



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE'DE BULUNAN KARACİĞER VE SİNDİRİM
SİSTEMİ HASTALIKLARINDA KULLANILAN
CYNARA SCOLYMUS L. (ENGİNAR) PREPARATLARININ
STANDARDİZASYONUNUN VE FİTOEŞDEĞERLİĞİNİN
KONTROLÜ**

Serkan ÖZBİLGİN

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN**

2010- ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE’DE BULUNAN KARACİĞER VE SİNDİRİM
SİSTEMİ HASTALIKLARINDA KULLANILAN
CYNARA SCOLYMUS L. (ENGİNAR)
PREPARATLARININ STANDARDİZASYONUNUN VE
FİTOEŞDEĞERLİĞİNİN KONTROLÜ

Serkan ÖZBİLGİN

FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN

2010- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakognozi Tezli Yüksek Lisans **Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/01/2010

Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi
Farmakognozi Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Maksut COŞKUN
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı

Prof. Dr. Murat KARTAL
Ankara Üniversitesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

Doç. Dr. M. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

Doç. Dr. Betül SEVER YILMAZ
Ankara Üniversitesi
Farmakognozi Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Genel Bilgiler	4
1.2.1. Tarihçe	4
1.2.2. Botanik Özellikler	6
1.2.2.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	6
1.2.2.2. Asteraceae (Compositae) Familyasının Özellikleri	6
1.2.2.3. <i>Cynara</i> Cinsinin Botanik Özellikleri	7
1.2.2.4. <i>Cynara scolymus</i> 'un Botanik Özellikleri	7
1.2.3. <i>Cynara</i> Türlerinin Dünyadaki Yayılışı	8
1.2.4. <i>Cynara</i> Türlerinin Türkiye'deki Yayılışı	9
1.3. <i>Cynara</i> Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	10
1.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar	10
1.3.1.1. Fenolik Bileşikler	11
1.3.1.1.1. Kafeik Asit Türevleri	12
1.3.1.1.2. Flavonoidler	14
1.3.1.2. Terpenik Bileşikler	16
1.3.1.2.1. Seskiterpen Laktonlar	17
1.3.2. Biyolojik Etki Çalışmaları	21
1.3.2.1. Kolesterol Düşürücü Etki	21
1.3.2.2. Koleretik Etki	25

1.3.2.3.	Hepatoprotektif Etki	25
1.3.2.4.	Antioksidan Etki	30
1.3.2.5.	Antimikrobiyal Etki	33
1.3.2.6.	Antispazmodik Etki	34
1.3.2.7.	Antihipertansif Etki	34
1.3.2.8.	Sindirim Sistemi Üzerine Etki	35
1.3.2.9.	Diğer Etkiler	37
1.3.3.	Farmakokinetik Çalışmalar	38
1.3.4.	Toksisite Çalışmaları	40
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	41
2.1.	Gereç	41
2.1.1.	Bitkisel Materyal	41
2.1.2.	Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler	43
2.2.	Yöntem	47
2.2.1.	Fitokimyasal Çalışmalar	47
2.2.1.1.	Ekstraksiyon Çalışmaları	47
2.2.1.1.1.	Perkolasyon	47
2.2.1.1.2.	Hareketli Maserasyon	47
2.2.1.1.3.	Soxhlet Ekstraksiyonu	48
2.2.1.2.	Metanol-Su Ekstresinin Hazırlanması	48
2.2.1.3.	Metanol-Su Ekstresinin Fraksiyonlandırılması	49
2.2.2.	Kromatografik Çalışmalar	51
2.2.2.1.	İnce Tabaka Kromatografisi	51
2.2.2.2.	Kolon Kromatografisi	53
2.2.2.2.1.	Kolonun Hazırlanması	53
2.2.2.2.2.	Ekstrenin Kolona Uygulanması	53
2.2.2.2.3.	<i>n</i> -Butanollü Ekstrenin Fraksiyonlandırılması	54
2.2.2.3.	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	55
2.2.3.	İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini	56
2.2.3.1.	NMR Spektroskopisi	56
2.2.3.2.	Kütle Spektroskopisi	57

2.2.3.3.	UV Spektroskopisi	57
2.2.4.	HPLC ile Kalite Kontrol Çalışmaları	57
2.2.4.1.	Analiz Yöntemi	58
2.2.4.2.	Standart Çözeltilerin Hazırlanması	58
2.2.4.3.	Numune Çözeltilerin Hazırlanması	59
2.2.4.4.	Bitkisel Ürün Çözeltilerinin Hazırlanması	59
2.2.4.5.	HPLC Şartları	60
2.2.5.	Spray Dryer Çalışmaları	60
3.	BULGULAR	62
3.1.	Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular	62
3.1.1.	Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular	62
3.1.2.	Metanol-Su Ekstresine Ait Bulgular	62
3.1.3.	Metanol-Su Ekstresinin Fraksiyonlandırılmasına Ait Bulgular	63
3.2.	Kromatografik Bulgular	64
3.2.1.	İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları	64
3.2.2.	Kolon Kromatografisi Bulguları	66
3.2.3.	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları	67
3.3.	İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini Bulguları	70
3.3.1.	CS-1 Bileşiğinin Yapı Tayini	70
3.3.2.	CS-2 Bileşiğinin Yapı Tayini	76
3.4.	HPLC ile Kalite Kontrol Çalışmalarına Ait Bulgular	82
3.4.1.	Standart Çözeltiler ile Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi	82
3.4.2.	Bitkisel Materyalde, Bitkisel Ürünlerde ve Spray Dryer ile Kurutulan Ekstrede Klorojenik Asit (CS-2), Sinarozit (CS-1), Luteolin, Naringenin ve Apigenin Miktar Tayinine Ait Hesaplamalar	96
3.5.	Spray Dryer Çalışmalarına Ait Bulgular	98

4.	TARTIŞMA	99
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	104
	ÖZET	106
	SUMMARY	107
	KAYNAKLAR	108
	ÖZGEÇMİŞ	115

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışması ile *Cynara scolymus* L. (enginar) içeren, sindirim şikayetleri ile karaciğer ve safra rahatsızlıklarında kullanılan bitkisel preparatların fitoeşdeğerlikleri araştırılmıştır. Araştırmalar; bitkiden etkili bileşiklerin izole edilmesi, NMR spektroskopisi ile yapı tayini ve HPLC ile miktar tayini çalışmalarını içermektedir.

Tez çalışmamı yöneten, bilgi ve tecrübesiyle her zaman bana destek olan, hüznümü ve sevincimi paylaşan danışmanım Sayın Prof. Dr. H. Gülçin SALTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımızda kullandığımız bitkisel materyali temin eden Sayın Prof. Dr. Murat KARTAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım esnasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü yardımı sağlayan Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda kullandığım bitkisel materyalin kültürünü gerçekleştiren Konya Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yüksel KAN ve ekibine teşekkür ederim.

Merkez Laboratuvarı II sorumlularına ve yapı tayini çalışmalarım süresince yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Hakan GÖKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımda bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, tecrübesini ve ilgisini benimle sonuna kadar paylaşan ablam Dr. Ecz. Özlem BAHADIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle yanımda olan ağabeylerim Uzm. Ecz. Alper GÖKBULUT ile Uzm. Ecz. Mahmut ASKER'e ve ablam Dr. Ecz. Sinem ASLAN ERDEM'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının başından sonuna kadar her anında yanımda olan, sabrı ve ilgisiyle bana güç veren Uzm. Ecz. Nalan Deniz ÖZTÜRK'e minnettarım.

Çalışmam süresince destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Ecz. Ali R. GÜLPINAR'a, Uzm. Ecz. Ü. Gökçen İÇÖZ'e ve Uzm. Ecz. Burçin ERGENE'ye teşekkür ederim.

Çalışmam süresince destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Ecz. Ali R. GÜLPINAR'a, Uzm. Ecz. Ü. Gökçen İÇÖZ'e ve Uzm. Ecz. Burçin ERGENE'ye teşekkür ederim.

Sevgi ve güvenleriyle bana destek olan, sıkıntı ve sevincimi benimle paylaşan babam Tahir ÖZBİLGİN'e, annem HÖRÜ ÖZBİLGİN'e ve kardeşim Serpil ÖZBİLGİN'e tüm kalbimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BHA	3- <i>tert</i> -butil-4-hidroksianisol
CCl ₄	Karbon tetraklorür
DAD	Diode Array Dedector
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DP _n	Polimerizasyon Derecesi
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀	Maksimum tepkinin %50'sine karşılık gelen konsantrasyon
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Endotelyal tip Nitrik Oksit Sentaz
FAO	Food and Agriculture Organization
FRAP	Ferric-Reducing Antioxidant Power
Glu	Glukoz
HMG-CoA	Hidroksimetil Glutaril Koenzim A
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC ₅₀	The Half Maximal Inhibitory Concentration
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
i.v.	İntravenöz
KK	Kolon Kromatografisi
LD	Lethal Dose
LDH	Laktat Dehidrojenaz
LDL	Düşük Yoğunluklu Protein
MDA	Malondialdehit
MeOD	Dötoro Metanol
NDI	Nepean Dispepsi İndeksi
NO	Nitrik Oksit

R _f	Retention factor
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rut	Rutinoz
<i>t</i> -BHP	Tersiyer Butil Hidroperoksit
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	<i>Cynara scolymus</i> kültürünün Dünya'daki dağılımı	9
Şekil 1.2.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen majör kafeik asit türevleri	13
Şekil 1.3.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen bazı flavonoidler	15
Şekil 1.4.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen seskiterpen yapısında bazı bileşikler	19
Şekil 1.5.	Kolesterol biyosentezinde enginar da bulunan etkili bileşiklerin muhtemel etki mekanizmalarını açıklayan yolak	22
Şekil 1.6.	(A) Kontrol grubu sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (B) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü	26
Şekil 1.7.	(A) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü (Büyütme: x4000). (B) Koruyucu amaçla 2000 mg/kg enginar yaprak ekstresi verilen sıçanların karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü	27
Şekil 1.8.	(1) Kontrol grubu sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (2) Enginar yaprak ekstresi verilen sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (3) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (4) Koruyucu amaçla enginar yaprak ekstresi verildikten sonra CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü	28

Şekil 1.9.	Kafeoilkinik asitler ve metabolitleri	39
Şekil 2.1.	<i>Cynara scolymus</i> L.	42
Şekil 2.2.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu-metanollü yaprak ekstresinin sıvı-sıvı ekstraksiyonla fraksiyonlandırma şeması	50
Şekil 2.3.	Kolon kromatografisi çalışmasına ait bir resim	54
Şekil 3.1.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan sulu metanollü ekstraksiyonla elde edilen ekstrenin fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen ekstreler ve miktarları	63
Şekil 3.2.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan farklı ekstraksiyon teknikleri ile hazırlanan ekstrelerin çözücü sistemi 2'de Vanilin/H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	64
Şekil 3.3.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 2'de sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	65
Şekil 3.4.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 3'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	65
Şekil 3.5.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 4'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	66

Şekil 3.6.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 5'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H ₂ SO ₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları	66
Şekil 3.7.	Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların şematik gösterimi	68
Şekil 3.8.	<i>n</i> -Butanollü fraksiyondan kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar ve izole edilen maddeler	69
Şekil 3.9.	CS-1 bileşiğinin izolasyon şeması	70
Şekil 3.10.	CS-1 bileşiğinin ES MS spektrumu	71
Şekil 3.11.	CS-1 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	72
Şekil 3.12.	CS-1 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	73
Şekil 3.13.	CS-1 bileşiğine ait UV spektrumu	75
Şekil 3.14.	CS-2 bileşiğinin izolasyon şeması	76
Şekil 3.15.	CS-2 bileşiğinin ES MS spektrumu	77
Şekil 3.16.	CS-2 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	78
Şekil 3.17.	CS-2 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	79
Şekil 3.18.	CS-2 bileşiğine ait UV spektrumu	81
Şekil 3.19.	Klorojenik asit'e (CS-2) ait kalibrasyon eğrisi	83
Şekil 3.20.	Sinarozit'e (CS-1) ait kalibrasyon eğrisi	83
Şekil 3.21.	Naringenin'e ait kalibrasyon eğrisi	84
Şekil 3.22.	Luteolin'e ait kalibrasyon eğrisi	84
Şekil 3.23.	Apigenin'e ait kalibrasyon eğrisi	85
Şekil 3.24.	Klorojenik asit'e (CS-2) ait HPLC kromatogramı	86
Şekil 3.25.	Sinarozit'e (CS-1) ait HPLC kromatogramı	86
Şekil 3.26.	Luteolin'e ait HPLC kromatogramı	87
Şekil 3.27.	Naringenin'e ait HPLC kromatogramı	87
Şekil 3.28.	Apigenin'e ait HPLC kromatogramı	88
Şekil 3.29.	Klorojenik asit'e (CS-2) ait UV spektrumu	89
Şekil 3.30.	Sinarozit'e (CS-1) ait UV spektrumu	89
Şekil 3.31.	Luteolin'e ait UV spektrumu	89

Şekil 3.32.	Naringenin'e ait UV spektrumu	90
Şekil 3.33.	Apigenin'e ait UV spektrumu	90
Şekil 3.34.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan %70 metanol ile hazırlanan yaprak ekstresine ait HPLC kromatogramı	91
Şekil 3.35.	BP 1'e ait HPLC kromatogramı	91
Şekil 3.36.	BP 2'ye ait HPLC kromatogramı	92
Şekil 3.37.	BP 3'e ait HPLC kromatogramı	92
Şekil 3.38.	BP 4'e ait HPLC kromatogramı	93
Şekil 3.39.	BP 5'e ait HPLC kromatogramı	93
Şekil 3.40.	BP 6'ya ait HPLC kromatogramı	94
Şekil 3.41.	Spray dryer ile kurutulan enginar yaprak ekstresine ait HPLC kromatogramı	94

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	<i>Cynara</i> türleri ve yetiştikleri bölgeler	8
Çizelge 1.2.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen bazı fenolik bileşikler	11
Çizelge 1.3.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen kafeik asit türevleri	12
Çizelge 1.4.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen flavonoitler	14
Çizelge 1.5.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen diğer bazı flavonoitler	16
Çizelge 1.6.	<i>Cynara scolymus</i> 'tan izole edilen başlıca seskiterpen laktonlar	18
Çizelge 2.1.	Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri	45
Çizelge 2.2.	<i>Cynara scolymus</i> 'un sulu-metanollü ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların İTK analizi için kullanılan çözücü sistemleri	52
Çizelge 2.3.	Butanollü ekstrenin fraksiyonlandırılmasında kullanılan çözücü oranları	55
Çizelge 2.4.	Preparatif ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri	56
Çizelge 2.5.	HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi	60
Çizelge 3.1.	<i>Cynara scolymus</i> yapraklarına uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerine ait ekstrelerin verimleri	62
Çizelge 3.2.	Kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları	67
Çizelge 3.3.	CS-1 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C -NMR bulguları	74
Çizelge 3.4.	CS-2 bileşiğinin ^1H ve ^{13}C -NMR bulguları	80
Çizelge 3.5.	Bileşiklere ait alıkonma zamanları	95

Çizelge 3.6.	Temin edilen bitkisel ürünlerde hesaplanan etkili bileşik miktarları (mg/kapsül) $\pm$ standart hata	97
Çizelge 3.7.	Spray dryer ile kurutulan ekstre ve <i>Cynara scolymus</i> yapraklarında hesaplanan etkili bileşik miktarları (mg/300 mg) $\pm$ standart hata	97
Çizelge 3.8.	Temin edilen bitkisel ürünlerde hesaplanan etkili bileşik yüzdesi (%)	98
Çizelge 3.9.	Spray dryer ile kurutulan ekstre ve <i>Cynara scolymus</i> yapraklarında hesaplanan etkili bileşik yüzdesi (%)	98



Cynara scolymus L.

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Papatyagiller (Compositae) familyasına ait *Cynara* L. cinsi Türkiye’de üç, Dünya’da sekiz tür ile temsil edilmektedir (Meriçli ve Seyhan, 2006). *Cynara* cinsi, yabani türler ve tıbbi amaçlar doğrultusunda kullanılmak için kültüre alınan türler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Yabani türlerden en önemlisi ve en yaygın olanı *Cynara cardunculus* L.’tur. İtalya ve Sicilya başta olmak üzere hemen hemen tüm Akdeniz ülkelerinde yetişir. *C. cardunculus*’un üç varyetesi bulunur. Bunlar *C. cardunculus* var. *sylvestris* Lam, *C. cardunculus* var. *altilis* DC. ve kültürü yapılan tür olan *C. cardunculus* var. *scolymus* L.’tur (Sonnante ve ark., 2007b).

Cynara scolymus L. (enginar), geçmişten günümüze kadar özellikle Akdeniz tipi beslenmede gıda olarak, ayrıca tedaviyi destekleyici veya tedavi amaçlı kullanılan, çeşitli farmakope ve monograflarda kayıtlı olan bir bitkidir (Curadi ve ark., 2007).

