

## Soğan (*Allium cepa*) ve Sarımsaktaki (*Allium sativum*) Bazı Fenolik Bileşiklerin HPLC Yöntemiyle Tayin Edilmesi

Sibel YÜNLÜ<sup>1</sup>, Esengül KIR<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi, 32260, Isparta

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 32260, Isparta

(Alınış / Received: 26.05.2016, Kabul / Accepted: 18.07.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 23.09.2016)

### Anahtar Kelimeler

Fenolik bileşikler,  
Soğan,  
Sarımsak,  
HPLC

**Özet:** Bu çalışmada, Isparta yöresindeki soğan ve sarımsak örneklerinin fenolik madde profilleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) metodu ile belirlenmiştir. Tayini yapılan fenolik maddeler, gallik asit, protokateşuik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, ellagik asit gibi fenolik asitlerle; miyrisetin, kuersetin, luteolin, kamferol, isorhamnetin gibi flavonoidlerdir. Üç farklı yöntemle hazırlanan örnekler için en iyi ekstraksiyon yönteminin, 1,2 M HCl içeren %50 metanol ile 80 °C'de 2 saat hidroliz olduğu belirlendi. Buna göre en çok bulunan fenolik maddeler kırmızı soğanda kuersetin iken, yeşil soğanda ve beyaz soğanda p-hidroksibenzoik asit, sarımsakta ise miyrisetin olarak tespit edildi. Kırmızı soğanda, 13,6±0,06 µg/g kuersetin, yeşil soğanda 18,6±0,6 µg/g p-hidroksibenzoik asit, beyaz soğanda 10,5±0,07 µg/g p-hidroksibenzoik asit, sarımsakta ise 4,5±0,10 µg/g miyrisetin belirlendi.

## Determination of Phenolic Compounds in Onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*) by HPLC Method

### Keywords

Phenolic compounds,  
Onion,  
Garlic,  
HPLC

**Abstract:** In this study, phenolic compounds profiles of onion and garlic samples in the region of Isparta have been determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. Determined phenolic compounds are phenolic acids such as gallic acid, protocatechuic acid, p-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, ellagic acid and flavonoids such as myricetin, quercetin, luteolin, kaempferol, isorhamnetin. It has identified that best extraction method for samples prepared three different methods is 2 hours hidrolize at 80 °C with 50% methanol contained 1.2 M HCl. According to this it has been determined that the most contain high amount phenolic compounds are quercetin for red onion, p-hydroxybenzoic acid for green onion and white onion, myricetin for garlic. It has been determined that 13.6±0,06 µg/g quercetin in red onion, 18.6±0,6 µg/g p-hydroxybenzoic acid in green onion, 10.5±0,07 µg/g p-hydroxybenzoic acid in white onion and 4.5±0,10 µg/g myricetin in garlic.

### 1. Giriş

Son zamanlarda gerek tıp dünyası gerekse bilim dünyasında, üzerinde en çok çalışma yapılan konulardan biri, sağlıklı yaşam sürdürmenin ve hastalıkları önlemenin yollarıdır. İnsan sağlığı açısından büyük risk oluşturan pek çok hastalığın (başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları, şeker hastalığı gibi) ortaya çıkmasını engelleyen ve birçok bitki türünde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler insan sağlığı üzerindeki etkileri nedeniyle biyolojik aktif maddeler olarak adlandırılmakta ve

pek çok çalışmaya konu olmaktadır. Metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikalleri tutma etkilerinden dolayı bu bileşiklerin en önemli özelliklerinden biri antioksidan aktiviteleridir. Sebze ve meyvelerle alınan antioksidanların vücuda giren zararlı maddelerin etkisine karşı koruyucu bir kalkan oluşturması bunun en önemli nedenidir [1].

İnsanlarda metabolik olaylar sırasında oksijen kullanımına bağlı olarak süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil (OH<sup>-</sup>), peroksil (ROO<sup>-</sup>), alkoksil (RO<sup>-</sup>), azot oksit (NO<sup>-</sup>) kökleri ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroksinitrit

(ONOO<sup>-</sup>) ve singlet oksijen (O<sub>2</sub>) 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 olmaktadır [2]. İşte antioksidanlar bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırıp, oluşumlarını engelleyerek hücrenin zarar görmesini önlerler [3].

Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlayan vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddedir. Antioksidanlar, C vitamini, E vitamini, A vitamininin öncüsü olan beta karoten, bitki ve sebzelerin renkli maddelerini oluşturan flavonoidler, fenolik asitler ve selenyum, çinko gibi mikro elementlerdir [4].

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde en yaygın bulunan maddeler grubunu oluşturmaktadır. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmakta ve günümüzde 8000'den fazla fenol bileşiği yapısı bilinmektedir [5]. Bu bileşiklerin antioksidan, antimutajenik ve antikarsinogenik özelliklerinden dolayı insan sağlığını destekleyici bileşikler olduğu belirtilmektedir [6].

Soğansız bitkiler de yapılarındaki flavonoidlerden dolayı yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler. Sarımsak (*Allium sativum*) ve soğan (*Allium cepa*) her ikisi de Alliaceae familyasına dahil olan, *Allium* cinsinden ve hem besin maddesi hem de ilaç hammaddesi olarak kullanılan en önemli bitki grubudur. Bu bitki grubu antioksidatif aktivite gibi farklı biyoaktif özelliklere sahip çok sayıda fitokimyasal içermektedir. İçeriklerindeki bu önemli bileşikler sebebi ile soğan ve sarımsak türleri kanser, kalp hastalığı, obezite, diyabet, hipertansiyon ve katarakt gibi bazı hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bu sebze grubundaki fitokimyasallar, uçucu ve uçucu olmayan bileşenler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Uçucu bileşenler; sülfür grupları, uçucu olmayan bileşenler ise; flavonoidler ve fenollerdir. Son 20 yılda, *Allium* cinsi en çok çalışılan sebzeler arasında yer almış ve gıda endüstrisi için büyük ilgi uyandırmıştır [7].

