhlamur Bitkisinin (Tilia cordata) Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Toplam Fenolik Madde Kinetiğinin Matematiksel Modellenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22 (1), 12-20. DOI: 10.29050/harranziraat.315709.
- Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., & Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of Potentilla atrosanguinea Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10129-10134. <https://doi.org/10.1021/jf802188b>
- Kasim, T., 2015. Measurement of in vitro antioxidant activity of Tunceli rural garlic (Allium tuncelianum), determination of its effect on the antioxidant enzyme activity and anticancer characteristics on rats. Inonu University.Malatya.
- Kesen, S., 2019. Using chromatographic methods in detection of olive oil adulteration. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 23(3), 335-344.
- Taban, S., Turan, M. A., Sezer, S. M., & Türkmen, N. (2013). Kastamonu Taşköprü yöresinde yetiştirilen sarımsak bitkisinin selenyum içerikleri ve bazı toprak özellikleri arasındaki ilişkiler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(1), 39-48.
- Takım, K., Kutlu, T., Karaaslan, M.G., & Yılmaz, M.A. (2018). Tunceli Dağ Sarımsağının (Allium tuncelianum) Rat Kalp Dokusu Antioksidan Enzim Düzeylerine Etkisi ve Fenolik Bileşenlerinin Karakterizasyonu. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 21(5), 632-643.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Köksal, E., Tohma, H., Kılıç, Ö., Alan, Y., Aras, A., Gülçin, İ., & Bursal, E. (2017). Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of Nepeta trachonitica: analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. *Scientia pharmaceutica*, 85(2), 24. <https://doi.org/10.3390/scipharm85020024>
- Noda, Y., Asada, C., Sasaki, C., Hashimoto, S., & Nakamura, Y. (2013). Extraction method for increasing antioxidant activity of raw garlic using steam explosion. *Biochemical engineering journal*, 73, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.01.013>
- Özhatay, N. (2002). Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. *Pure and Applied Chemistry*, 74(4), 547-555. <https://doi.org/10.1351/pac200274040547>
- Pandey, M., Debnath, M., Gupta, S., & Chikara, S. K. (2011). Phytomedicine: An ancient approach turning into future potential source of therapeutics. *Journal of Pharmacognosy and phytotherapy*, 3(1), 113-117.
- Paka, B.Π. (2003). Extract of garlic (Allium sativum) in cancer chemoprevention. *Experimental oncology*, 25, 93-97.
- Phan, A. D. T., Netzel, G., Chhim, P., Netzel, M. E., & Sultanbawa, Y. (2019). Phytochemical Characteristics and Antimicrobial Activity of Australian Grown Garlic (Allium Sativum L.) Cultivars. *Foods*, 8(9), 358.
- Ramluckan, K., Moodley, K. G., & Bux, F. (2014). An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.07.118>.
- Simin, N., Orcic, D., Cetojevic-Simin, D., Mimica-Dukic, N., Anackov, G., Beara, I., ... & Bozin, B. (2013). Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (Allium flavum L. subsp. flavum, Alliaceae). *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 139-146.
- Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., & Srijaranai, S. (2010). High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1325-1330. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.05.007>
- Weidner, S., Amarowicz, R., Karamać, M., & Dąbrowski, G. (1999). Phenolic acids in caryopses of two cultivars of wheat, rye and triticale that display different resistance to pre-harvest sprouting. *European Food Research and Technology*, 210(2), 109-113. <https://doi.org/10.1007/s002170050544>



Yıldırım, A., Atasoy, A., (2017). Change in Weight and Dimensions of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.) during Soaking. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(4), 420-430. DOI: 10.29050/harranziraat.330112.

Yünlü, S., Kır, E., (2016). Soğan (*Allium cepa*) ve Sarımsaktaki (*Allium sativum*) Bazı Fenolik Bileşiklerin HPLC Yöntemiyle Tayin Edilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 20(3), 566-

574. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.27403>.

Zhu, Z. W., Li, J., Gao, X. M., Amponsem, E., Kang, L. Y., Hu, L. M., & Chang, Y. X. (2012). Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni multiflori* by LC-MS/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 62, 162-166.