Enginarın gıda olarak tüketilen kısmı çiçek tablasıdır (Romani ve ark., 2006). Çiçek tablası etli yapıda olup küçük brakte yapraklarının bir araya toplanması ile oluşan topluluktur. Çiçek tablasının gıda olarak yaygın bir kullanımı olmakla beraber bitkinin tedavide kullanılan kısmı gövde ve yapraklarıdır (Aktay ve ark., 2000). Etkin maddeler özellikle yapraklarda yoğunlaşmıştır. Tıbbi amaçla kültüre alınan enginarın yaprakları gövde henüz olgunlaşmadan toplanmaktadır; çünkü gövde olgunlaşmaya başlarken yapraklardaki etkili madde miktarı da azalmaya başlamaktadır. Bu nedenle Avrupa’da sebze ya da tıbbi olarak kullanılacak enginarlar farklı tarlalarda yetiştirilmektedir (Meriçli ve Seyhan, 1998).

Yapılan bir çalışmada erken ve geç toplanan enginar braktelerindeki etkin madde miktarları incelenmiş, geç toplanan enginarlarda etkin madde miktarlarının azaldığı, antioksidan etkide düşüş olduğu tespit edilmiştir (Llorach ve ark., 2002).

Enginar yapraklarının kimyasal bileşimiyle ilgili yapılan çalışmalarda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile monokafeoilkinik asit (%0,48-4,24) ve dikafeoilkinik asit türevi bileşikler (%0,03-0,52) izole edilmiştir (Hausler ve ark., 2002; Comino ve ark., 2009). Fenolik yapıda olan bu bileşikler kafeik asit türevi bileşikler olarak adlandırılmaktadır. Enginar yapraklarında klorojenik asit, neoklorojenik asit, kriptoklorojenik asit ve sinarin gibi kafeik asit türevleri; flavonoidler (%0,5) ve seskiterpen laktonlar (%0-4) bulunmaktadır (Gruenwald ve ark., 2004). Bitki fenolik bileşiklerin yanı sıra vücutta kolesterol absorpsiyonunu önleyen fitosteroller ile tanen, şeker, nişasta ve inülin taşımaktadır (Hellwege ve ark., 1998; Joy ve Haber, 2007).

Bitkide majör olarak bulunan kafeik asit türevlerinden en önemlileri sinarin (1,3-dikafeoilkinik asit) ve klorojenik asittir (5-O-kafeoilkinik asit) (Llorach ve ark., 2002). Flavonoidlerden sinarozit ve skolimozit; seskiterpen laktonlardan da sinaropikrin önemli bileşiklerdendir (Curadi ve ark., 2007). Karaciğer ve safra rahatsızlıklarında en önemli etkiyi gösteren bileşikler başta sinarin olmak üzere kafeik asit türevleri, flavonoidler ve seskiterpen laktonlardır (Meriçli ve Seyhan, 1998; Mauri ve Pietta, 2000).

Enginar yaprakları sindirim şikayetlerinde ve karaciğer rahatsızlıklarında çok uzun yıllardan bu yana kullanılmaktadır (Wittemer ve ark., 2005; Azzini ve ark., 2007). Enginar yapraklarından hazırlanan ekstreler hepatektomi sonrasında karaciğer rejenerasyonunu hızlandırmakta (Miccadei ve ark., 2008), safra oluşumunu ve atılımını arttırmaktadır (Rodriguez ve ark., 2002; Speroni ve ark., 2003). Bitki ayrıca antioksidan, antispazmodik (Holtmann ve ark., 2003; Lattanzio ve ark., 2009), antifungal, antimikrobiyal ve diüretik

etkilerinden dolayı da kullanılmaktadır (Zhu ve ark., 2004). Çeşitli sindirim şikayetlerinin tedavisinde ve kan kolesterol düzeyini düşürmede de enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerden yararlanılmaktadır (Fritsche ve ark., 2002; Hausler ve ark., 2002; Moglia ve ark., 2008).

Enginar yaprakları, Anadolu'da infüzyon halinde (%2-3) iştah açıcı, idrar ve safra söktürücü olarak kullanılmaktadır. Taze yapraklardan hazırlanan ekstreler, bazen de bitkinin kökleri karaciğer hastalıklarına karşı kullanılmaktadır (Baytop,1999).

Enginar çiçeklerinden hazırlanan ekstreler, Dünya'da pek çok ülkede peynir yapımında kullanılmaya başlanmıştır. Sütün yerini alan enginar, içerdiği proteinaz enzimleri nedeniyle çöktürme ajanı olarak değerlendirilmektedir (Roserio ve ark., 2003; Llorente ve ark., 2004; Chazarra ve ark., 2007).

Cynara scolymus çeşitli farmakope ve monograflarda yer almaktadır. Almanya'da Sağlık Bakanlığı'nın bünyesinde bulunan bir komisyon olan Komisyon E monograflarında bitkinin yaprakları (*Cynarae folium*) kayıtlıdır. Monografta yaprakların sindirim sistemi şikayetleri ile karaciğer ve safra rahatsızlıklarında kullanılabileceği belirtilmektedir (Blumenthal ve ark.,1998).

C. scolymus Avrupa Farmakopesi ve ESCOP monograflarında "Artichoke leaf" ve "*Cynarae folium*" isimleri ile kayıtlı bulunmaktadır (ESCOP, 2003; European Pharmacopoeia, 2007).

"PDR for Herbal Medicines" isimli kaynakta "Artichoke" monografında bitkinin yaprak ve köklerinin tıbbi amaçla kullanılabileceklerinden söz edilmektedir. Bitkinin yapraklarının iştah açıcı olduğu, aynı zamanda karaciğer ve safra şikayetlerinde kullanıldığı belirtilmektedir (Gruenwald ve ark., 2004).

Bütün bu bilgiler ışığında enginarın yüzyıllar boyunca çeşitli amaçlarla tüketildiğini ve etkilerinin önce geleneksel kullanımdan yola çıkılarak, ilerleyen zamanlarda ise yapılan bilimsel çalışmalarla kanıtlandığını görmekteyiz.

Geçmişten günümüze değişen teknoloji ve ileri teknikler sayesinde bitkilerde bulunan etkin maddeleri izole etmekte, ardından belirli standartlara uygun hale getirerek bu etkin maddeleri kullanmaktayız. Bu durumun en önemli göstergelerinden birisi de günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan, eczaneler ve marketlerde reçetesiz satılan tedaviyi destekleyici bitkisel ürünlerdir. Bu ürünler ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'ndan satış izni alarak piyasada satılmaktadır. Bilindiği gibi bu ürünler, etkileri tam olarak bilinen etkin maddeler üzerinden standardizasyonları yapıldıktan sonra kullanıma sunulmalıdır. Standardize ürünler bazı etkin maddeleri (etkiden sorumlu) belirli miktarların altında olmamak koşulu ile içermelidir. Enginar yaprak ekstresi içeren ürünler genellikle sinarin (%2,5) ve klorojenik asit (%15) üzerinden standardize edilmektedir.

Çalışmamızın amacı Türkiye'deki *C. scolymus* içeren, sindirim şikayetleri ile karaciğer ve safra rahatsızlıklarında kullanılan bitkisel ürünlerin içerdiği etkili bileşik miktarlarının, HPLC ile karşılaştırılarak standardizasyonları ve fitoetkilerdeğerlikleri konusunda yorum getirmektir.

1.2. Genel Bilgiler

1.2.1. Tarihçe

Enginar uzun bir geçmişe sahip olan bir bitkidir. Yüzyıllar öncesinden bu yana bilinmekte ve tedavide kullanılmaktadır. Derin geçmişi olan birçok bitki gibi enginar da mitolojideki yerini almıştır. Yunan efsanesine göre; *Cynara*,

Zinari adasında yaşayan bir genç kızdır. Tanrı Zeus, erkek kardeşi denizler tanrısı Poseidon'u ziyarete giderken deniz kenarında bu genç, güzel, ölümlü kadını fark etmiş ve ona olan sevgisine karşılık kadını tanrıçalaştırmıştır. Kadın da Zeusla birlikte Olympos Dağı'na gitmeye karar vermiştir. Olympos'ta yaşayan *Cynara* annesini ve yaşadığı yeri çok özlediği için bir gün gizlice ölümlüler dünyasını ziyaret etmiştir. Bunu öğrenen Zeus çok kızmış, bu davranışın tanrısallığa yakışmadığını düşünüp *Cynara*'yı bugün enginar olarak bildiğimiz dikenli bitkiye dönüştürmüştür. Bitkiler dünyasındaki en güzel çiçeklerden birine sahip olan enginar, Zeus'un hışmına uğramış olan güzel *Cynara*'dır (Fitomed, 2009).

Enginarın ilk olarak Sicilya'da ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Romalı hekim-eczacı-botanikçi Theophrastus (M.Ö. 371-287) enginarın Sicilya ve İtalya'da yetiştirildiğinden bahsetmiştir (Lanteri ve ark., 2006). Enginar kültürünün ilk kez I. yüzyılda İtalya'da bir yer olan o zamanki adıyla "Cinara" bölgesinde yapıldığı düşünülmektedir. *Scolymus* ismi de Antik Yunan'dan gelmektedir. Eski Yunanca'da *scolymus* "dikenli" demektir. Bu açıdan bakıldığında "scolymus" diğer *Cynara* türlerini de tarif etmektedir (Sonnante ve ark., 2007a). Yunanlılar ve Romalılar eski yıllardan beri enginarı yiyecek olarak tüketmişlerdir. Yunanistan'da enginarın afrodizyak etkisiyle beraber erkek çocuk sahibi olmayı sağladığı kabul edilmiştir. Roma'da sirke ve bal ile hazırlanmış enginar, zenginlerin tercih ettiği bir yemek olarak yıllar boyunca kullanılmıştır. Roma İmparatorluğu'nun yıkılmasından sonra enginar Avrupa'ya yayılmıştır. Ardından İngiltere'ye 1548 yılında gelmiş, 1600 yılında İspanyollar tarafından Kaliforniya sahillerine taşınmıştır (Uğur, 2008; Erişim tarihi: 08.07.2009). Avustralya kıtasına yayılması 1788 yılını bulmuştur (Goubran ve ark., 2005). Günümüzde enginar üretiminde önemli bir yere sahip olan Arjantin'in enginarla tanışması XIX. yüzyıla dayanmaktadır. Arjantin'de kültür 1980 yılından sonra gelişmiştir (Garcia ve Firpo, 2005). Enginar yetiştiriciliği 1900'lü yıllardan sonra artış göstermiştir. 1948 yılında Marilyn Monroe'nun enginar kraliçesi seçilmesinden sonra popüleritesi artmış olan enginar için Kaliforniya'da 1959 yılından günümüze kadar devam eden

ve her yıl tekrarlanan enginar festivali düzenlenmektedir (Uğur, 2008; Erişim tarihi: 08.07.2009).

1.2.2. Botanik Özellikler

1.2.2.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Alem	: Plantae
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Asterales
Familya	: Asteraceae
Alt Familya	: Asteroideae
Cins	: <i>Cynara</i> L.

1.2.2.2. Asteraceae (Compositae) Familyasının Özellikleri

Asteraceae (Compositae) familyası yeryüzünde 1000'e yakın cins ve 20000'e yakın tür ile temsil edilmektedir. Yurdumuzda Asteraceae familyasına ait 133 kadar cins ve 1156 tür yetişmektedir (Davis ve ark., 1988). Bitkilerin çoğu tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık otsu bitkilerdir (Davis, 1975). Çalı ya da ağaç formunda olanların sayısı azdır. Yapraklardan bazıları alternan ya da oppozit dizilim gösterir veya hepsi tabandadır. Çiçek durumu kapitulumdur; çiçek tabanında braktelerden meydana gelmiş bir involukrum bulunur. Durumdaki çiçekler erdişi ya da tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorftur. Çiçeklerde kaliks; papus, halka veya pul biçimindedir. Korolla beş petalli, simpetal, tüp biçiminde veya dil şeklinde uzanmıştır. Stamen beş tane ve singeneziktir. Ovaryum alt durumlu, iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllüdür. Meyve tipi

akendir, tepesinde bazen bir papus bazen bir kaliks artığı bulunmaktadır (Tanker ve ark., 2004).

1.2.2.3. *Cynara* Cinsinin Botanik Özellikleri

Çok yıllık bitkiler olan *Cynara* cinsi dikenli yaprakları ve yine dikenli çiçek durumları ile karakterizedir. Gövde sağlam yapılı, dik olarak yükselmiş, boyuna yollu seyrek olarak dallara ayrılmış, dikenli veya dikensiz olabilir. Yapraklar alternan, genellikle kanatlı orta damarla pinnatisekt (loblar laminanın orta damarına kadar derin) olarak bölünmüş, dikenli veya dikensizdir. Kapitulumdaki bütün çiçekler aynı eşeyde, geniş, tek ve disk biçiminde, bir veya daha fazla başlı korimbos biçimindedir. İnvolukrum (brakte halkası) oval veya küreseldir. Çiçekler mavi-mor ya da beyazımsı renktedir (Davis, 1978).

1.2.2.4. *Cynara scolymus*'un Botanik Özellikleri

Cynara scolymus iki metre yüksekliğe kadar erişebilmektedir. Çiçekler mor renkli ve birçoğu bir arada, büyük bir baş halinde toplanmıştır. Çiçek tablası geniştir. Etrafını brakteler sarmıştır. Yapraklar; 40x15 cm boylarında, dallanmamış, küçük sivri uçlu, seyrek tüyler altta olmak üzere örümcek ağımsı yapıdadır. Alt yapraklar pinnatisekt ovat, kalın loblu dentat; üst yapraklar basit ovat-lanseolat, düzensiz dentat yapıdadır. Kapitulum 7-11 cm (involukrumun yayılan kısımları hariç) basık küremsidir. Brakteler her biri tepeden başlıklı ovat yapıda, 5x3 cm boylarında, sivri olmayan dikenli yapıda ve tepenin ortasında boşluklu şekildedir. Dış papus tüyleri yaklaşık 3-4 cm'dir (Davis, 1978).

1.2.3. *Cynara* Türlerinin Dünya'daki Yayılışı

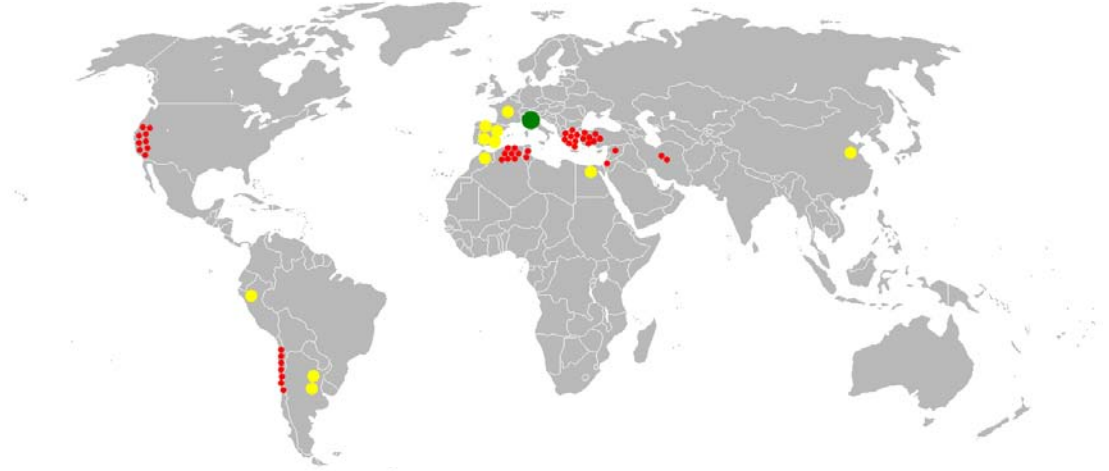
Cynara türleri Güney Amerika, Kanarya Adaları ve Akdeniz Ülkeleri'nde doğal olarak yetişmektedir (Davis, 1978; Gruenwald ve ark., 2004). *Cynara* cinsi Dünya'da sekiz tür ile temsil edilmektedir. Türlerin en çok yayılım gösterdiği yerler Çizelge 1.1'de verilmiştir. Yabani türler daha çok Akdeniz Ülkeleri'nde yayılım göstermektedir. *Cynara algarbiensis* Cosson, *Cynara baetica* Pau, *Cynara humilis* L. ve *Cynara auranitica* Post Akdeniz'in batısında; *Cynara cornigera* Lindley, *Cynara cyrenaica* Maire et Weiller ve *Cynara syriaca* Boiss Akdeniz'in doğusunda yayılım göstermektedir. En önemli ve Avrupa'da en yaygın yabani tür *Cynara cardunculus* türüdür. İki alt varyetesinden biri olan *C. scolymus* (enginar) kültüre alınmıştır (Sonnante ve ark., 2007b).

Çizelge 1.1. *Cynara* türleri ve yetiştikleri bölgeler (Roserio ve ark., 2003)

Türler	Anavatan
<i>Cynara algarbiensis</i> Cosson	Güney Portekiz ve Güneybatı İspanya
<i>Cynara auranitica</i> Post	Ortadoğu Ülkeleri
<i>Cynara baetica</i> Pau	Güney İspanya ve Kuzey Fas
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Kuzey ve Güneybatı Akdeniz Bölgesi
<i>Cynara cornigera</i> Lindley	Yunanistan ve Kuzeydoğu Afrika
<i>Cynara cyrenaica</i> Maire et Weiller	Libya ve Yunanistan
<i>Cynara humilis</i> L.	Portekiz, İspanya ve Kuzey Fas
<i>Cynara syriaca</i> Boiss	Suriye ve Lübnan

Oldukça geniş alanlara yayılmış enginarın Afrika'da Mısır, Fas, Tunus; Asya'da Çin, İsrail, Lübnan, Birleşik Arap Emirlikleri, Türkiye; Güney Amerika'da Arjantin, Brezilya, Şili; Kuzey Amerika'da Kaliforniya başta olmak üzere birçok ülkede kültürü yapılmaktadır (Acquadro ve ark., 2005). Enginar

kültürünün yaygın olduğu bölgeler Şekil 1.1'de gösterilmiştir. Özellikle Akdeniz Ülkeleri'nde enginar üretimi oldukça yaygın olup İtalya ve İspanya dünyanın en büyük enginar üreticisi konumundadırlar (Llorach ve ark., 2002; Curadi ve ark., 2007). 2005 yılında elde edilen FAO (Food and Agriculture Organization) verilerine göre Dünya'daki enginar üretiminin %50'sini yıllık 500000 tonla İtalya sağlamaktadır. İtalya'yı, İspanya ve Fransa takip etmektedir (Fратиanni ve ark., 2007).