Sarımsak ve soğanın vitaminler, sülfür içeren bileşikler, amino asitler, proteinler, lipidler ve selenyum gibi eser elementler, flavonoidler ve çeşitli antioksidanlar gibi 200'den fazla bileşeni tespit edilmiştir [8,9,10].

Kromatografi tekniklerindeki ilerlemeler sonucunda fenolik bileşikler üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Çeşitli gıdalardaki fenolik bileşiklerle ilgili fazla sayıda araştırma yapılmasına rağmen soğan ve sarımsak hakkında az sayıda çalışma mevcuttur. Özellikle soğan ve sarımsak gibi

sebzelerde bulunan fenolik maddeler iyi birer antioksidan kaynağıdır.

Sarımsak potansiyel aktiviteye sahip pek çok kimyasal bileşeni bünyesinde bulundurmaktadır; Sarımsak en az 33 adet kükürtlü bileşen (alliin, allisin, ajoen, allilpropil disülfür, diallil trisülfür, S-allil sistein, S-allil merkaptosistein, ve diğerleri), pek çok enzim (allinaz, peroksidaz, mirosinaz ve diğerleri), çok değerli en düşük mineraller (selenyum, germanyum, tellurium) ve diğer eser elementleri içerir [11, 12]. Sarımsağın yapısında diğer bir çok bitkisel gıdada bulunandan daha fazla protein, lif ve serbest amino asitler bulunur [13].

Kastamonu sarımsağı kullanılarak yapılan bir çalışmada, bu türe ait sarımsağın antioksidan aktivitesi, etken maddeleri, kimyasal bileşimi ve bunların birbirleriyle olan ilişkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Kastamonu bölgesinde yetiştirilen sarımsağın allisin ve alliin içeriği HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve Allisin seviyesinin maksimum 10,8 mg/g, minimum da 4,40 mg/g olduğu tespit edilmiştir. Kontrol örneğinde allisin seviyesinin oldukça yüksek (8,22 mg/g) olduğu belirlenmiştir. Kastamonu'da yetiştirilen sarımsağın allisin içeriğinin dünya çapında kaydedilen değerlerden daha yüksek olduğu bu çalışma ile tespit edilmiştir. Özellikle bu sarımsak çeşidinin askorbik asit içeriğinin de yüksek olması diğer olumlu özellikleri yanında önemini bir kat daha arttırmaktadır [14].

Dört çeşit soğanda (kırmızı, mor, beyaz ve yeşil) HPLC ve LC-MS/MS ile yapılan bir çalışmada gallik asit, ferulik asit, protokateşik asit, kuersetin ve kamferol gibi fenolik bileşikler tespit edilmiştir. Çalışma sonunda; ferulik asit miktarının 13,5 ile 116, gallik asit miktarının 9,3 ile 354, protokateşik asit miktarının 3,1 ile 138, kuersetin miktarının 14,5 ile 5110, kamferol miktarının ise 3,2 ile 481 µg/g arasında değiştiği gözlenmiştir [15].

Alarcón-Flores vd., (2014) yaptıkları bir çalışmada; enginar, sarımsak ve ıspanaktaki fenolik bileşikleri UHPLC ile tespit etmişlerdir. Sarımsağın enginar ve ıspanağa göre daha düşük konsantrasyonda fenolik bileşen içerdiği görülmüştür. Sarımsakta 26,5 mg/kg fenolik bileşik tespit edilirken, bu miktar enginarda 837,2 mg/kg, ıspanakta ise 64,5 mg/kg'dır. Sarımsakta yüksek oranda tespit edilen bileşenler kafeik asit ve kuersetindir [16].

Harris vd., (2015) soğanın yüksek düzeyde kuersetin içerdiğini ve soğandaki kuersetinin aglikon ve 2 glikozit (kuersetin 4'-O- glikozit ve kuersetin-3,4'-O-diglikozit) olmak üzere üç formda bulunduğunu belirtmişlerdir. Soğan örneklerini, 3 farklı zaman aralığında (5-10-15 dk) kızartma yaparak, fırında ve buharda pişirmişlerdir. Buna göre kızartma yaparak (<10 dk) pişirmenin en ideal yöntem olduğunu tespit etmişlerdir. Isıl işlemlerde 10 dakikadan sonra tüm örneklerde kuersetin içeriğinin azaldığını

görmüşlerdir. En düşük kuersetin miktarını buharda pişirme (15 dk) işleminde elde etmişlerdir [17].

Juániz vd., (2016) soğan, yeşil biber ve yaban enginarını için zeytinyağında kızartma, ayçiçek yağında kızartma ve ızgara yapma gibi ısı işlemler uygulayarak fenolik bileşiklerini ve antioksidan kapasitesini araştırmışlardır. Soğanda toplam 7 tane flavonoid tespit edilmiştir. Bunlar kuersetin ve isorhamnetin türevleridir. Tüm ısı işlemler, sebzelerdeki fenolik bileşiklerin konsantrasyonunu artırma eğilimindedir. Izgara yapılmış sebzelerdeki fenolik bileşik miktarı, uygulanan yüksek sıcaklık nedeniyle kızartma yapılmış sebzelere göre daha fazladır. Örneğin toplam flavonoid miktarı çiğ soğanda 1,36 mg/g, iken, zeytinyağında kızarmış soğanda bu miktar 1,83 mg/g, ızgara yapılmış soğanda ise 2,14 mg/g olarak tespit edilmiştir [18].