Şekil 1.1. *Cynara scolymus* kültürünün Dünya'daki dağılımı (Üretim miktarları çoktan aza doğru yeşil, sarı ve kırmızı ile gösterilmiştir)

1.2.4. *Cynara* Türlerinin Türkiye'deki Yayılışı

Yabani türlerden *C. cardunculus* Avrupa'da yayılım gösteren bir bitki olmasına karşılık yurdumuzda kültürü yapılmamakta, yalnızca Sinop yöresinde yabani halde bulunmaktadır (Meriçli ve Seyhan, 1998). Türkiye'de doğal olarak yetişen tek tür Güney Anadolu'nun oldukça dar bir kesiminde yetişen *Cynara syriaca*'dır (Meriçli ve Seyhan, 2006).

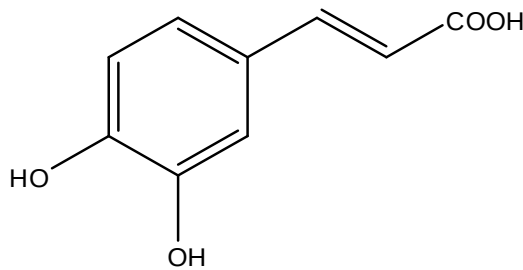
İzmir, Bursa, Yalova ve çevresi başta olmak üzere Adana'ya kadar olan kıyı bölgelerimizde *C. scolymus* türünün kültürü yaygındır. Kültürü yapılan bu yerli enginarlar Sakız ve Bayrampaşa olarak isimlendirilen enginar çeşitleridir (Eser ve Özen, 2005).

1.3. *Cynara* Türleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

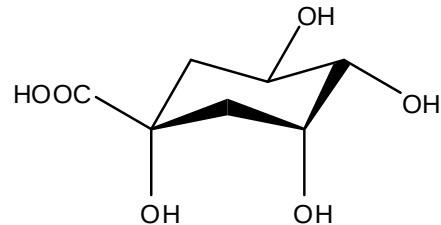
1.3.1. Fitokimyasal Çalışmalar

Cynara scolymus başta Akdeniz tipi beslenmede olmak üzere tüm dünyada uzun yıllardan bu yana gıda olarak tüketilmekte ve geleneksel tedavide başta karaciğer ve safra rahatsızlıkları olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bitkide birçok farklı bileşik yer almasına karşın, yapılan farmakolojik çalışmalar doğrultusunda, etkiden sorumlu bileşiklerin kafeik asit türevleri ve flavonoidler ile flavonoid glukozitleri olduğu düşünülmektedir. Biyolojik etki çalışmaları da daha çok bu bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır (Hausler ve ark., 2002). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla enginarın antikolesterol, antifungal, antibakteriyel, antikanser ve antioksidan etkileri de kanıtlanmıştır (De Paolis ve ark., 2008). Antioksidan etkinin majör fenolik bileşiklerden kaynaklandığı; ayrıca flavonoidlerin de sinerjik etkili oldukları düşünülmektedir (Gil-Izquierdo ve ark., 2001; Ferracane ve ark., 2008).

Cynara scolymus üzerinde yapılmış olan fitokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilmiş etkiden sorumlu bileşikler, kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmış olup fenolik bileşikler (kafeik asit türevleri, flavonoidler) ve terpenik bileşikler (seskiterpen laktonlar) başlıkları altında verilmiştir.

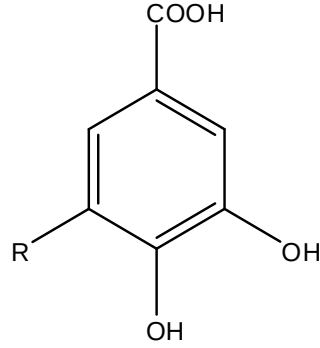


Kafeik Asit



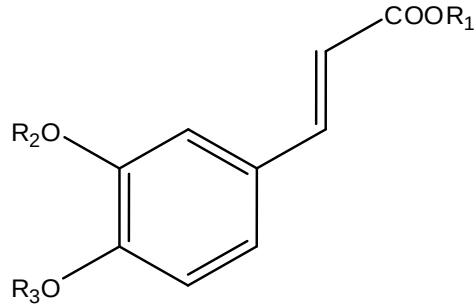
Kinik Asit

1.3.1.1. Fenolik Bileşikler



Çizelge 1.2. *Cynara scolymus*'tan izole edilen bazı fenolik bileşikler

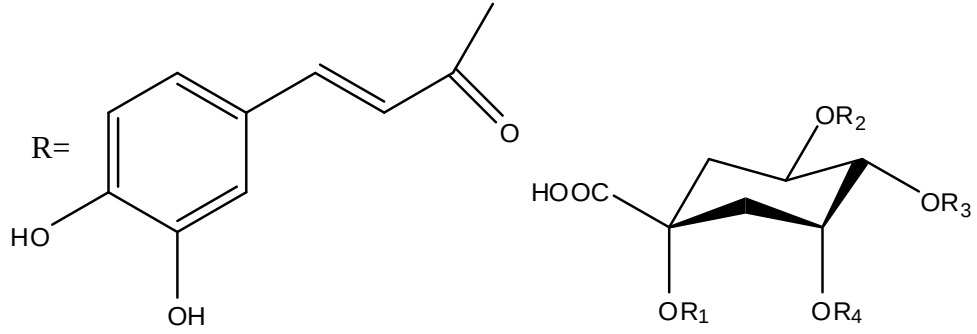
Bileşik	R
Gallik asit	OH
Protokateşik asit	H



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
Kafeik asit	H	H	H
Feruoilkinik asit	H	Me	H

(Sanchez-Rabaneda ve ark., 2003)

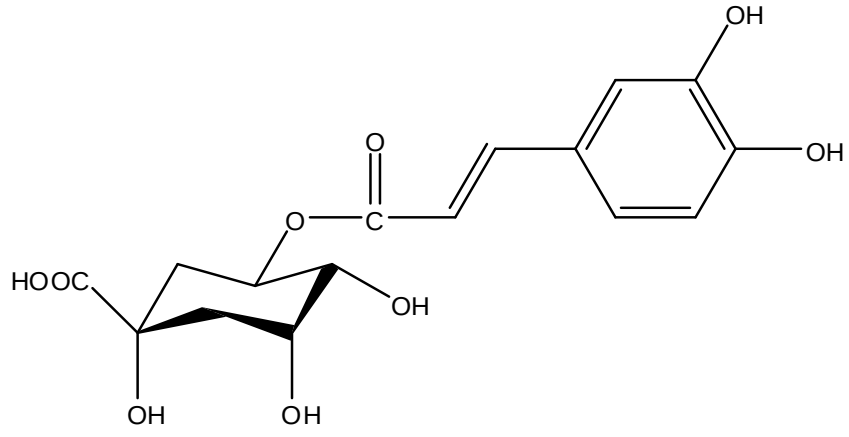
1.3.1.1.1. Kafeik Asit Türevleri



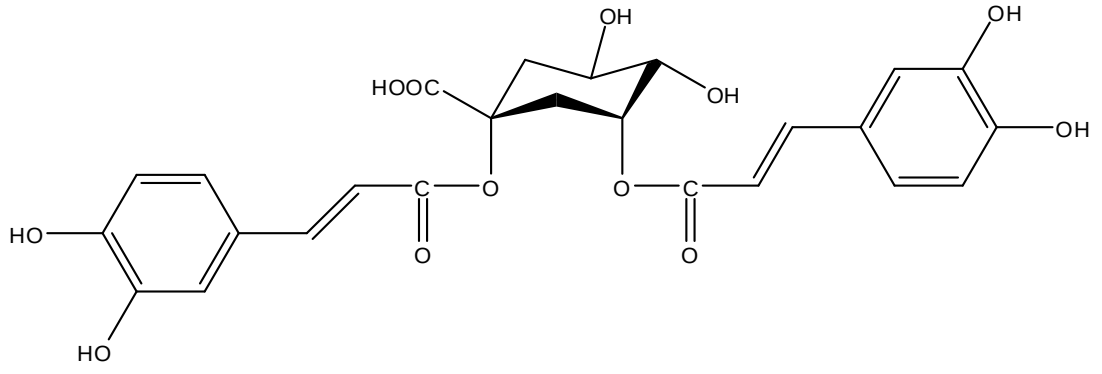
Çizelge 1.3. *Cynara scolymus*'tan izole edilen kafeik asit türevleri

Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Klorojenik asit (5-O-kafeoilkinik asit)	H	R	H	H
Kriptoklorojenik asit	H	H	R	H
Neoklorojenik asit	H	H	H	R
Psödoklorojenik asit (1-kafeoilkinik asit)	R	H	H	H
Sinarin (1,3-di-O-kafeoilkinik asit)	R	H	H	R
3,4-di-O-kafeoilkinik asit	H	H	R	R
1,5-di-O-kafeoilkinik asit	R	R	H	H
3,5-di-O-kafeoilkinik asit	H	R	H	R
4,5-di-O-kafeoilkinik asit	H	R	R	H

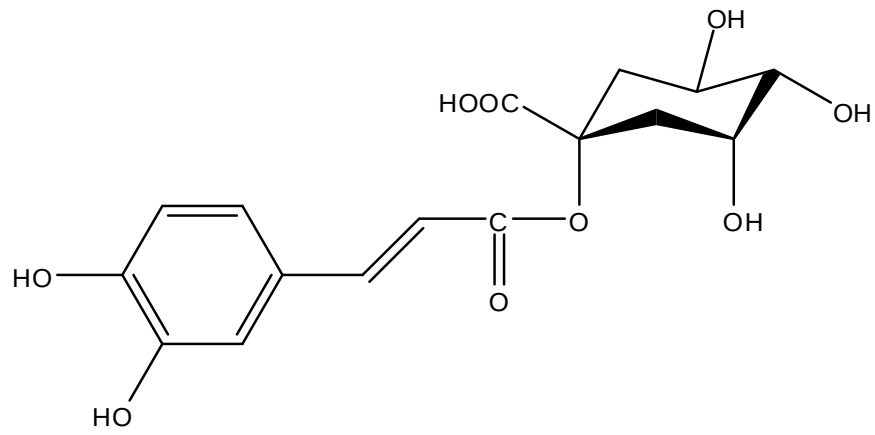
(Hausler ve ark., 2002; Clifford ve ark., 2008)



Klorojenik asit



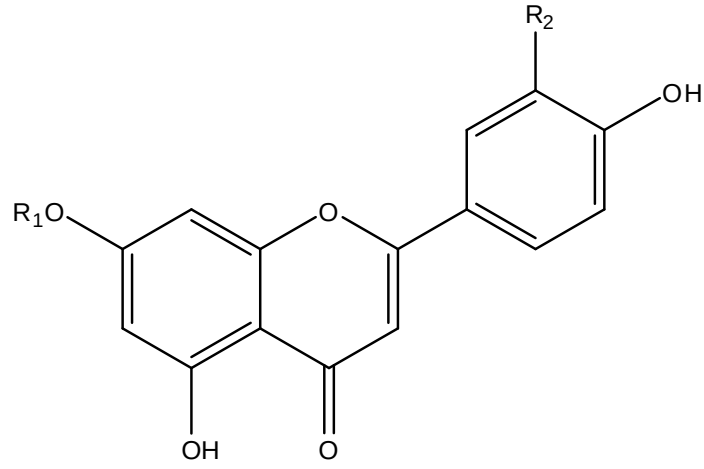
Sinarin



Psödoklorojenik asit

Şekil 1.2. *Cynara scolymus*'tan izole edilen majör kafeik asit türevleri

1.3.1.1.2. Flavonoitler

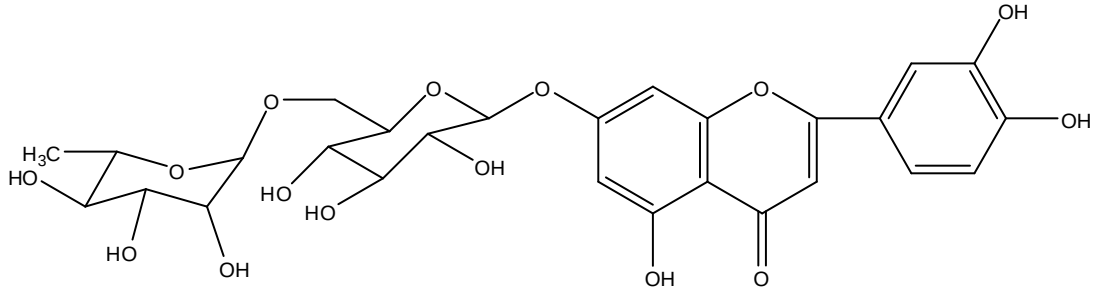


Çizelge 1.4. *Cynara scolymus*'tan izole edilen flavonoitler

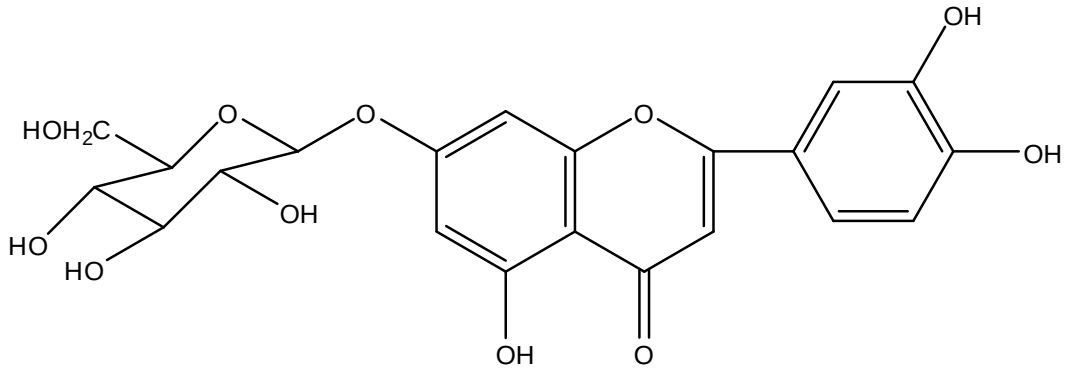
Bileşik	R ₁	R ₂
Luteolin	H	OH
Luteolin-7-O-rutinozit (skolimozit)	rut	OH
Luteolin-7-O-glukopiranozit (sinarozit)	glu	OH
Apigenin	H	H
Apigenin-7-O-rutinozit	rut	H
Apigenin-7-O-glukopiranozit	glu	H

rut: rutinoz, glu: glukoz

(Mulinacci ve ark., 2004; Schütz ve ark., 2004)

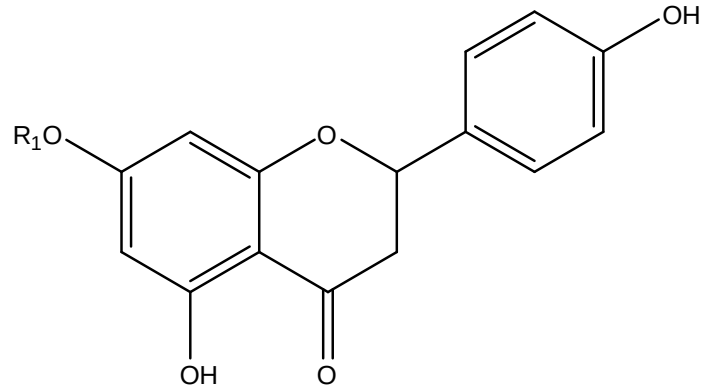


Skolimozit



Sinarozit

Şekil 1.3. *Cynara scolymus*'tan izole edilen bazı flavonoitler



Çizelge 1.5. *Cynara scolymus*'tan izole edilen diğer bazı flavonoitler

Bileşik	R ₁
Narirutin	rut
Naringenin	H
Naringenin-7-O-glukopiranozit	glu
Naringin	Neohesperidozit
rut: rutinoz, glu: glukoz	

(Sanchez-Rabaneda ve ark., 2003; Schütz ve ark., 2004)

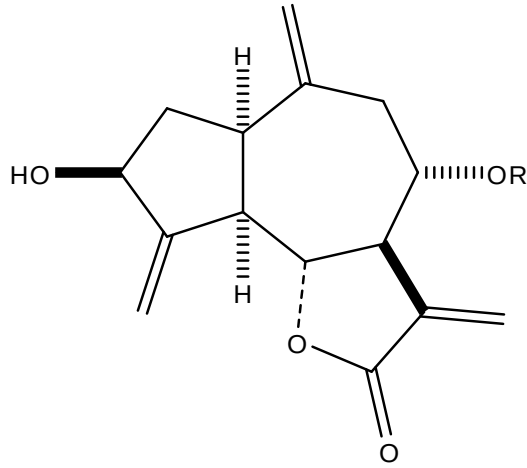
1.3.1.2. Terpenik Bileşikler

Terpenik bileşikler, Asteraceae familyasına ait bitkilerin birçoğunda fazla miktarda rastlanan acı lezzette maddelerdir. Taşıdıkları karbon atomu sayılarına göre monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler ve sesterterpenler olarak isimlendirilirler (Curadi ve ark., 2007).

1.3.1.2.1. Seskiterpen Laktonlar

Enginarın karakteristik acı tadı, içerdği seskiterpen laktonlardan ileri gelmektedir. Seskiterpen laktonlar enginardaki acı maddeler olarak adlandırılırlar. Acı maddelerin %80'ini sinaropikrin oluşturur. Enginar, içerdği seskiterpen laktonlar dolayısıyla sanayide likör eldesinde de kullanılır. Aynı zamanda bitkiyi böcek ve çeşitli zararlılara karşı koruyan endojen oluşumlar, yine seskiterpen laktonlardır (Curadi ve ark., 2007).

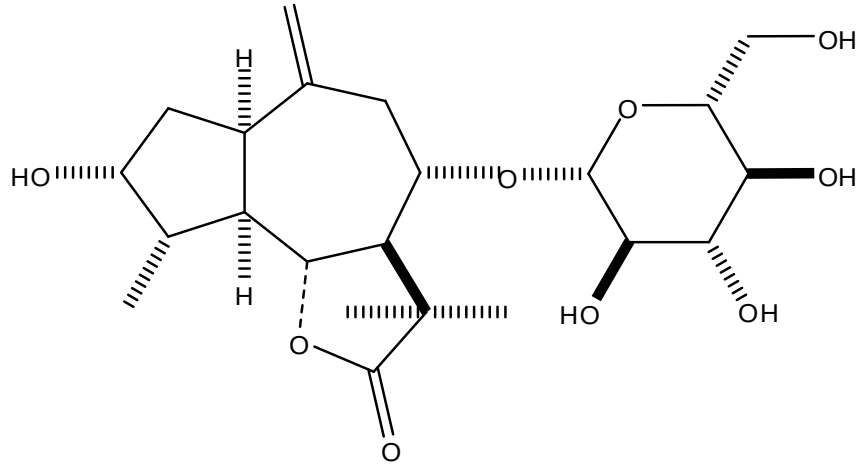
Ekstreden biyolojik aktivite ile yönlendirilen fraksiyonlama ile *Cynara scolymus*'tan izole edilen başlıca seskiterpen laktonlar: sinaropikrin, dehidrosinaropikrin, aguerin, sinaratriol, sinaraskolit, grosheimin ve seskiterpen glukozitler sinaraskolozit A, B ve C'dir (Shimoda ve ark., 2003).



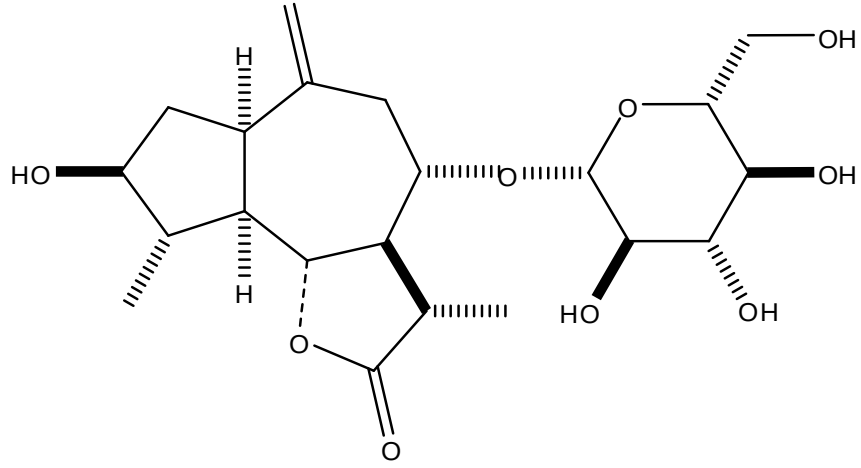
Çizelge 1.6. *Cynara scolymus*'tan izole edilen başlıca seskiterpen laktonlar

Bileşik	R
Sinaropikrin	
Aguerin	

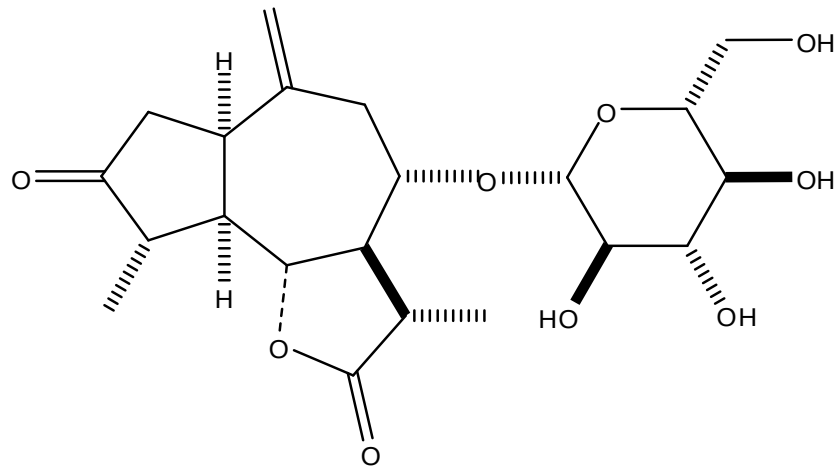
(Shimoda ve ark., 2003)



Sinaraskolozit A

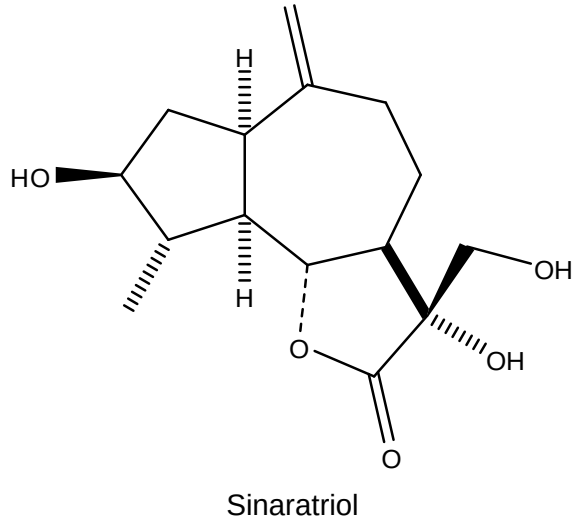
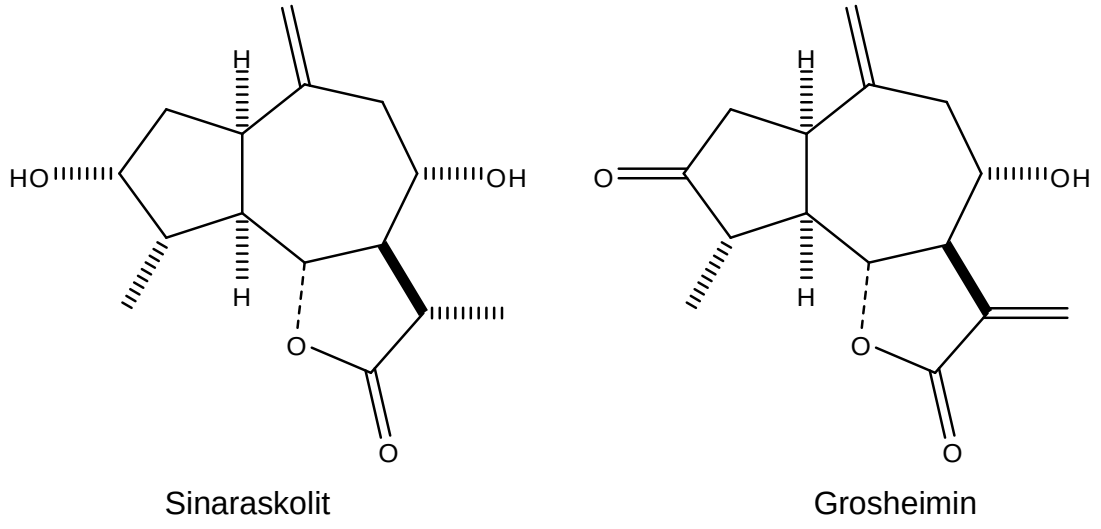


Sinaraskolozit B



Sinaraskolozit C

Şekil 1.4. *Cynara scolymus*'tan izole edilen seskiterpen yapısında bazı bileşikler

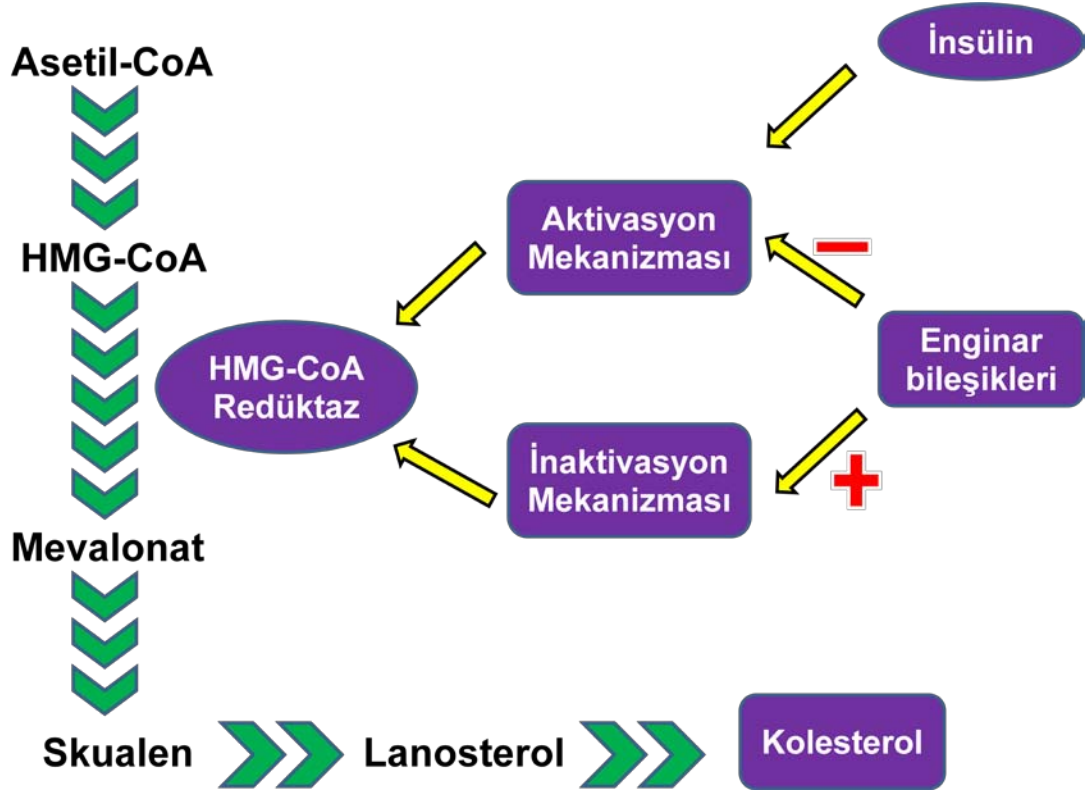


Şekil 1.4. Devam *Cynara scolymus*'tan izole edilen seskiterpen yapısında bazı bileşikler

1.3.2. Biyolojik Etki Çalışmaları

1.3.2.1. Kolesterol Düşürücü Etki

Enginarın yaprak ekstresinin ve içerdği etkili bileşiklerin kolesterol düşürücü etkileri bulunmaktadır. Bu etki, sıçanlardan izole edilmiş hepatositler üzerinde yapılan çalışmalarla da ortaya konmuştur. Bu çalışmalarda klorojenik asit, sinarozit, luteolin ve kafeik asit türevlerinin, insülinin uyardığı HMG-CoA (Hidroksimetil Glutaril Koenzim A) redüktaz enzimi üzerindeki inhibitör etkileri test edilmiştir. HMG-CoA redüktaz, kolesterol biyosentezi üzerinde kilit rol oynayan bir enzim olup HMG-CoA'nın mevalonata dönüşümünü katalizleyerek mevalonattan kolesterol oluşumunu desteklemektedir. Enginar yapraklarında bulunan bileşikler HMG-CoA redüktaz üzerinde inhibitör etki göstererek kolesterol oluşumunu önlemektedir (Fritsche ve ark., 2002; Juzyszyn ve ark., 2008a). Yaprak ekstresinde bulunan sinarozit ve luteolin HMG-CoA redüktaz enzimini kuvvetli bir şekilde inhibe ederken, klorojenik asitin HMG-CoA redüktaz enzimi üzerinde daha az etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, enginar bileşiklerinin kolesterol biyosentezini doğrudan değil, HMG-CoA redüktaz aktivasyon düzenleyici mekanizmaları inhibe ederek ve inaktivasyon düzenleyici mekanizmaları stimule ederek dolaylı olarak azalttığını göstermektedir. Kolesterol biyosentez inhibisyonu Şekil 1.5'te özetlenmektedir (Gebhardt, 1998).



Şekil 1.5. Kolesterol biyosentezinde enginarla bulunan etkili bileşiklerin muhtemel etki mekanizmalarını açıklayan yolak (Gebhardt, 1998)

Enginar yaprak ekstresinin ^{14}C -asetat ile işaretlenmiş sıçan karaciğer hücrelerinde kolesterol biyosentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. Enginar yaprak ekstresinin 0,007-0,1 mg/ml konsantrasyonunda %20 inhibisyon, 1 mg/ml konsantrasyonunda da %80 inhibisyon yaptığı gözlenmiştir. 50-100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda, sinarin ihmal edilebilir ölçüde az etki gösterirken, klorojenik asit %10-15, sinarozit %19-22, luteolin %51-63, sinarozit β -glukozitle inkübe edildiğinde %50-60 oranında maksimum inhibisyon göstermektedir. İnsan karaciğer hücrelerinde luteolinin etki oranı %80'i geçmektedir. Buradan hareketle kolesterol sentezinin inhibisyonundan sorumlu bileşiklerin luteolin ve glukozitleri (sinarozit) oldukları düşünülmektedir. Buna karşılık insan karaciğer hücrelerinde inhibisyon, eğer β -glukozidaz ile inkübasyon olmaz ise çok daha zayıftır. Bu durumun sebebi sıçan hücrelerinde daha fazla endojen β -glukozidaz bulunması ile açıklanabilir. β -glukozidaz, glukozitten (sinarozit), luteolin oluşumunu

arttırmaktadır. Böylece luteolinin kolesterol biyosentezi üzerinde inhibitör etkiden sorumlu olduğu görülmüştür (Gebhardt, 2002).

Yapılan bir başka çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan metanollü ekstrelerin, oral yolla zeytinyağı verilmiş farelerde 2 saat sonra meydana gelen serum trigliserit seviyelerindeki yükselmeyi anlamlı ölçüde düşürdükleri görülmüştür (Shimoda ve ark., 2003).

Bir başka çalışmada, intravenöz olarak verilen 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozda sinarinin tavşanların serum kolesterol seviyelerini %20 oranında düşürdüğü tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 30 mg/kg dozda, 70 gün süre ile sinarin verilen sıçanların total serum lipit ve esterleşmiş serum yağ asitleri seviyesindeki artışın anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (ESCOP, 2003).

Yapılan klinik çalışmalardan birinde serum LDL (düşük yoğunluklu protein)'si 130 mg/dl ila 200 mg/dl, trigliserit miktarı da 150 mg/dl ila 250 mg/dl arasında değişen 18 hiperlipidemili hastaya 20 gün süre ile sulu enginar yaprak ekstresi verilmiştir. Çalışma sonunda hastaların total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerinde düşüş gözlenirken, trigliserit oranının arttığı gözlenmiştir. Hiperlipidemi hastalarında endotel fonksiyonların bozulmuş olabileceğinin göstergesi, çözünebilir hücre molekülleri olan VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) ve E-selektin miktarlarının plazma içindeki seviyelerinin artmasıdır. Aynı çalışmanın sonunda ekstre grubundaki hastaların plazma çözünebilir hücre molekülü miktarlarında düşüş gözlenmiş; ancak E-selektin miktarının değişmediği görülmüştür. Bu sonuçlar enginar yaprak ekstresinin aterosklerozisi olan hastalarda bozulan endotel fonksiyonları üzerinde olumlu etkileri olabileceğini göstermektedir (Lupattelli ve ark., 2004).

Yapılan çift kör ve plasebo kontrollü bir klinik çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin kolesterol düşürücü etkileri

gözlemlenmiştir. Yaşları 18 ila 75 arasında değişen hiperlipidemili 75 erişkin gönüllü hastaya, günde 1280 mg standardize enginar yaprak ekstresi 12 hafta süreyle verilmiştir. Tedavi sonunda hastaların kan değerleri ölçülmüş ve istatistiksel olarak plazma kolesterol seviyelerinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Plasebo gruplarında anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır (Bundy ve ark., 2008).