Örnek hazırlama yöntemlerinden biri olan katı faz ekstraksiyonunun (KFE'nun) kullanımı ve popülerliği hızla artmaktadır. KFE'nin otomasyonu kolay, daha hızlı ve genellikle sıvı-sıvı ekstraksiyonundan daha verimlidir (yüzde geri kazanım 100'e daha yakındır). KFE'de kullanılan katı miktarı ( $\leq 400$  mg) ve sıvı çözücü miktarı sıvı-sıvı ekstraksiyonundan çok daha azdır. Bu yüzden ön deriştirme işlemlerinde yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

Bu çalışmada, insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan, içerdiği flavonoidler sayesinde antioksidan özellik taşıyan, yüzyıllardan beri bütün dünyada hem sofraların vazgeçilmez bir yiyeceği olarak, hem de çeşitli hastalıklar için şifa amacıyla kullanılan soğan ve sarımsağın fenolik madde içerikleri HPLC ve Katı Faz Ekstraksiyon teknikleri kullanılarak incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

Araştırma materyali olarak kullanılan soğan ve sarımsak örneklerinde herhangi bir cins şart koşulmamıştır. Isparta yöresindeki çeşitli pazar ve marketlerden temin edilen 3 çeşit soğan (beyaz soğan, kırmızı soğan, yeşil soğan) ve sarımsak materyal olarak kullanılmıştır.

### 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup, analizde tayin edilecek p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kuersetin, luteolin, kamferol, isorhamnetin standartları Sigma-Aldrich firmasından; gallik asit, protokateşuik asit, ferulik asit, ellagik asit standartları Fluka firmasından; miyrisetin standardı Acros firmasından temin edilmiştir. HPLC analizleri için kullanılan asetonitril (ACN) ve metanol kromatografik saflıkta olup Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

### 2.3. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan HPLC cihazı Shimadzu (Kyoto, Japonya) markadır ve yine Shimadzu marka dedektör (SPD-M10A vp Photo Diode Array dedektör), kolon fırını (CTO-10A vp), pompa (LC-10AD vp), gaz giderici (DGU-14A) ve otomatik enjeksiyon (SIL-10AD vp) sistemine sahiptir.

### 2.4. Metot

Fenolik maddelerin belirlenmesinde HPLC yöntemi (High Performance Liquid Chromatography, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kullanılmıştır. Analizler Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizinde Gomes vd., (1999)'nin metodu modifiye edilerek kullanılmıştır [19]. Fenolik bileşiklerin tespiti 278 nm dalga boyunda, 0,8 mL/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Bir ters faz kolonu olan Agilent Eclipse XDB C-18 (250x4.6 mm) 5  $\mu$ m kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C dir. Ayırım ikili çözücü sistemiyle gradient program uygulanarak gerçekleştirilmiştir. A çözeltisi %3 asetik asit, B çözeltisi metanol' dür. Gradient program Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Gradient Program

Süre (dk)	A (%)	B (%)
0	93	7
20	72	28
28	75	25
35	70	30
50	70	30
60	67	33
62	58	42
70	50	50
73	30	70
75	20	80
80	0	100
81	93	7

#### 2.4.1. Standartların hazırlanması

Her bir standart için 1000 ppm lik stok çözelti hazırlanmış ve bütün standartlar metanolde çözülmüştür. Ana stoklardan çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan standart fenolik bileşiklerin tek tek alıkonma zamanları belirlenmiştir. Alıkonma zamanları tespit edildikten sonra 12 adet fenolik bileşiği içeren bir karışım hazırlanmıştır. Analiz süresi boyunca bütün standartlar -18°C'de saklanmıştır. Kalibrasyon grafiği, fenolik madde miktarına (derişim) karşı pik alanı olarak çizilmiştir.

## 2.4.2. Örneklerin hazırlanması

Üç farklı numune ekstraksiyonu yapılmıştır.

**Yöntem I:** Guo vd., (2007) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek örnek hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir [20].

Örnek hazırlama basamağında MCX (Waters OASIS (6 cc)) ve HLB (Waters OASIS (6 cc)) gibi katı faz ekstraksiyon kartuşları kullanılmıştır. Soğan ve sarımsak örnekleri rondoda iyice parçalandıktan sonra her birinden 5 g tartılıp üzerlerine 15 mL metanol eklenip ultrasonik banyoda ağzı kapalı olarak 20 dakika karıştırılmıştır. Karışım Whatman No:4 filtre kağıdından süzülüp, süzüntü 3-4 mL kalıncaya kadar evapore edilmiştir. Bu çözeltinin 0,5 mL'si HPLC cihazına direkt enjeksiyonu yapılmak üzere ayrılmıştır.

Evaporasyon işleminden sonra her bir numuneye 5 mL % 25 lik HCl eklenip su banyosunda 80 °C de 1 saat hidroliz edilmiştir. Hidrolizden sonra örnekler biraz soğutulup, 100 mL % 0,1 lik HCl ilave edilip MCX ve HLB kartuştan geçirilmiştir.

MCX kartuştan geçirilmeden önce kartuş 2 mL metanol ve 2 mL % 0,1 lik HCl ile şartlanmıştır. Daha sonra hazırlanan soğan ve sarımsak örnekleri kartuştan geçirilmiştir. Kartuş 2 mL saf su ile yıkanmıştır. Kartuşlarda tutunan fenolik maddeleri elüe edici çözelti olarak 7 mL ACN/Su/TFA (Trifloroasetik asit)(75:20:5) kullanılmıştır. Elüsyon çözeltileri analiz edilinceye kadar -18 °C'de saklanmıştır.

HLB kartuştan geçirilmeden önce kartuş 2 mL metanol ve 2 mL saf su ile şartlanmıştır. Daha sonra hazırlanan soğan, sarımsak örnekleri kartuştan geçirilmiştir. Kartuş 2 mL saf su ile yıkanmıştır. Kartuşlarda tutunan fenolik maddeleri elüe edici çözelti olarak 5 mL ACN/Su/TFA (75:20:5) kullanılmıştır. Elüsyon çözeltileri analiz edilinceye kadar -18 °C'de saklanmıştır.

**Yöntem II:** Soğan ve sarımsağın fenolik bileşik profilini belirlemek amacıyla Escarpe vd., (2002) tarafından uygulanan yöntem baz alınarak örnek hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir [21].

Soğan ve sarımsak örnekleri rondoda iyice parçalandıktan sonra her birinden 10 g tartılmıştır. Üzerine 0,1 gram BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) ve 15 mL ekstraksiyon çözeltisi ilave edilip 45 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Üst faz bir kaba alınıp alt faza tekrar 15 mL ekstraksiyon çözeltisi ilave edilip 45 dakika daha ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Üst fazlar birleştirilip Whatman No:4 filtre kağıdından süzümüştür. Süzüntü 0,45 µm lik filtreden (Minisart

NY 25) geçirilip 20 µL' si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. (Ekstraksiyon çözeltisi: %1 (v/v) HCl içeren %80 metanol)

**Yöntem III:** Bu yöntemde Hertog vd., (1992)' ne ait metot kullanılmıştır [22]. Soğan ve sarımsak örnekleri rondoda iyice parçalandıktan sonra her birinden 10 g tartılmıştır. 40 mL % 62,5 metanol ve 10 mL 6 M HCl eklenmiştir (%50 metanol içinde 1,2 M HCl). Ağzı kapalı olarak su banyosunda 80 derecede 2 saat bekletilmiştir. Biraz bekleyip örnekler soğuduktan sonra Whatman No:4 filtre kağıdından süzülüp 0.45 µm lik filtreden geçirilmiştir. Süzüntünün 20 µL'si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Aynı işlem 35 °C de 16 saat bekletilerek de yapılmıştır [23].

## 3. Bulgular

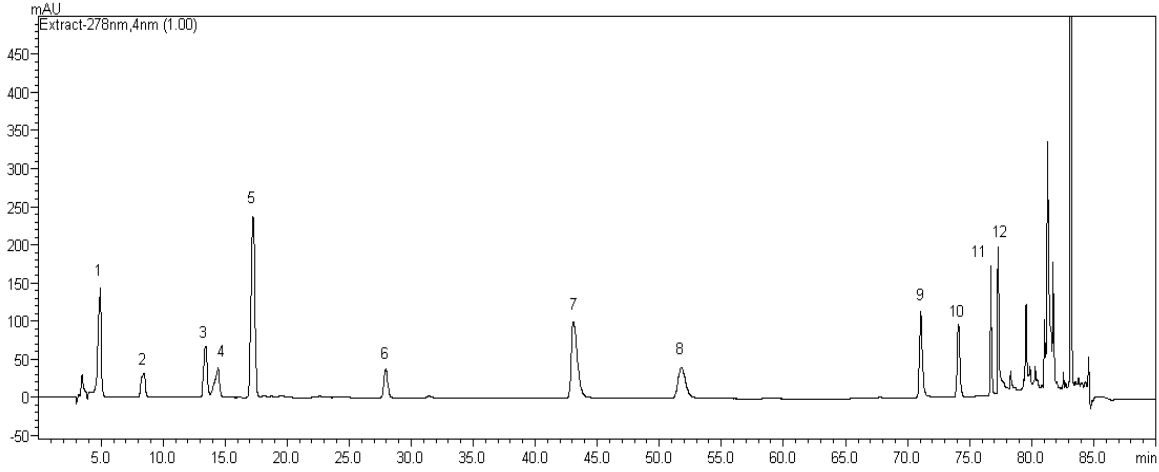
### 3.1. Fenolik bileşik standartlarının HPLC ile analizleri

Çalışmada tayini yapılan fenolik maddeler, gallik asit, protokateşik asit, p-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, ferulik asit, ellagik asit, miyrisetin, kuersetin, luteolin, kamferol, isorhamnetin' dir. 7 adet fenolik asit ve 5 adet flavonoid standardı kullanılmıştır. Bu 12 adet fenolik bileşiğin kolonda ayırımı sağlamak için çeşitli denemeler yapılmış ve uygun gradient program belirlenmiştir. Fenolik maddeler Şekil 1'de görüldüğü gibi net olarak ayrılmıştır. Tablo 2'de fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları, Tablo 3'de ise her bir bileşiğin kalibrasyon fonksiyonu değerleri verilmiştir.