Englisch ve arkadaşları (2000) yaptıkları plasebo kontrollü bir çalışmada ise hiperlipoproteinemi teşhisi konulmuş 143 hastaya 6 hafta boyunca enginar yaprak ekstresi vermişlerdir. Tedavi sonunda hastaların total kolesterol ve LDL değerleri ölçülmüştür. Total kolesterol seviyesinde %18,5; LDL seviyesinde %22,9 oranında azalma görülmüştür. Aynı çalışmada 11 farklı bitki türü kullanılmış ve serum kolesterol düzeylerinde en fazla düşüşü enginar ile kırmızı pirincin sağladıkları tespit edilmiştir (Coon ve Ernst, 2003).

Heckers ve arkadaşları (2007), enginar yaprak ekstresinin kalıtsal Tip IIa (n=15) veya Tip IIb (n=2) hiperlipidemili hastaların lipit seviyeleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Üç aylık çalışma döneminin sonunda, dokuz hastaya günde bir kez 250 mg ve sekiz hastaya günde üç kez 250'şer mg olmak üzere toplam 750 mg enginar yaprak ekstresi verilmiştir. Her bir doz yemekten 15 dakika önce verilmiştir. 250 mg'lık tedavi grubunda ortalama toplam kolesterol konsantrasyonu 381 mg/dl'den 375 mg/dl'ye düşmüş ve ortalama trigliserit konsantrasyonu 154 mg/dl'den 156 mg/dl'ye yükselmiştir. 750 mg'lık tedavi grubunda ortalama toplam kolesterol konsantrasyonu 372 mg/dl'den 382 mg/dl'ye yükselmiş ve ortalama trigliserit konsantrasyonu 167 mg/dl'den 232 mg/dl'ye yükselmiştir. Sonuçların herhangi biri istatistiksel açıdan anlamlı çıkmamıştır. Bu nedenle dört hastada enginar yaprak ekstresi günlük 1,5 gram kullanılmış ve ekstrenin kullanım süresi üç aydan altı aya uzatılmıştır. Buna karşılık hastaların kolesterol düzeylerinde herhangi bir değişme olmamıştır. Herhangi bir istenmeyen etki bildirilmemiştir. Sonuç olarak, araştırmacılar enginar yaprak ekstresinin kalıtsal Tip II hiperlipidemisi

olan hastaların lipit seviyelerinde azaltıcı etkisinin olmadığını belirlemişlerdir (Joy ve Haber, 2007).

1.3.2.2. Koleretik Etki

Yapılan bir çalışmada luteolin-7-glukozit, klorojenik asit ve sinarinin koleretik etkileri araştırılmıştır. Sıçanlardan izole edilmiş karaciğer üzerinde yapılan araştırmada luteolin-7-glukozitin koleretik etki göstermediği; ancak sinarin ve klorojenik asitin safra salgısını %10 ila %20 arasında arttırdıkları görülmüştür. Aynı çalışmada flavonoidlerden luteolin ve 7-O-glukozitin kolesterol sentezinin inhibisyonunda etkili oldukları belirlenmiştir (Schütz ve ark, 2006).

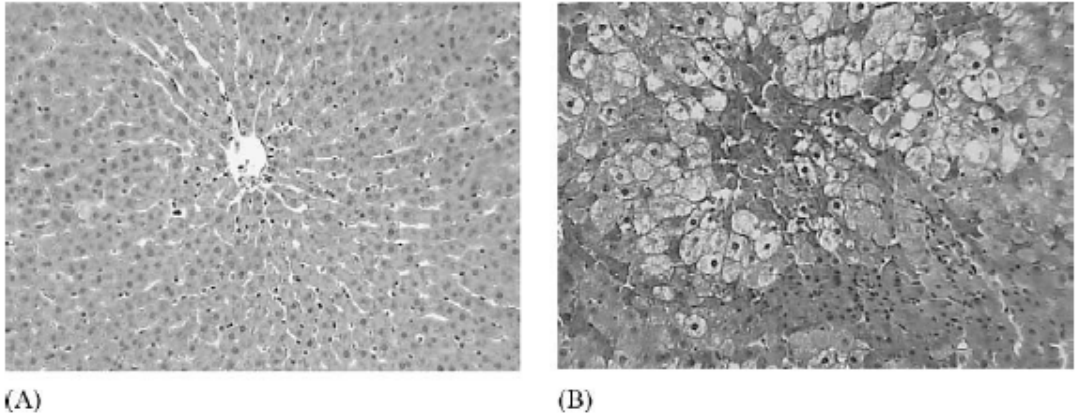
Kurutulmuş enginar yapraklarından hazırlanan sulu ekstraktların, kültüre alınmış sıçan karaciğerinin safra kanallarındaki safra salgısını arttırdığı gözlenmiştir (ESCOP, 2003).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, standardize yaprak ekstresinin safra asit konsantrasyonunu artırıcı etkisinin, koleretik bir ilaç olan dehidrokolik asitten daha güçlü olduğu tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark., 2002).

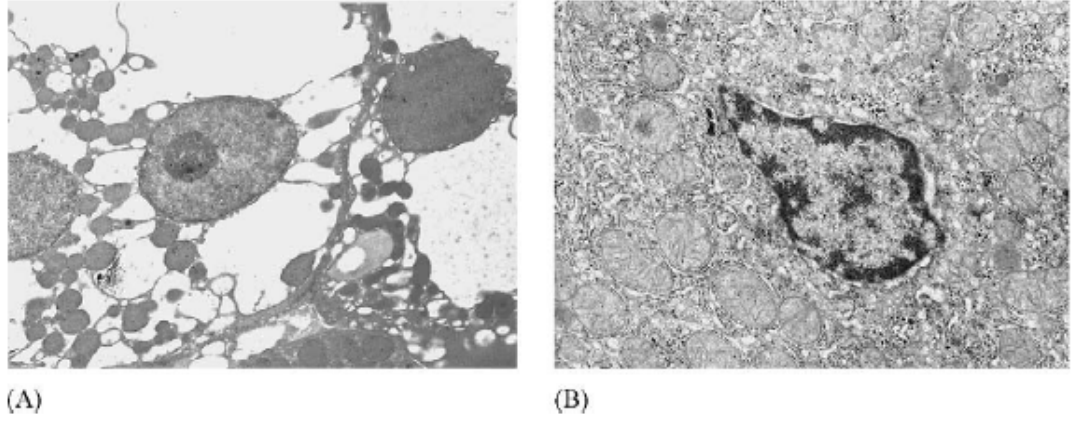
1.3.2.3. Hepatoprotektif Etki

Yapılan bir çalışmada enginardan izole edilen klorojenik asit, izoklorojenik asit, sinarin, luteolin-7-glukozit ve kinik asitin izole edilmiş sıçan hepatositlerinde CCl₄ (karbon tetraklorür) ile oluşturulan harabiyet üzerindeki hepatoprotektif etkileri (karaciğer koruyucu etki) incelenmiştir. Çalışma sonunda sadece sinarinin hepatoprotektif etki gösterdiği görülmüştür (Adzet ve ark., 1987).

Speroni ve arkadaşları (2003) sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin karaciğer üzerindeki koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada sıçan karaciğerinde CCl_4 ile oluşturulan intoksikasyon öncesinde enginar yaprak ekstresi ile sağlanabilecek karaciğer üzerinde koruyucu etki araştırılmıştır. CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulumda şişme, büyük koful oluşumu ve mitokondriyal hasar gözlenmiştir. Buna karşın CCl_4 'e maruziyet öncesi enginar yaprak ekstresi verilen sıçan grubunun karaciğer hücrelerinde endoplazmik retikulum ve mitokondride herhangi bir hasar belirtisi görülmemiştir. Çalışma sonucunda enginarın karaciğer hücrelerinde koruyucu ve rejenere edici etkinliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Dokularda meydana gelen değişimler Şekil 1.6'da ve Şekil 1.7'de verilmektedir.

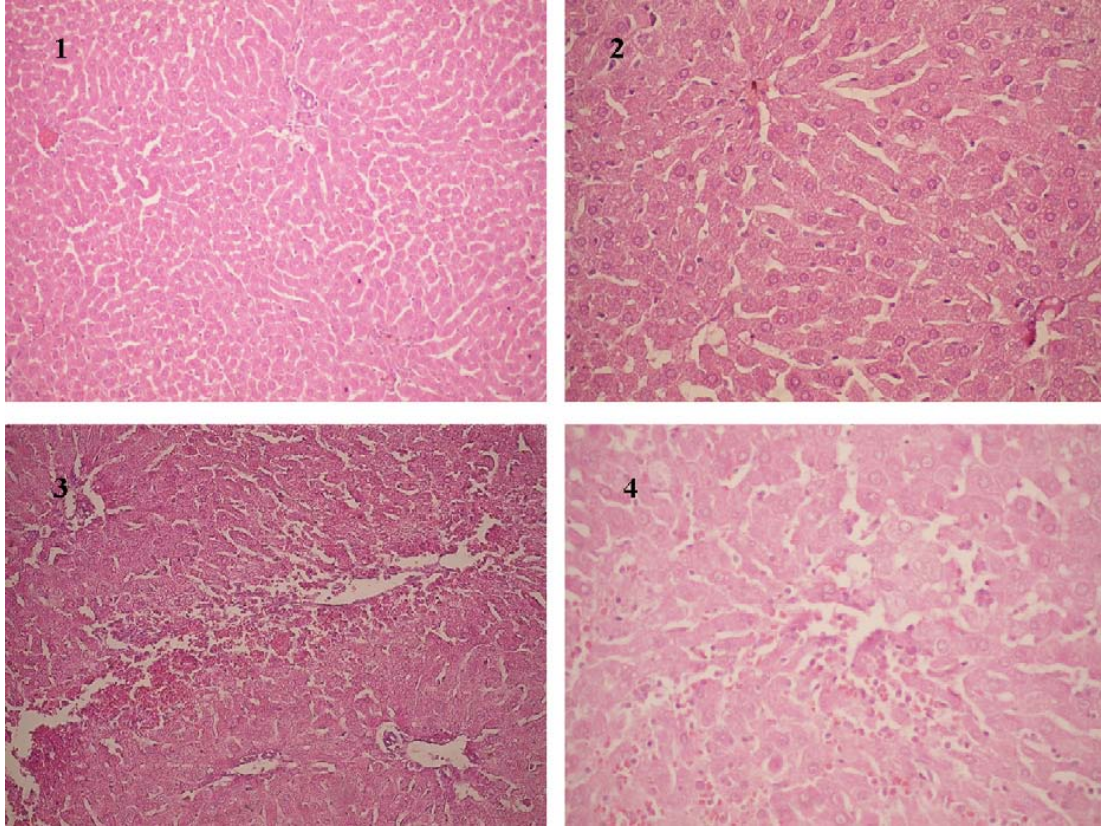


Şekil 1.6. (A) Kontrol grubu sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü (Büyütme: x114). (B) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü (Büyütme: x114) (Speroni ve ark., 2003)



Şekil 1.7. (A) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü (Büyütme: x4000). (B) Koruyucu amaçla 2000 mg/kg enginar yaprak ekstresi verilen sıçanların karaciğer hücrelerinin elektron mikroskopundaki görüntüsü (Speroni ve ark., 2003)

Mehmetçik ve arkadaşları (2008) yaptıkları bir çalışmada CCl_4 ile oluşturulacak karaciğer harabiyeti öncesi enginarın karaciğer koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada dört farklı gruba ayrılan sıçanlardan izole edilen karaciğer hücreleri üzerinde; plazma transaminaz aktivitesi, lipid peroksidasyonuna yol açan malondialdehit (MDA) ve glutatyon seviyeleri ölçülmüştür. CCl_4 'e maruz bırakılan gruptaki sıçanların intoksikasyon sonrasında karaciğer enzimlerinde (plazma alanin transaminaz, plazma aspartat transaminaz) ve malondialdehit oluşumunda artış; glutatyon seviyelerinde azalış görülmüştür. Buna karşın CCl_4 'e maruziyet öncesi iki hafta süreyle enginar yaprak ekstresi verilen grupta yer alan sıçanlardan elde edilen karaciğer enzim değerlerinde anlamlı değişiklikler bulunmuştur. Ekstre grubundaki sıçanların karaciğer enzimleri ve malondialdehit seviyelerinde azalma, glutatyon peroksidaz düzeyinde artış görülmüştür. Böylelikle enginarın karaciğer üzerinde önemli bir koruyucu etkinliği olduğu sonucu bir kez daha desteklenmiştir (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. (1) Kontrol grubu sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (2) Enginar yaprak ekstresi verilen sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (3) CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların hasar görmüş karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü. (4) Koruyucu amaçla enginar yaprak ekstresi verildikten sonra CCl_4 'e maruz bırakılan sıçanların karaciğer hücrelerinin mikroskoptaki görüntüsü (Mehmetçik ve ark., 2008)

Enginar yaprak ekstresinde bulunan polifenolik yapıdaki maddelerin ve flavonoidlerin, sıçan karaciğer kültüründe lipid peroksidasyonuna yol açan malondialdehit oluşumunu azalttıkları belirlenmiştir (Gebhardt, 1997). Tersiyer butil hidroperoksit'e (*t*-BHP) maruz bırakılmış sıçanlardan izole edilmiş karaciğer hücreleri üzerinde enginar yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların antioksidan ve hepatoprotektif etkileri incelenmiştir. Araştırma sonucunda ekstre grubundaki sıçanlarda doza bağımlı olarak hem MDA oluşumunun hem de laktat dehidrojenaz (LDH) miktarının azaldığı görülmüştür. Enginar sulu ekstresinde bulunan kafeik asit, klorojenik asit, sinarin ve sinarozitin EC_{50} (maksimum tepkinin %50'sine karşılık gelen

konsantrasyon) değerleri 8,1 µg/ml; 12,5 µg/ml; 15,2 µg/ml ve 28 µg/ml olarak ölçölmüştür (Gebhardt ve Fausel, 1997).

Huber ve arkadaşları (2009), yaptıkları bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin, kronik Hepatit C üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, alanin aminotransferaz düzeyleri normal üst sınırın 1,5 katından fazla olan 17 kronik Hepatit C hastasına, 12 hafta boyunca enginar yaprak ekstresi içeren bitkisel preparattan günde 10 kapsöl (sabah 3 kapsöl; öğle 3 kapsöl; akşam 4 kapsöl) verilmiştir. Bir kapsölde 320 mg kuru enginar yaprak ekstresinin bulunduğu preparattan, üretici firma günde en fazla 6 kapsöl alınmasını uygun gördüğünü belirtmiştir. Buna karşılık enginar yaprak ekstresinin toksisitesi düşük olduğundan çalışma sırasında 10 kapsöl kullanılmıştır. Bu süreçte hiçbir istenmeyen etki görülmediği bildirilmiştir. Çalışma sonunda hastaların alanin aminotransferaz düzeyleri ölçölmüş ve anlamlı bir değişikliğe rastlanmamıştır. Sonuç olarak, enginarın kronik Hepatit C hastalarında alanin aminotransferaz enzimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir.

Löhr ve arkadaşları (2009), yaptıkları bir *in vitro* çalışmada, standardize enginar yaprak ekstresinin, inkübe edilmiş insan karaciğer hücresinin fizyolojisi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Karaciğer hücreleri 48 saat boyunca ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) plaklarında inkübasyona bırakılmıştır. ELISA plaklarının 96 kuyucuğuna uygulanan hücrelerden yarısı 24. saatte alınmış, 10 µg/ml ve 100 µg/ml test bileşenleriyle muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonu ELISA yöntemi ile kontrol edilmiştir. Çalışma sonucunda 100 µg/ml konsantrasyonda enginar yaprak ekstresi ile inkübe edilen hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Daha düşük dozlarda etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar enginar yaprak ekstrelerinde bulunan bileşiklerin hücre proliferasyonunda önemli rol üstlendiğini göstermektedir.

1.3.2.4. Antioksidan Etki

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, başta kanser olmak üzere birçok hastalığa sebep olan faktörlerin başında yer almaktadır. Antioksidan etkili bileşikler içeren doğal ve sentetik ürünlerin kullanılması, serbest radikallerin oluşturduğu hasarları azaltmakta ya da önüne geçmektedir (Cervellati ve ark., 2002). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda enginarın güçlü antioksidan etkili olduğu görülmüştür. Enginarın; reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azalttığı, LDL oksidasyonunu önlediği, lipit peroksidasyonunu ve protein oksidasyonunu engellediği veya azalttığı ve glutatyon peroksidaz seviyelerini arttırdığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir (Mehmetçik ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan sulu ekstrelerin antioksidan etkileri incelenmiştir. Total antioksidan etkiye, tüm serbest radikallerin hangi oranda süpürüldüklerinin ölçülmesiyle ulaşılmaktadır. Serbest radikal süpürücü etkinin Rancimat deneyi ile ölçüldüğü bu çalışmada, enginar yapraklarında bulunan bileşiklerin antioksidan etkili oldukları görülmüştür. En yüksek etkiyi luteolin ve klorojenik asit göstermiştir. Bu çalışmada ayrıca luteolin-7-glukozit ve sinarinin de antioksidan etkili oldukları tespit edilmiştir. Bu etkiler α -tokoferol ile kıyaslandığında ise α -tokoferolün daha etkili olduğu belirlenmiştir (Fritsche ve ark., 2002).

Enginar yapraklarının ve başlarının antioksidan etkileri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda sulu metanollü ekstrelerin *in vivo* glutatyon peroksidaz seviyelerinde artış oluşturduğu, *in vitro* LDL oksidasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Jimenez-Escrig ve ark., 2003).