Fenolik bileşiklerin miktarını hesaplamak için her bir bileşiğe ait kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Şekil 2'de örnek olarak kuersetin standartına ait kalibrasyon grafiği verilmiştir.

**Tablo 2.** Fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları (Retention time)

Sıra no	Fenolik bileşik	Alıkonma zamanı (Retention time)
1	gallik asit	4,931
2	protokateşik asit	8,458
3	p-hidroksibenzoik asit	13,423
4	klorojenik asit	14,425
5	kafeik asit	17,257
6	ferulik asit	27,953
7	ellagik asit	43,079
8	miyrisetin	51,775
9	kuersetin	71,066
10	luteolin	74,103
11	kamferol	76,711
12	isorhamnetin	77,302



**Şekil 1.** Fenolik standartlarının HPLC kromatogramı

1: Gallik asit, 2: protokateşik asit, 3: p-hidroksibenzoik asit, 4: klorojenik asit, 5: kafeik asit, 6: ferulik asit, 7: ellagik asit, 8: miyrisetin, 9: kuersetin, 10: luteolin, 11: kamferol, 12: isorhamnetin

**Tablo 3.** Fenolik bileşiklerin kalibrasyon fonksiyonu değerleri

Fenolik standartlar	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Kesim	Eğim	Korelasyon R <sup>2</sup> değeri	N	Lineer aralık (µg/mL)
Gallik asit	0,01	0,03	-1155,52	192369,9	0,99964	4	0,04-0,375
Protokateşik asit	0,02	0,06	1658,667	72170,98	0,99988	5	0,08-1,3
p-hidroksibenzoik asit	0,04	0,13	-1194,29	72747,46	0,99982	5	0,14-2,25
Klorojenik asit	0,05	0,15	-3359,71	55709,63	0,9998	5	0,15-2,5
Kafeik asit	0,01	0,03	-1855,29	226559,1	0,99952	5	0,02-0,3
Ferulik asit	0,01	0,03	-363,75	101028,5	0,99996	5	0,06-1
Ellagik asit	0,02	0,06	-3872,33	174660,7	0,99984	5	0,07-1,125
Miyrisetin	0,08	0,23	-1368,54	28715,94	0,99988	5	0,3-5
Kuersetin	0,01	0,02	-556,708	165368,2	0,99998	5	0,04-0,6
Luteolin	0,03	0,09	-2665,58	82282,64	0,99982	5	0,09-1,5
Kamferol	0,03	0,10	-2094,08	82357,01	0,99986	5	0,125-2
İsorhamnetin	0,02	0,06	-753,333	67888,17	0,99988	5	0,078-1,25

### 3.2. Soğan ve sarımsak örneklerinin HPLC ile analizleri

12 adet fenolik bileşik için verilen şartlarda uygun ayırım sağlandıktan sonra soğan ve sarımsak örneklerinin fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Bu aşamada 3 farklı örnek hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Yöntem I'de HCl içeren metanolle 80°C'de 1 saat ekstraksiyondan sonra elde edilen örnekler MCX ve HLB kartuşlardan geçirilmiştir. Yöntem II'de örnekler HCl içeren metanolle muamele edilmiştir. Burada antioksidan olarak BHT kullanılmıştır. Yöntem III'de ise örnekler 35°C'de ve 80°C'de asidik hidroliz işlemi uygulanmıştır.

#### 3.2.1. I. Yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar

Kartuştan geçirilmeden önce metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerden elde edilen veriler Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4'de görüldüğü gibi miyrisetin kırmızı soğanda 32,8, yeşil soğanda 7,6 ve beyaz soğanda 57,3 µg/g değerle en yüksek tespit edilen fenolik bileşiktir. Sarımsak da ise klorojenik asit 1,6 µg/g olarak tayin edilmiştir.

Metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerin MCX kartuştan geçirilmesi sonucu elde edilen veriler Tablo 5'de verilmiştir.

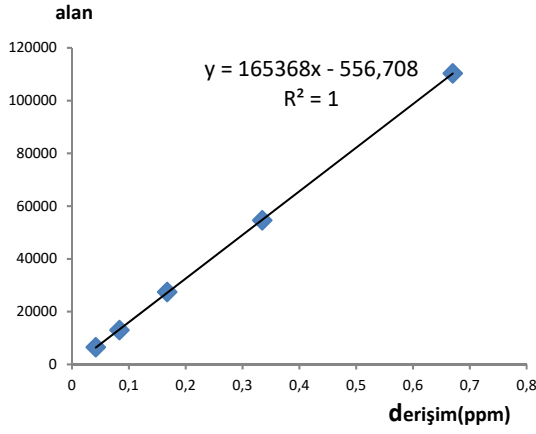
MCX kartuştan geçtikten sonra soğan çeşitlerinde kamferol miktarı, sarımsakta ise ellagik asit miktarı artmıştır.

Metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerin HLB kartuştan geçirilmesi sonucu elde edilen veriler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6'da görüldüğü gibi örnekler HLB kartuştan geçirildikten sonra hiçbir fenolik bileşik tespit edilememiştir. Birçok çalışmada MCX ve HLB kartuşlar üzüm, şarap, çilek gibi örneklerde fenolik bileşiklerin tespiti için kullanılmıştır. Bu çalışmada da soğan ve sarımsak örnekleri için denenmiştir ama soğan ve sarımsaktaki fenolik bileşikler tespit etmek amacıyla ekstraksiyon aşamasında kullanılan HLB kartuştan olumlu sonuç alınamamıştır.

#### 3.2.2. II. Yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar

II. yöntemde örnekler %1 (v/v) HCl içeren %80 metanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir ve Tablo 7'de II. yöntemden elde edilen sonuçlar verilmiştir.



Şekil 2. Kuersetin standartına ait kalibrasyon grafiği

Tablo 4. Kartuştan geçirilmeden önce metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerden elde edilen veriler

	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	*
Protokateşik a.	0,6±0,0	*	0,2±0,0	*
p-hidbenzoik a.	0,3±0,0	*	0,2±0,0	*
Klorojenik asit	0,9±0,0	*	0,5±0,0	1,6±0,0
Kafeik asit	*	*	0,1±0,0	*
Ferulik asit	*	5,1±0,1	*	0,4±0,0
Ellagik asit	*	0,1±0,0	0,1±0,0	*
Miyrisetin	32,8±2,50	7,6±0,6	57,3±2,50	*
Kuersetin	0,4±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	0,04±0,00
Luteolin	*	*	*	*
Kamferol	0,7±0,0	0,4±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0
İsorhamnetin	*	*	*	*

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür

Tablo 5. Metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerin MCX kartuştan geçirilmesi sonucu elde edilen veriler

	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	*
Protokateşik a.	*	*	*	*
p-hidbenzoik a.	*	*	*	*
Klorojenik asit	*	*	*	*
Kafeik asit	*	0,4±0,1	0,4±0,1	*
Ferulik asit	*	2,8±0,0	*	*
Ellagik asit	*	*	*	0,3±0,0
Miyrisetin	1,5±0,0	1,2±0,0	0,6±0,0	*
Kuersetin	1,1±0,0	0,1±0,0	0,3±0,0	*
Luteolin	*	*	*	*
Kamferol	5,2±0,3	1,0±0,0	1,0±0,0	*
İsorhamnetin	*	*	*	*

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür

Tablo 6. Metanol ekstraksiyonu ile hazırlanan örneklerin HLB kartuştan geçirilmesi sonucu elde edilen veriler

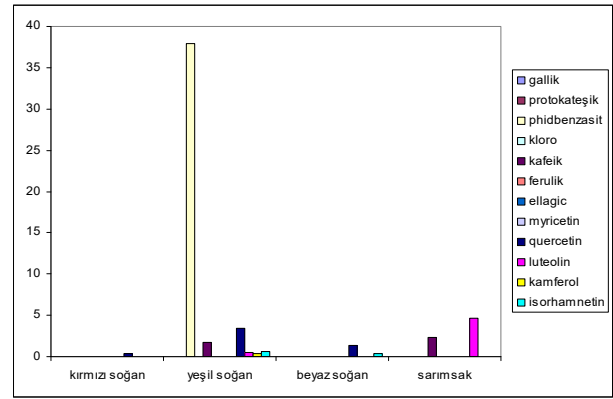
	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	*
Protokateşik a.	*	*	*	*
p-hidbenzoik a.	*	*	*	*
Klorojenik asit	*	*	*	*
Kafeik asit	*	*	*	*
Ferulik asit	*	*	*	*
Ellagik asit	*	*	*	*
Miyrisetin	*	*	*	*
Kuersetin	*	*	*	*
Luteolin	*	*	*	*
Kamferol	*	*	*	*
İsorhamnetin	*	*	*	*

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür

Tablo 7. II. yöntem ile hazırlanan örneklerden elde edilen veriler

	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	*
Protokateşik a.	*	*	*	*
p-hidbenzoik a.	*	37,9±0,47	*	*
Klorojenik a.	*	*	*	*
Kafeik asit	*	1,7±0,1	*	2,3±0,1
Ferulik asit	*	*	*	*
Ellagik asit	*	*	*	*
Miyrisetin	*	*	*	*
Kuersetin	0,4±0,0	3,4±0,0	1,3±0,0	*
Luteolin	*	0,5±0,0	*	4,7±0,1
Kamferol	*	0,4±0,0	*	*
İsorhamnetin	*	0,6±0,0	0,4±0,0	*

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür



Şekil 3. II. yöntem ile hazırlanan örneklerin fenolik madde dağılımı

Tablo 7'de görüldüğü gibi en yüksek tespit edilen fenolik maddeler, kırmızı soğanda 0,4 µg/g kuersetin, yeşil soğanda 37,9 µg/g p-hidroksibenzoik asit, beyaz soğanda 1,3 µg/g kuersetin, sarımsakta ise 4,7 µg/g luteolin'dir.

Deneyler de kullanılan II.yöntem daha öncede belirtildiği gibi Escarpe vd., (2002)'den alınmıştır [21]. Bu yöntemle yapılan çalışmada kurutulmuş ve işlenmiş fasülye ile mercimeğin fenolik bileşikleri HPLC kullanılarak tespit edilmiştir. Mercimekte en fazla bulunan fenolik bileşiğin kamferol, fasülyede ise kuersetin olduğu görülmüştür. Bu yöntem ilk defa bu çalışmada soğan ve sarımsak örnekleri için uygulanmış ve toplam fenolik madde içeriği bakımından verimli sonuçlar elde edilmiştir.

### 3.2.3. III. Yöntem kullanılarak elde edilen sonuçlar

Bu yöntemde örnekler 1,2 M HCl içeren %50 metanol ile 80°C'de 2 saat ve 35°C'de 16 saat hidroliz edilmiştir ve Tablo 8'de 80°C'de 2 saat hidroliz ile elde edilen sonuçlar verilmiştir.