Bir başka çalışmada bitkinin yapraklarından izole edilen sinarin, klorojenik asit, luteolin-7-rutinozit ve luteolin-7-O-glukopiranozit (sinarozit) bileşiklerinin DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkileri test edilmiş, en

yüksek aktiviteyi sinarinin gösterdiği belirlenmiştir (Fritsche ve ark., 2002; Wang ve ark., 2003).

Reaktif oksijen türleri olarak bilinen hidroksil radikali, süperoksit anyon, singlet oksijen ve lipid peroksitler birçok hastalığın oluşmasına neden olmaktadır. Bu reaktif türler özellikle DNA ve RNA'yı hedef almaktadır (Pietta ve ark., 1998; Öztürk ve ark., 2004). Enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin ROS (Reaktif Oksijen Türleri) oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir (Juzyszyn ve ark., 2008b). Yapılan bir çalışmada enginar yapraklarının etanollü ekstresinin (50 µg/ml) endotel hücrelerinde ROS üretimini %60, sulu ekstresinin (50 µg/ml) %43 oranında azalttığı belirlenmiştir (Zapolska-Downar ve ark., 2002).

Enginar bitkisi antioksidan bileşikler açısından oldukça zengin bir kaynaktır. Buradan yola çıkılarak yapılan bir çalışmada 3 hafta boyunca erkek sıçanlara enginar yaprak ekstresi verilmiştir. Total antioksidan aktivite ve enzim aktivitesi; DPPH ile serbest radikal süpürücü etki, demir azaltıcı antioksidan etki-FRAP (Ferric-Reducing Antioxidant Power), LDL oksidasyonunda bakır katalizör inhibisyonu metotları kullanılarak ölçülmüştür. Çalışma sonunda enginar yaprak ekstresinin, oksidasyona sebep olan ajanlar üzerinde anlamlı bir azaltıcı etki gösterdiği görülmüştür. Elde edilen bulgular ışığında enginarın reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederek etki ettiği düşünülmektedir. Bir gram kuru materyalin *in vitro* DPPH aktivitede ve FRAP değerleri üzerindeki etkisinin; 29,2 mg ila 62,6 mg C vitamini ile 77.9 mg ila 159 mg E vitaminine eşdeğer olduğu bulunmuştur. Yine bu çalışmadan elde edilen veriler, enginarın plazmada ürik asit miktarını diğer antioksidanlara nazaran çok kısa sürede (4 dak) düşürmeye başladığını; ancak süre ilerledikçe (30 dak) etkisinin diğer antioksidanlara yakın olduğunu göstermiştir (Jimenez-Escrig ve ark., 2003).

Llorach ve arkadaşları (2002) ise yaptıkları bir çalışmada enginar yapraklarından hazırlanan sulu, metanollü ve sulu-metanollü ekstrelerin DPPH ve ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) radikallerini süpürücü etkilerini inceleyerek antioksidan aktivite tayini yapmışlardır. Her üç ekstrede de antioksidan aktivite görülmüştür. Buna karşın metanollü ve sulu metanollü ekstrelerde daha yüksek etki gözlenmiştir.

Bu durumun sebebinin metanol ve sulu metanol kullanılarak ekstre edilen materyalden daha fazla fenolik bileşik çekilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmada linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonuna da bakılmış ve enginardan hazırlanan ekstrelerin, sentetiklerle yarışır ölçüde etkili oldukları görülmüştür. 1 mg enginar yaprak ekstresinin aktivitesi, sentetik bir antioksidan olan BHA'nın (3-*tert*-butil-4-hidroksianisol) 250 µg'ına eşdeğer bulunmuş ve lipit peroksidasyonunu %80 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Llorach ve ark., 2002).

Bitkilerdeki total polifenoller ile bu maddelerin antioksidan etkileri arasında bir ilişki bulunmaktadır. Polifenoller bitkilerin dış ortam koşullarına ve mikroorganizmalara karşı geliştirdikleri savunma mekanizması ile oluşan ürünlerdir. Sentetiklerle yarışır ölçüde antioksidan etkilidirler. Bu nedenle bazı bitki ekstreleri sentetik antioksidanlara alternatif olarak kullanılmaktadır (Alamanni ve Cossu, 2003). Yapılan bir çalışmada, farklı zamanlarda toplanmış enginar numuneleri üzerinde total polifenolik maddelerin miktarı ve antioksidan etkileri incelenmiştir. Fenolik maddelerden özellikle klorojenik asitin antioksidan etkiden sorumlu olduğu ve LDL oksidasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. DPPH testi sonunda enginar braktelerinden hazırlanan %80 metanollü ekstrelerin, sentetiklerle yarışır ölçüde antioksidan oldukları görülmüştür. Çalışma esnasında elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, erken toplanan enginarlarda daha fazla, geç toplanan enginarlarda ise daha az miktarda polifenolik madde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenledir ki erken toplanan materyallerden hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktivitesi de daha yüksek bulunmuştur (Curadi ve ark., 2005).

1.3.2.5. Antimikrobiyal Etki

Mossi ve Echeverrigaray (1999), yaptıkları bir çalışmada etanol ve diklorometan ile hazırladıkları enginar yaprak ekstralarının çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel etkilerini incelemişlerdir. Diklorometan ekstresi 5 mg/ml konsantrasyonda *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* üzerinde bakterisit etki göstermiştir.

Enginarın gövde ve yapraklarının kloroformlu, etanollü ve etilasetatlı ekstralarının antimikrobiyal etkinlikleri agar difüzyon tekniği kullanılarak incelenmiş ve tüm ekstraların, *Candida albicans*, *Candida lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Mucor mucedo* ve *Cladosporium cucumerinum*'a karşı antifungal ve antibakteriyel etki gösterdikleri tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2005a).

Yapılan bir başka çalışmada enginarın toprak üstü kısmına ait gövde ile yapraklarının kloroformlu, etanollü ve etilasetatlı ekstraları, disk difüzyon tekniği kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada yedi patojen bakteri (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa*); dört maya (*Candida albicans*, *Candida lusitanae*, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces carlsbergensis*); dört küf mantarı (*Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum*, *Mucor mucedo* ve *Cladosporium cucumerinum*) kullanılmıştır. Tüm suşlar üzerinde antimikrobiyal etkinlik gözlenmiştir (Zhu ve ark., 2005b).

1.3.2.6. Antispazmodik Etki

Bu konuda yapılan bir çalışmada enginar yaprak ekstresinden alınan çeşitli fraksiyonların, antispazmodik etkileri kobaylar (guinea pig) üzerinde yapılan deneylerle araştırılmıştır. Fraksiyonlardan en ümit verici etkiyi diklorometan fraksiyonu göstermiştir. Bu fraksiyonun IC_{50} (The Half Maximal Inhibitory Concentration) değeri 0,93 mg/ml'dir. Bu fraksiyonda seskiterpen lakton yapısında olan sinaropikrin ($IC_{50}=0,065$ mg/ml) etkiden sorumlu madde olarak bulunmuştur. Sinaropikrinin etkisi diklorometan fraksiyonunun 14 katı olarak ölçülmüş ve papaverine eşdeğer etkinlikte olduğu görülmüştür (Emendörfer ve ark., 2005).

1.3.2.7. Antihipertansif Etki

Kan basıncının kontrolünde son derece önemli olan NO (Nitrik Oksit) güçlü bir vazodilatör etkiye sahiptir. Damarlar için oldukça önemli olan NO, eNOS (Endotelyal tip Nitrik Oksit Sentaz) ile üretilir. NO sentezinin NOS inhibitörleri ile bloke edilmesi sonucunda periferik vazokonstriksiyon oluşur ve bununla birlikte kan basıncında artış görülür. Yapılan bir çalışmada enginar yapraklarının sulu ekstresi, etilasetat ve *n*-butanol karışımı ile fraksiyonlama sonucu elde edilen bir alt organik faz ile sulu alt fazdan oluşan bu üç ekstrenin eNOS aktivitesi test edilmiştir. Test, insan göbek bağı venlerinin endotelyal hücrelerinden elde edilen hücre dizisi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Enginar yaprak ekstresi, eNOS aktivitesini arttırırken organik alt fraksiyonun daha güçlü bir etki gösterdiği, sulu alt fraksiyonun ise etki göstermediği görülmüştür. Yine aynı ekstrelerle yapılan bir başka çalışmada da izole edilmiş sıçan aort halkalarının organik alt fraksiyon ile inkübasyonu sonunda NO aracılı vazodilatör cevabın fazlaştığı tespit edilmiştir. Etkiyi gösteren örneklerdeki kafeoilkinik asit ve flavonoit miktarlarına bakıldığında organik alt fraksiyonun oldukça zengin, sulu alt fraksiyonun ise fakir olduğu görülmüştür.

Çalışmalarda luteolin ve sinarozitin eNOS aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2004).

1.3.2.8. Sindirim Sistemi Üzerine Etki

Goni ve arkadaşları (2005) tarafından yapılan bir çalışmada enginar yaprak ekstresinin kolon bakteriyel enzimlerinin metabolik aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla sıçan kör bağırsağı kullanılmıştır. Üç hafta boyunca 138,2 mg/kg enginar yaprak ekstresi verilen sıçanların kör bağırsak duvarında hipertrofi ve bağırsak içeriğinde artışla birlikte enzim aktivitesinde yükselme gözlenmiştir. Bulgular enginarın sindirilemeyen kısımlarının bağırsak sağlığı üzerinde olumlu etkileri olabileceğini düşündürmüştür.

İrritabl kolon sendromu; kas ağrısı, bağırsak hareketlerindeki düzensizlik veya bulantı, gaz, konstipasyon ya da diyare ile karakterize olan bir hastalıktır. Aşırı duyarlılık, anormal kasılmalar, bağırsaktaki düzensizliklerin yanı sıra beslenme ve stres de hastalık sebepleri arasında gösterilmektedir (Videlock ve Chang, 2007). Almanya’da yapılan bir çalışmada çeşitli sindirim şikayetleri olan 553 hastaya 6 hafta boyunca standardize edilmiş enginar yaprak ekstresi verilmiş ve farklı sindirim şikayetlerindeki değişiklikler incelenmiştir. Çalışma sonunda yapılan istatistiksel değerlendirmeler ışığında kas ağrılarında %75,6; abdominal kramplarda %77,6; karında şişkinlikte %65,5; mide gazında %66,4 ve kabızlıkta da %70,6 oranında anlamlı düşüşler saptanmıştır (Walker ve ark., 2001).

Yapılan bir klinik çalışmada standardize enginar yaprak ekstresinin, hazımsızlık şikayeti olan sağlıklı gönüllülerdeki iritabl kolon sendromu semptomları üzerindeki etkileri incelenmiştir. 208 gönüllüye 2 ay boyunca randomize olarak günde 320 mg ya da 640 mg standardize enginar yaprak ekstresi verilmiştir. Tedaviden sonra hastalarda iritabl kolon sendromu insidansında %26,4; Nepean Dispepsi İndeksi (NDI) total semptom skorunda

%41 oranında anlamlı bir düşüş görülmüştür. Hastaların bağırsak hareketleri normale dönmüş, değişken diyare/konstipasyon şikayetleri azalmıştır (Bundy ve ark., 2004).

Sindirim şikayetleri olan 247 hastada yapılan 6 haftalık çift kör, plasebo kontrollü bir başka çalışmada, 129 hastaya 320 mg yaprak ekstresi içeren preparatlar günde 3 kez 2 kapsül olarak verilmiştir. 115 hastaya da plasebo uygulanmıştır. İyileşme kriterleri olarak, NDI hayat kalitesi ve total symptom skorları değerlendirilmiştir. 6 haftalık tedavi sonunda ekstre grubundaki hastaların sindirim şikayetlerindeki azalma, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Holtmann ve ark., 2003).

Yapılan başka bir çalışmada ise 454 dispepsi hastası iki gruba ayrılmış; I. gruba 2 ay süreyle günde 320 mg, II. gruba yine 2 ay süreyle günde 640 mg enginar yaprak ekstresi verilmiştir. Çalışma sonunda iyileşme kriteri olarak, NDI hayat kalitesi ve total symptom skorları değerlendirilmiştir. 8 haftalık tedavi sonunda her iki ekstre grubundaki hastalarda total dispepsi skorunda %40'lık bir azalma gözlenmiştir (Marakis ve ark., 2002).

Sindirim şikayetlerinin yanı sıra mide ve bağırsak florasındaki düzensizlikler de son yıllarda oldukça fazla istenmeyen etkileri bulunan antibiyotiklerin kullanımına bağlı olarak artış göstermiştir. Gastrointestinal mikrofloradaki düzensizlikleri kontrol altına almak amacıyla alternatif tedavi metotları önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar enginar yapraklarından hazırlanan sulu ekstrelerin mide ve bağırsak florasının düzenlenmesinde dikkate değer etkilerinin olduğunu göstermiştir (Abdo ve ark., 2007).

1.3.2.9. Diğer Etkiler

Standardize yaprak ekstrelerinin alkol tüketimi sonrasında meydana gelen ve “akşamdan kalma” diye nitelendirilen semptomlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla 15 gönüllüde yapılan plasebo kontrollü bir çalışmada kişilere 320 mg standardize yaprak ekstresi içeren preparattan günde 3 kapsül verilmiştir. Çalışma sonucunda standardize enginar yaprak ekstresinin alkol tüketimine bağlı olarak gelişen baş ağrısı, susuzluk, kas ağrısı, uykusuzluk ve mide bulantısı gibi semptomların önlenmesinde herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Pittler ve ark., 2003).

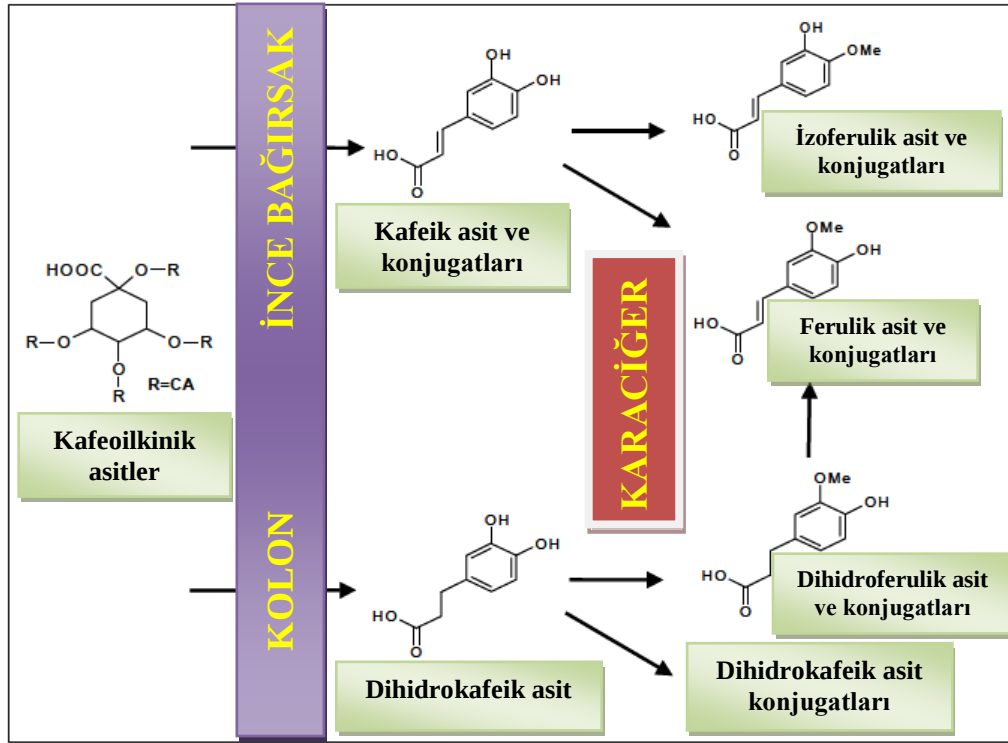
Enginar inülin içeriği açısından da değerlendirilmektedir. İnülin; sindirilemeyen ve özellikle Compositae familyasına ait bitkilerde daha fazla bulunan bir karbonhidrattır. İnülinin sindirilememesinin nedeni diğer karbonhidratlarda olduğu gibi glukozun α -1,2 bağlarıyla değil; β -2,1 bağlarıyla bağlanmış olmasıdır. İnülin, bağırsakta bulunan bakteriler tarafından fermentasyona uğratılarak yararlı etkilerini göstermektedir. İnülin, kalsiyum ve magnezyum absorpsiyonunu artırırken kolesterolü düşürmektedir. İnülinin etkinliği polimerizasyon derecesi (DP_n) ile ölçülmektedir. Polimerizasyon derecesi ne kadar yüksekse etkinlik de o oranda fazladır. Aynı miktarlarda ve aynı şartlarda hindiba, kara hindiba ve enginar üzerinde yapılan çalışmada enginardaki inülinin polimerizasyon derecesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hindiba, karahindiba ve enginardaki inülinlerin DP_n değerleri sırasıyla 12, 25 ve 46 olarak bulunmuştur (Lopez-Molina ve ark., 2005).