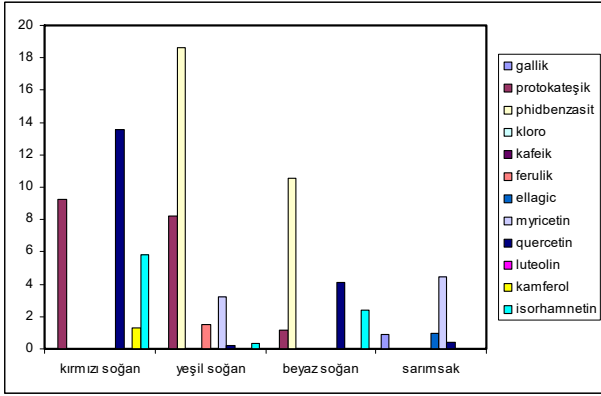
Örneklerde en çok bulunan fenolik bileşikler, kırmızı soğanda kuersetin, yeşil soğanda ve beyaz soğanda p-hidroksibenzoik asit, sarımsakta ise miyrisetin'dir. Bunlar Şekil 4'de de net olarak görülmektedir. Gallik asit ve ellagik asite sadece sarımsakta; kamferole

sadece kırmızı soğanda; ferulik asite de sadece yeşil soğanda rastlanmıştır. Klorojenik asit, kafeik asit ve luteoline ise hiçbir örnekte rastlanmamıştır.

**Tablo 8.** 1,2 M HCl içeren %50 metanol ile 80°C'de 2 saat hidrolizden sonra elde edilen veriler

	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	0,9±0,0
Protokateşik	9,3±0,2	8,2±0,2	1,2±0,0	*
p-hidbenzoik	*	18,6±0,63	10,5±0,07	*
Klorojenik	*	*	*	*
Kafeik asit	*	*	*	*
Ferulik asit	*	1,5±0,0	*	*
Ellagik asit	*	*	*	1,0±0,0
Miyrisetin	*	3,2±0,1	*	4,5±0,1
Kuersetin	13,6±0,06	0,2±0,0	4,1±0,1	0,4±0,0
Luteolin	*	*	*	*
Kamferol	1,3±0,1	*	*	*
İsorhamnetin	5,8±0,0	0,4±0,0	2,4±0,0	*

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür



**Şekil 4.** 80°C'de 2 saat hidroliz sonucu elde edilen örneklerin fenolik madde dağılımı

III. yöntem, 35°C'de 16 saat hidroliz edilerek de denenmiştir, Aşağıdaki Tablo 9'da 35°C'de hazırlanan örneklerin sonuçları verilmiştir.

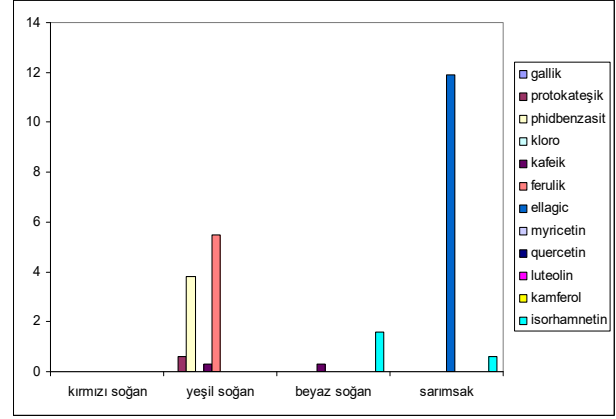
35°C'de 16 saat hidrolizden sonra Şekil 5'de de görüldüğü gibi yeşil soğanda ferulik asit, beyaz soğanda isorhamnetin, sarımsakta ise ellagik asit en çok bulunan fenolik bileşiklerdir. Kırmızı soğanda ise fenolik bileşik tespit edilememiştir.

**Tablo 9.** 1,2 M HCl içeren %50 metanol ile 35°C'de 16 saat hidrolizden sonra elde edilen veriler

	kırmızı <sup>a</sup> soğan (µg/g)	yeşil <sup>a</sup> soğan (µg/g)	beyaz <sup>a</sup> soğan (µg/g)	sarımsak <sup>a</sup> (µg/g)
Gallik asit	*	*	*	*
Protokateşik	*	0,6±0,0	*	*
p-hidbenzoik	*	3,8±0,1	*	*
Klorojenik	*	*	*	*
Kafeik asit	*	0,3±0,0	0,3±0,0	*
Ferulik asit	*	5,5±0,2	*	*
Ellagik asit	*	*	*	11,9±0,86
Miyrisetin	*	*	*	*
Kuersetin	*	*	*	*
Luteolin	*	*	*	*
Kamferol	*	*	*	*
İsorhamnetin	*	*	1,6±0,02	0,6±0,0

\*: tespit edilemedi; a: tekrar sayısı 3'dür

Örneklerin 80°C'de 2 saat hidrolizi ile 35°C'de 16 saat hidrolizini karşılaştıracak olursak; soğan türlerinde en çok tespit edilen kuersetin, miyrisetin, kamferol gibi fenolik bileşiklerin 35°C'de 16 saat hidrolizden sonra tespit edilemediği görülmüştür. Nuutila vd., (2002)'de çalışmasında her iki yöntemi denemiş ve 1,2 M HCl ile 80°C'de 2 saat hidrolizden en iyi sonucu elde etmiştir [24]. Elde edilen sonuçlar bu çalışma ile uyum içindedir.