Enginar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulguların artmasıyla, enginardan besin ögesi dışında farklı amaçlar doğrultusunda da yararlanılabileceği görülmüştür. Enginar, polifenol oksidaz enzimi açısından oldukça zengin bir kaynaktır (Lopez-Molina ve ark., 2003b). Polifenol oksidaz, bakır içeren ve monofenollerin polifenollere hidroksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Espin ve ark., 1997; Aydemir, 2004; Doğan ve ark., 2005). Polifenol oksidaz enzimi insanlar için toksik, hatta kanserojen etkileri

olan fenollerı yükseltgeyerek polifenollerı oluşturur. Polifenoller ise antioksidan etkili bileşiklerdir (Llorach ve ark., 2002). Enginarın taşıdığı doğal enzimler olan peroksidaz ve polifenol oksidaz (tirozinaz) enzimlerinin, insanlar için toksik etki gösteren zararlı fenollerin uzaklaştırılmasında kullanılabileceği dşnlmş ve bu amaçla bir çalışma yapılmıştır. Lopez-Molina ve arkadaşları (2003a) yaptıkları çalışmada fenol kaynağı olarak klorofenol ve L-dopa kullanmışlar ve substratları su ile 25°C’de aerobik koşullarda inkübasyona bırakmışlardır. Fenol içeren suları enginar ekstreleriyle muamele etmişler, böylelikle uzaklaştırılan, yani polifenollere dönüşen fenol miktarlarını bulmuşlardır. Çalışma sonunda enginardan hazırlanan basit ekstrelerin, fenollerin %90’ını uzaklaştırdığını tespit etmişlerdir.

1.3.3. Farmakokinetik alışmalar

Enginar yaprak ekstresi oral yolla kullanıldığında, kanda ve rede hidroksisinnamik asit metabolitlerine rastlanmıştır. Daha nceki çalışmalarda kanda sadece kafeik asite rastlanmıştır. Wittemer ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada kafeoilkinik asitlerden oluşan başka metabolitlere de ulaşmışlardır. Oral yolla enginar yaprak ekstresi alan kişilerden alınan kan ve idrar örneklerinde HPLC ile yapılan analizler sonucunda kafeik asit, dihidrokafeik asit, ferulik asit, dihidroferulik asit ve izoferulik asit metabolitlerinin bulunduğunu belirlemişlerdir. Bu metabolitlerin, enginar yapraklarında bulunan kafeoilkinik asitlerden iki metabolik yolla oluştukları düşünülmektedir (şekil 1.9) (Wittemer ve Veit, 2003; Wittemer ve ark., 2005).



Şekil 1.9. Kafeoilkinik asitler ve metabolitleri (Witteimer ve ark., 2005)

Sinarinin farmakokinetik özelliklerini incelemek için yapılan bir çalışmada sıçanlara intravenöz (i.v.) olarak sinarin verilmiş ve HPLC kullanılarak kandaki durumu zamana karşı gözlemlenmiştir. Çalışma sırasında, hayvanlardan sinarin verilmeden önce ve sinarin verildikten sonra kan alınmış ve kan örneklerine ait HPLC kromatogramları incelenmiştir. Sinarin hayvanlara verildikten 5 dakika sonra dolaşımda tümüyle yer almıştır. Belirli zaman aralıklarında kan alınarak sinarinin kandaki konsantrasyonu izlenmiştir. Sinarinin eliminasyon yarı ömrünün çok düşük olduğu görülmüş, aynı zamanda çok kısa bir sürede karaciğer fonksiyonlarında artış gözlenmiştir. Bu gelişmeler araştırmacılara, sinarinin oral yolla alındığında ilk geçiş eliminasyonuna uğraması ihtimalini düşündürmüştür. Eğer öyle ise (enginar preparatları oral yolla alındığından) biyoyararlanımın daha düşük olacağını belirtmişlerdir (Alonso ve ark., 2006).

1.3.4. Toksisite Çalışmaları

Sulu alkollü enginar yaprak ekstresinin erkek sıçanlarda oral LD₅₀ değeri 2000 mg/kg, intraperitoneal LD₁₀ değeri 1000 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Sulu ekstresinin oral LD₄₀ değeri 2000 mg/kg, intraperitoneal LD₅₀ değeri 265 mg/kg olarak bulunmuştur (ESCOP, 2003).

Sinarinin farelerdeki LD₅₀ değeri 1900 mg/kg vücut ağırlığıdır. Sıçanlardaki intraperitoneal LD₅₀ değeri 800 mg/kg, tavşanlarda ise 100 mg/kg olarak ölçülmüş ve toksik etki gözlenmemiştir. 40 gün boyunca sıçanlara intraperitoneal olarak günde 50-400 mg/kg sinarin, tavşanlara da 30 gün boyunca intraperitoneal yolla günde 50 mg/kg sinarin verildiğinde toksik etki gözlenmemiştir (ESCOP, 2003).

Enginarın insanlardaki toksisitesi ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (Blumenthal ve ark.,1998).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada bitkisel materyal olarak Konya Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi Bitkiler Çiftliği'nde kültürü yapılan *Cynara scolymus* L. (enginar) yaprakları kullanıldı. Yapraklar toplandıktan sonra usulüne uygun olarak kurutuldu ve hazırlanan örnekler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na (AEF 24775) kaldırıldı. Herbaryum örneklerine ait resim Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. *Cynara scolymus* L.

HPLC ile kalite kontrol çalışmalarında kullanılmak üzere, çeşitli firmalara ait enginar yaprak ekstresi içeren bitkisel ürünler (BÜ) eczanelerden ve piyasadan temin edildi. Bitkisel ürünlerin içerikleri aşağıda verilmektedir.

BÜ 1: *Cynara scolymus* (yaprak) + *Silybum marianum* (tohum)

BÜ 2: *Cynara scolymus* (yaprak)

BÜ 3: *Cynara scolymus* (yaprak) + *Silybum marianum* (tohum)

BÜ 4: *Cynara scolymus* (yaprak)

BÜ 5: *Cynara scolymus* (yaprak) + *Silybum marianum* (tohum)

BÜ 6: *Cynara scolymus* (yaprak)

2.1.2. Kimyasal Maddeler, Cihazlar ve Gereçler

Çözücüler

Etilasetat	Riedel-de Haen
Kloroform	Riedel-de Haen
Metanol	Merck
<i>n</i> -Butanol	Merck
Hekzan	Riedel-de Haen
Sülfürik asit	Merck
Glasiyal asetik asit	Atabay Kimya
Formik asit	Aklar Kimya
Fosforik asit	Merck
Asetonitril	Merck

Standart Maddeler

Klorojenik asit	Sigma C3878
Luteolin	Sigma L9283
Naringenin	Sigma N5893
Apigenin	Serva 13700

Adsorbanlar

Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

Yöntem	Adsorban
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)	Silika jel 60 F ₂₅₄ (Merck, 1. 05554 20x20 hazır kaplı plak)
Kolon Kromatografisi (KK)	Silika jel 60 (70-230 mesh, 0.063-0.200 mm, Merck 1.07734.1000 ASTM)

Revelatör

Vanilin/H₂SO₄ (Vanilin'in derişik sülfürik asit içindeki %1'lik çözeltisi)

Çözücü Sistemleri

Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kromatografik çalışmalarda kullanılan çözücü sistemleri

Çözücü	Uygulama Alanı
Kloroform	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (95:5)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (90:10)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (85:15)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (82,5:17,5)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (80:20)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (75:25)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (70:30)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (60:40)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (50:50)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (40:60)	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol (20:80)	KK (Silika jel)
Metanol	KK (Silika jel)
Kloroform:Metanol:Su (61:32:7)	İTK
Metanol:Su (70:30)	İTK
Etilasetat:Metanol:Glasial asetik asit:Formik asit (90:25:10:10)	İTK
Etilasetat:Glasial asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26)	İTK
Etilasetat:Metanol:Su (100:13,5:10)	İTK
Etilasetat:Metanol:Su (100:25:10)	İTK
Etilasetat:Metanol:Su:Formik asit (100:25:10:5)	İTK
Etilasetat:Metanol:Su:Formik asit (100:15:10:5)	İTK
Fosforik asit:Su (0,5:99,5)	HPLC
Fosforik asit:Su (0,2:99,8)	HPLC
Asetonitril	HPLC

Kullanılan Cihazlar

HPLC Sistemi	Agilent 1100 G1315 DAD
UV Lambası	Camag
Kütle Spektrometresi	Waters 2695 Allia Micromass ZQ
NMR Spektrometresi	Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC
Spray Dryer	Büchi B290 Mini Spray Dryer
Evaporator	Büchi, Büchi RE 111, Heidolf 5111
Kromatografi Tankı	Camag (Cam küvet, 22 x 23 x 8)
Terazi	Ohaus Adventurer Pro
Ultrasonik Banyo	Julabo USR-3

2.2. Yöntem

2.2.1. Fitokimyasal Çalışmalar

2.2.1.1. Ekstraksiyon Çalışmaları

İzolasyon çalışmalarına başlamadan önce en uygun ekstraksiyon yöntemine karar vermek amacıyla farklı ekstraksiyon teknikleri denendi. Elde edilen toplam kuru ekstre miktarları tartılarak verimler hesaplandı. En verimli ekstraksiyon yöntemi seçildi.

2.2.1.1.1. Perkolasyon

Kurutulmuş ve toz edilmiş enginar yapraklarından 20 g tartıldı ve perkolatöre usulüne uygun olarak dolduruldu. Yaprakların üzerine metanol:su (70:30) konularak ıslanması sağlandıktan sonra perkolatörde 24 saat boyunca maserasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda perkolatörden çözücü geçirilerek ekstre toplandı. Bu işleme ekstre renksiz gelene kadar devam edildi. Pilili süzgeç kağıdından süzülen ekstre rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu. Balon içeriği ultrasonik banyoda su ile alındıktan sonra ekstre donduruldu ve liyofilize edildi. Kurutulan ekstre tartılarak verim hesaplandı.

2.2.1.1.2. Hareketli Maserasyon

Kurutulmuş ve toz edilmiş enginar yapraklarından 20 g tartıldı ve metanol:su (70:30) ile 3 gün süreyle oda sıcaklığında mekanik karıştırıcıda ekstre edildi. Her gün çözücü sistemi yenilenerek verim arttırıldı. Pilili süzgeç kağıdından süzülen ekstre rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu. Balon içeriği ultrasonik

banyoda su ile alındıktan sonra ekstre donduruldu ve liyofilize edildi. Kurutulan ekstre tartılarak verim hesaplandı.

2.2.1.1.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Kurutulmuş ve toz edilmiş enginar yapraklarından 20 g tartılarak selülozdan yapılmış kartuşa dolduruldu. Soxhlet ekstraktöründe geri çeviren soğutucu altında 8 saat süreyle metanol:su (70:30) ile ekstre edildi. Pilili süzgeç kağıdından süzülen ekstre rotavaporda kuruluğa kadar uçuruldu. Balon içeriği ultrasonik banyoda su ile alındıktan sonra ekstre donduruldu ve liyofilize edildi. Kurutulan ekstre tartılarak verim hesaplandı.

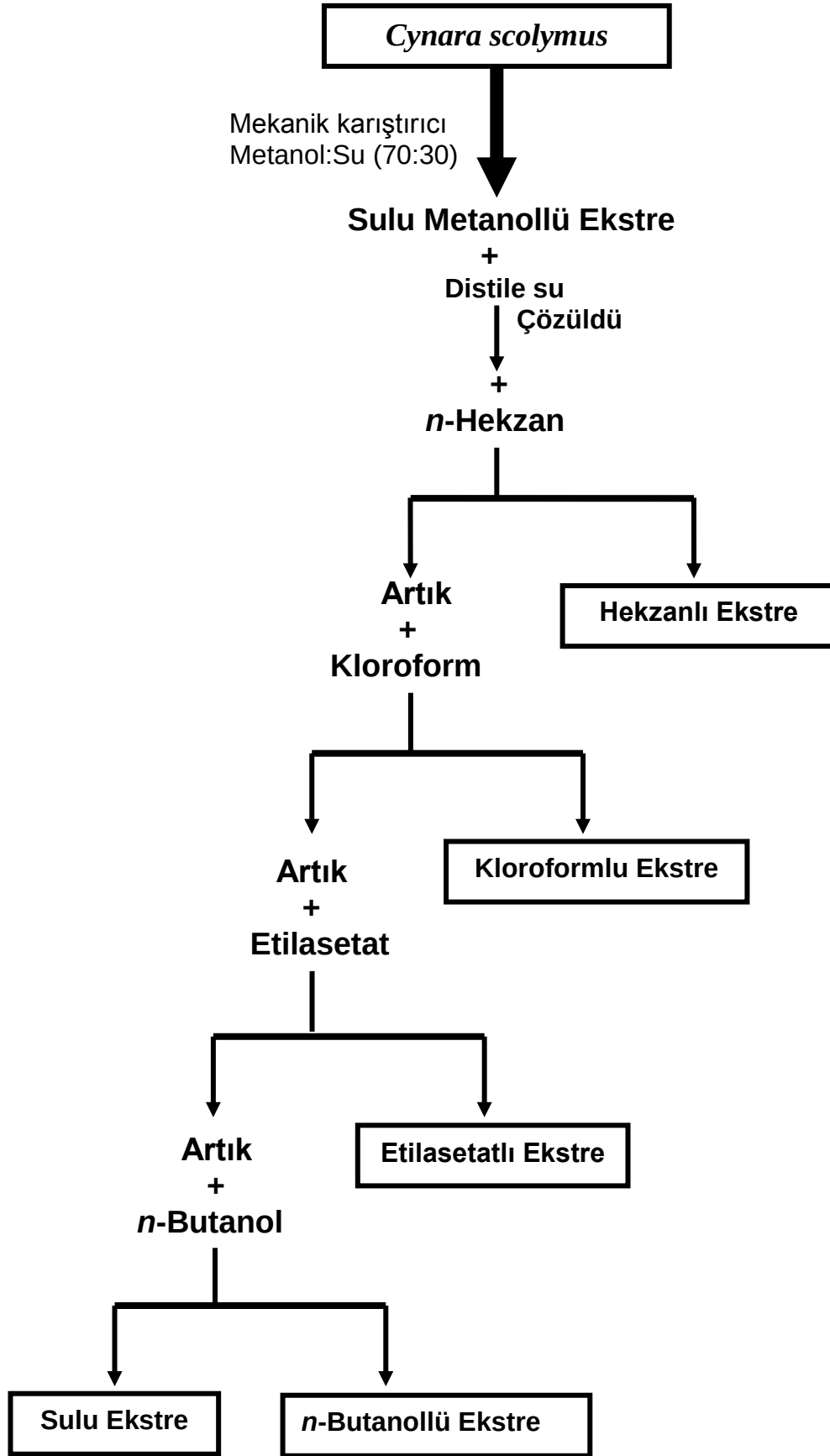
2.2.1.2. Metanol-Su Ekstresinin Hazırlanması

Ön çalışmalarda en yüksek verime sahip olan ekstraksiyon yönteminin hareketli maserasyon olduğu tespit edildi. Bu doğrultuda izolasyon çalışmaları için total ekstrenin aynı yöntemle hazırlanmasına karar verildi.

Cynara scolymus'un kurutulmuş yapraklarından 750 g alınarak, 15 litre metanol:su (70:30) ile oda sıcaklığında 5 gün süreyle mekanik karıştırıcı yardımıyla ekstraksiyon gerçekleştirildi. Çözücü sistemi her gün yenilenerek verim artırıldı. Elde edilen ekstre, pilili süzgeç kağıdından süzüldükten sonra rotavaporda yoğunlaştırıldı. Balon içeriği ultrasonik banyoda su ile alındıktan sonra ekstre donduruldu ve liyofilize edildi. Kurutulan ekstre tartılarak verim hesaplandı.

2.2.1.3. Metanol-Su Ekstresinin Fraksiyonlandırılması

Enginar yapraklarından elde edilen ekstre tamamen kurutulduktan sonra etkili bileşikleri elde etmek amacıyla izolasyon çalışmalarına geçildi. İşleme ilk olarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile başlandı. 50 g kuru ekstre 500 ml distile suda çözüldü ve ayırma hunisine alınarak üzerine sırasıyla; *n*-hekzan (3x500 ml), kloroform (4x500 ml), etilasetat (4x500 ml) ve *n*-butanol (4x500 ml) eklenerek ekstraksiyon gerçekleştirildi. *n*-Butanol ile fraksiyonlandırmada, *n*-butanol öncelikle su ile doyuruldu. Partisyon işleminin sonunda sulu ekstre ile birlikte toplam beş fraksiyon elde edildi. Elde edilen hekzan, kloroform, etilasetat ve *n*-butanollü ekstreler düşük sıcaklık ve basınçta yoğunlaştırılarak, sulu ekstre ise liyofilize edilerek kurutuldu ve tartıldı. *Cynara scolymus* bitkisinin yapraklarından elde edilen sulu metanollü ekstrenin sıvı-sıvı ekstraksiyon ile fraksiyonlandırılması işlemine ait şema Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. *Cynara scolymus*'un sulu-metanollü yaprak ekstresinin sıvı-sıvı ekstraksiyonla fraksiyonlandırma şeması

2.2.2. Kromatografik Çalışmalar

2.2.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi

Cynara scolymus'un yapraklarından farklı ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanan sulu-metanollü ekstrelerin İTK analizleri, denenen sistemlerden en uygunu olan çözücü sistemi 2 ile yapıldı. Sıvı-sıvı ekstraksiyondan elde edilen fraksiyonların İTK analizleri de aşağıda belirtilen çözücü sistemleri kullanılarak incelendi.