**Şekil 5.** 35°C'de 16 saat hidroliz sonucu elde edilen örneklerin fenolik madde dağılımı

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Genel olarak deneylerde kullanılan 3 yöntemi birbiri içerisinde karşılaştıracak olursak;

- I. yöntemde MCX kartuştan geçtikten sonra; bulunan toplam fenolik madde miktarı 15,9 µg/g'dır. HLB kartuştan geçtikten sonra ise fenolik madde tespit edilememiştir.
- II. yöntemde bulunan toplam fenolik madde miktarı 53,6 µg/g'dır.
- III. yöntemde 80°C'de 2 saat hidrolizden sonra bulunan toplam fenolik madde miktarı 87,1 µg/g iken, 35°C'de 16 saat hidrolizden sonra bulunan toplam fenolik madde miktarı 24,6 µg/g'dır.

Buna göre en iyi sonuçlar, örneklerin 80°C'de 2 saat hidrolizi ile elde edilmiştir. Bunu sırasıyla II. yöntem ve 35°C'de 16 saat hidroliz izlemektedir.

Örneklerin içerdikleri fenolik maddeler şu şekilde sıralanabilir:

- Kırmızı soğanda; kuersetin > protokateşik asit > isorhamnetin > kamferol
- Yeşil soğanda; p-hidroksibenzoik asit > protokateşik asit > miyrisetin > ferulik asit > isorhamnetin > kuersetin
- Beyaz soğanda; p-hidroksibenzoik asit > kuersetin > isorhamnetin > protokateşik asit
- Sarımsakta; miyrisetin > ellagik asit > gallik asit > kuersetin

Gallik asit ve ellagik asit sadece sarımsakta, ferulik asit sadece yeşil soğanda, kamferol ise sadece kırmızı soğanda tespit edilmiştir. Soğan ve sarımsağın başta kuersetin olmak üzere miyrisetin, p-hidroksibenzoik asit, protokatesik asit, isorhamnetin gibi fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan III. ekstraksiyon yönteminin soğan ve sarımsaktaki fenolik maddelerin belirlenmesinde en etkili yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 1917-YL-09 No'lu projeye desteklenmiştir.

### Kaynakça

- [1] Karaman, Ş. 2008. Türkiyede yetiştirilen bazı elma çeşitlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin ve antioksidan özellik gösteren başlıca bileşenlerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 139s, İstanbul.
- [2] Uylaşer, V., İnce, K., 2008. Şaraptaki antioksidanlar ve fenolik bileşikler. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- [3] Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. and Heinonen, M., 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 3954-3962.
- [4] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Papanga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds, Trends in Plant Science, 2, 152-159.
- [5] Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56, 317-333.
- [6] Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Putte, B., 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41, 1242-1246.
- [7] Benkeblia N., 2005. Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. An International Journal, 48, 753-759.
- [8] Rabinowitch, H.D., Brewster, J.L. 1990. Onions and Allied Crops. I. Botany, Physiology, and Genetics. CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA, 273s.
- [9] Hollman, P.C., Van Trijp, J.M., Mengelers, M.J., de Vries, J.H., Katan, M.B., 1997. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. Cancer Lett. 114: 139-40.
- [10] Ide, N., Matsuura, H., Itakura, Y., 1996. Scavenging Effect of Aged Garlic Extract and its Constituents on Active Oxygen Species. Phytotherapy Research, Vol. 10,340-341.
- [11] Block, E., 1985. The chemistry of garlic and onions. Scientific American, 252, 114-119.
- [12] Blania, G. and Spangenberg, B., 1991. Formation of allicin from dried garlic: a simple HPTLC method for simultaneous determination of allicin and ajoene in dried garlic and garlic preparations. Planta Med., 57, 371-375.
- [13] Devrim, E., 2003. Domates ve sarımsağın beslenme ve insan sağlığındaki yeri. www.medicine.ankara.edu.tr.
- [14] Zor, T.T., 2006. Kastamonu sarımsağının (*Allium sativum*) allicin ve alliin içeriğinin HPLC ile belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 66s, Ankara.
- [15] Prakash D., Singh B.N., Upadhyay G., 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). Food Chemistry, 102, 1389-1393.
- [16] Alarcón-Flores M.I., Romero-González R., Martínez Vidal J.L., Garrido Frenich A., 2014. Determination of Phenolic Compounds in Artichoke, Garlic and Spinach by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. Food Anal. Methods, 7, 2095-2106.
- [17] Harris S., Brunton N., Tiwari U., Cummins E., 2015. Human exposure modelling of quercetin in onions (*Allium cepa* L.) following thermal processing. Food Chemistry, 187, 135-139.
- [18] Juárez I., Ludwig I.A., Huarte E., Pereira-Caro G., Moreno-Rojas J.M., Cid C., De Peña M.P., 2016. Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. Food Chemistry, 197, 466-473.
- [19] Gomes, T., Caponio, F., Alloggio, V., 1999. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. Food Chemistry, 64, 203-209.
- [20] Guo, D.A., Liu, A.H., Guo H., Ye, M., Lin, Y.H., Sun, J.H., Xu, M., 2007. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1161, 170-182.
- [21] Escarpa, A., Morales, M.D., Gonzalez, M.C., 2002. Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds



using real samples by high-performance liquid chromatography–diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*, 460, 61–72.

- [22] Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., 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, 1591-1598.
- [23] Hakkinen, S.H., Karenlampi, S.O., Heinonen, M., Mykkanen, H.M., Törrönen, A.R., 1998. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 543-551.
- [24] Nuutila, A.M., Kammiovirta, K., Oksman-Caldentey, K.M., 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519–525.