Adsorban	: Silika jel 60 F ₂₅₄ (Merck, 1. 05554 20x20) hazır kaplı plak
Çözücü Sistemi 1	: Metanol:Su (70:30)
Çözücü Sistemi 2	: Kloroform:Metanol:Su (61:32:7)
Çözücü Sistemi 3	: Etilasetat:Glasiyal asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26)
Çözücü Sistemi 4	: Etilasetat:Metanol:Su (100:13,5:10)
Çözücü Sistemi 5	: Etilasetat:Metanol:Glasiyal asetik asit:Formik asit (90:25:10:10)
Revelatör	: Vanilin'in sülfürik asit içindeki %1'lik çözeltisi (Vanilin/H ₂ SO ₄)

Enginar yapraklarının sulu-metanollü ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonlar ise Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, 1.05554 20x20) kaplı hazır plaklar üzerinde, her bir fraksiyon için ayrı olarak Çizelge 2.2'de belirtilen çözücü sistemleri kullanılarak incelendi. Bileşiklere ait lekeler Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile ısıtma sonucunda belirlendi.

Çizelge 2.2. *Cynara scolymus*'un sulu-metanollü ekstresinden sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile elde edilen fraksiyonların İTK analizi için kullanılan çözücü sistemleri

Fraksiyon	Kullanılan İTK Çözücü Sistemleri
<i>n</i> -Hekzan Fraksiyonu	<i>n</i> -Hekzan:Etilasetat (9:1) <i>n</i> -Hekzan:Etilasetat (8:2)
Kloroform Fraksiyonu	<i>n</i> -Hekzan:Etilasetat (9:1) Kloroform:Metanol (7:3)
Etilasetat Fraksiyonu	Etilasetat:Metanol:Su (100:13,5:10) Kloroform:Metanol:Su (61:32:7) Etilasetat:Glasiyal asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26)
<i>n</i> -Butanol Fraksiyonu	Etilasetat:Metanol:Su (100:13,5:10) Kloroform:Metanol:Su (61:32:7) Etilasetat:Glasiyal asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26) Kloroform:Metanol:Glasiyal asetik asit:Formik asit (90:25:10:10)
Sulu Fraksiyon	Etilasetat:Metanol:su (100:13,5:10) Kloroform:Metanol:Su (61:32:7) Etilasetat:Glasiyal asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26) Kloroform:Metanol:Glasiyal asetik asit:Formik asit (90:25:10:10)

Cynara scolymus'un *n*-butanollü ekstresinden izole edilen bileşikler ise, Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck, 1. 05554 20x20) hazır kaplı plaklar üzerinde etilasetat:glasiyal asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) çözücü sisteminde incelendikten sonra lekeler Vanilin/H₂SO₄ reaktifi ile ısıtma sunucunda gözlemlendi.

2.2.2.2. Kolon Kromatografisi

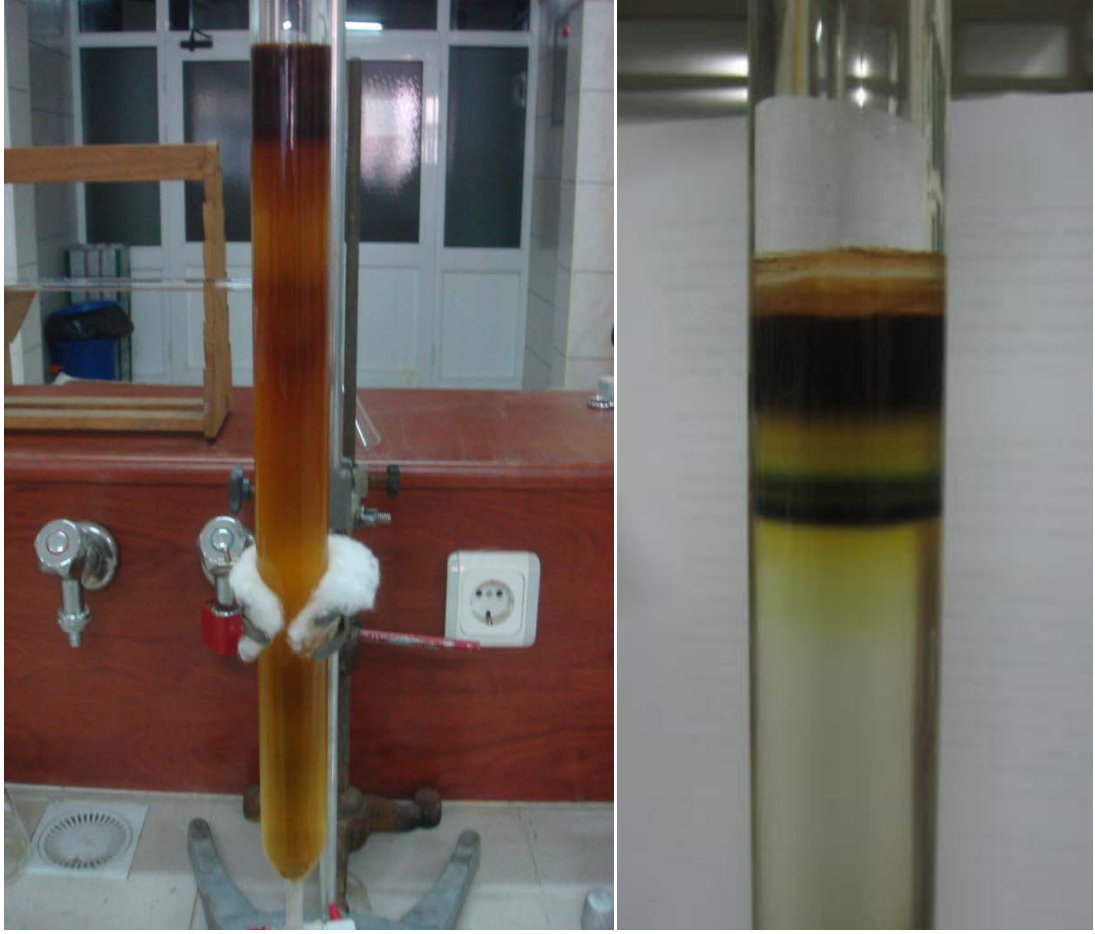
Etkiden sorumlu olabilecek bileşik/bileşikleri izole etmek amacıyla, *n*-butanollü ekstrenin kullanılmasına karar verildi. Bu amaçla izolasyon çalışmalarına öncelikle kolon kromatografisi yöntemiyle başlandı.

2.2.2.2.1. Kolonun Hazırlanması

Adsorban olarak Silika jel 60 (70-230 mesh, 0.063-0.200 mm, Merck 1.07734.1000 ASTM) kullanıldı. 120 g silika jel tartılarak, 5 cm çapında ve 67 cm boyundaki cam kolona kloroform ile karıştırıldıktan sonra hava kabarcığı kalmayacak şekilde dolduruldu ve daha sonra ayrımı yapılacak *n*-butanollü ekstre uygulandı.

2.2.2.2.2. Ekstrenin Kolona Uygulanması

n-Butanollü ekstrenin kolona uygulanması kuru tatbik (Slurry) metoduna göre yapıldı. Bu amaçla *n*-butanollü ekstre tam olarak tartıldıktan sonra (5 g) bir kapsülde *n*-butanol içerisinde tamamen çözüldü ve ağırlığı kadar silika jel 60 (5 g) ile karıştırıldı. Kuruması için çeker ocak altına bırakıldı. Tamamen kurutulduktan sonra silika jele emdirilmiş ekstre kolona tatbik edildi. Ekstrenin üst kısmına bir miktar daha silika jel ilave edilerek ekstrenin kolonda havalanması engellendi. Elüsyon işlemiyle, *n*-butanollü ekstre fraksiyonlandırılmaya başlandı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kolon kromatografisi çalışmasına ait bir resim

2.2.2.2.3. *n*-Butanollü Ekstrenin Fraksiyonlandırılması

Elüsyon işlemine kloroform ile başlandı ve Çizelge 2.3'te belirtildiği şekilde kloroform:metanol'ün giderek artan polaritedeki karışımları ile devam edildi. Son olarak saf metanol ile yıkanarak işlem sonlandırıldı. Fraksiyonlar 100 ml'lik hacimlerde toplandı ve toplam 155 fraksiyon elde edildi. Elde edilen fraksiyonlar İTK ve HPLC ile incelenerek R_f (Retention factor) değerleri aynı olan fraksiyonlar birleştirildi.

Çizelge 2.3. Butanollü ekstrenin fraksiyonlandırılmasında kullanılan çözücü oranları

Sistem No	Çözücü Oranları
1	Kloroform
2	Kloroform:Metanol (95:5)
3	Kloroform:Metanol (90:10)
4	Kloroform:Metanol (85:15)
5	Kloroform:Metanol (82,5:17,5)
6	Kloroform:Metanol (80:20)
7	Kloroform:Metanol (75:25)
8	Kloroform:Metanol (70:30)
9	Kloroform:Metanol (60:40)
10	Kloroform:Metanol (50:50)
11	Kloroform:Metanol (40:60)
12	Kloroform:Metanol (20:80)
13	Metanol

Ön temizleme işleminden sonra fraksiyonların içerdikleri bileşikleri saflaştırmak amacıyla, preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristallendirme gibi yöntemlerden yararlanıldı.

2.2.2.3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlarda bulunan bileşikleri saflaştırmak amacıyla, diğer bir kromatografik yöntem olan preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı. Silika jel 60 F₂₅₄ (Merck 1.05744, 20x20, 0.5 mm) kaplanmış hazır plaklar üzerinde Çizelge 2.4'te belirtilen çözücü sistemleri kullanılarak temizleme işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 2.4. Preparatif ince tabaka kromatografisinde kullanılan çözücü sistemleri

Sistem No	Çözücü Sistemi
1	Etilasetat:Metanol:Su (100:13,5:10)
2	Etilasetat:Metanol:Su (100:25:10)
3	Etilasetat:Metanol:Su:Formik asit (100:25:10:5)
4	Etilasetat:Metanol:Su:Formik asit (100:15:10:5)
5	Etilasetat:Glasiyal asetik asit:Formik asit:Su (100:11:11:26)

Lekelerin belirlenmesi için plaklar, alüminyum folyo ile kapatılıp, kenardan yalnızca 1 cm'lik bir bölge açık bırakıldı ve bu kısma Vanilin/H₂SO₄ reaktifi uygulandı. Belirlenen lekeler kazınarak maddeler toplandı ve metanol içerisinde ultrasonik banyoda 15 dakika bırakılıp süzüldü. Süzme işlemi silika jeli geçirmeyecek çapta porlara sahip süzgeç kağıdından (S&S Filter paper circles, 125 mm, 589³ blue ribbon) yapıldı. Süzüntüler rotavaporda yoğunlaştırılarak, HPLC ile saflıkları kontrol edildi.

2.2.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini

Kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi yardımıyla birbirinden ayrılan bileşikler kristallendirme ya da kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı ve her bir bileşiğin yapısı aşağıda belirtilen spektroskopik yöntemlerle tayin edildi.

2.2.3.1. NMR Spektroskopisi

Bileşiklerin MeOD ve DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde hazırlanan çözeltilerinin ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II'de bulunan Varian Mercury 400, 400 MHz High Performance Digi NMR Spektrometre cihazı kullanılarak alındı.

2.2.3.2. Kütle Spektroskopisi

İzole edilen bileşiklerin kütleleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı II'de bulunan Waters 2695 Allia Micromass ZQ marka LC/MS cihazı ile ölçüldü. Örnekler metanol içinde çözülüp, dilüe edildikten sonra aşağıda verilen şartlar altında 2 µl enjekte edilerek analizler yapıldı.

LC/MS Şartları

HPLC Sistemi	: Waters Alliance
Kolon	: C 18
Hareketli Faz A	: Metanol:Su (50:50)
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Hızı	: 0,5 ml/dak
Sıcaklık	: 25°C
Enjeksiyon Hacmi	: 2 µl

2.2.3.3. UV Spektroskopisi

Bileşiklerin metanol ve DMSO içinde hazırlanan çözeltilerinin farklı dalga boylarında UV spektrumları Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde bulunan Agilent 1100 G1315 DAD cihazı kullanılarak alındı.

2.2.4. HPLC ile Kalite Kontrol Çalışmaları

HPLC ile kalite kontrol çalışmalarının yapılabilmesi için standart maddelerden stok çözeltiler; bitkisel materyalden numune çözeltileri; fitoeshdeğerlik kontrolü yapılacak olan piyasadan temin edilmiş bitkisel ürünlerden analiz çözeltileri hazırlandı. Klorojenik asit ya da sinarin üzerinden standardize olduğu bildirilen bitkisel ürünlerdeki etkin madde miktarlarını tespit etmek için

standartlara ait kalibrasyon eğrileri çizildi ve bitkisel ürünlerdeki etkin maddelerin miktar tayini üç paralel ölçümle yapıldı.

2.2.4.1. Analiz Yöntemi

Çalışmamızda *Cynara scolymus* yapraklarından hazırlanan sulu-metanollü total ekstrenin, sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrelerin, kolon kromatografisi sonrasında *n*-butanollü ekstreden fraksiyonlandırılan fraksiyonların, saflaştırma işlemi sırasında İTK analizleri doğrultusunda birleştirilmiş fraksiyonların, izole edilen bileşiklerin, standart madde ve kalite kontrolü yapılacak bitkisel ürünlerin analizleri HPLC ile yapıldı. Analiz sırasında C 18 ters faz kolon kullanıldı. Avrupa Farmakopesi monografında yer alan HPLC yönteminden ve literatür yöntemlerinden yararlanıldı. Bu yöntemler pik ayrımının iyi olduğu şekilde modifiye edilerek analizler gerçekleştirildi. Analizler, maksimum UV absorpsiyonunun gerçekleştiği 270 nm ve 330 nm’de yapıldı. Çözücü sistemi olarak fosforik asit:su (0,2:99,8) (A), asetronitril (B) kullanıldı. Analizlerde kullanılan gradient elüsyon sistemi Çizelge 2.5’te verilmiştir.

2.2.4.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Naringenin ve izole edilen klorojenik asit (CS-2) ile sinarozit (CS-1) standart maddelerinden 10’ar mg tartıldı. 10 ml’lik balon jodede bir miktar metanol:su (70:30) ile ultrasonik banyoda çözüldü. Çözeltiler metanol:su (70:30) ile 10 ml’ye tamamlandı. Stok çözeltiden (10 mg/10 ml) dilüsyon yolu ile farklı konsantrasyonlarda 0,625 µg/ml; 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

Luteolinden 5 mg tartıldı. 100 ml’lik balon jodede bir miktar metanol:su (70:30) ile ultrasonik banyoda çözüldü. Çözelti metanol:su (70:30) ile 100 ml’ye

tamamlandı. 50 µg/ml stok çözelti hazırlanmış oldu. Stok çözeltiden dilüsyon yolu ile farklı konsantrasyonlarda 0,625 µg/ml; 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

Apigeninden 10 mg tartıldı. 100 ml'lik balon jojede bir miktar metanol:su (70:30) ile ultrasonik banyoda çözüldü. Çözelti metanol:su (70:30) ile 100 ml'ye tamamlandı. 100 µg/ml stok çözelti hazırlanmış oldu. Stok çözeltiden dilüsyon yolu ile farklı konsantrasyonlarda 0,625 µg/ml; 1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml olacak şekilde standart çözeltiler hazırlandı.

2.2.4.3. Numune Çözeltilerin Hazırlanması

Bitkisel materyal olarak kullanılan *Cynara scolymus*'un kurutulmuş ve toz edilmiş yapraklarından 300 mg tartıldı. Metanol:su (70:30) karışımı ile manyetik karıştırıcıda 15 saat süreyle çözücü sistemi yenilenerek ekstraksiyon yapıldı. Süzülerek balon jojeye alınan süzüntü %70 metanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.4.4. Bitkisel Ürün Çözeltilerinin Hazırlanması

Piyasadan temin edilen ve enginar yaprak ekstresi içeren 6 adet bitkisel ürünün kalite kontrol analizi için HPLC yönteminden yararlanıldı. Bitkisel ürünlerin her birinden 5 adet kapsül alınıp içleri boşaltıldı. Havanda karıştırıldıktan sonra, her birinden 300'er mg tartıldı. Bir miktar %70 metanol ilave edilerek ultrasonik banyoda etkili bileşiklerin çözünmesi sağlandı. Çözelti 0,45 µm çapındaki membran filtreden süzülerek balon jojede %70 metanol ile 100 ml'ye tamamlandı.

Çizelge 2.5. HPLC analizlerinde kullanılan gradient elüsyon sistemi

Zaman (dak)	Hareketli Faz A (%)	Hareketli Faz B (%)	Akış Hızı (ml/dak)
0	94	6	1,2
20	70	30	1,2
25	70	30	1,2

2.2.4.5. HPLC Şartları

HPLC Sistemi	: Agilent 1100 Series G1315 DAD
Kolon	: Supelcosil (250 x 4,6 mm; 5 µm partikül büyüklüğü)
Hareketli Faz A	: %0,2 Fosforik asit içeren su
Hareketli Faz B	: Asetonitril
Akış Tipi	: Gradient Elüsyon
Akış Hızı	: 1,2 ml/dak
Sıcaklık	: 25°C
Enjeksiyon Hacmi	: 10 µl
Dalga Boyu	: 270 nm, 330 nm

2.2.5. Spray Dryer Çalışmaları

Enginar yapraklarından kuru ekstre elde etmek için spray dryer ile çalışıldı. Metanol, etanol ve su ile ayrı ayrı hazırlanan ekstratlar ile kuru ekstre elde etme çalışmalarına başlandı. Bu aşamada amaç en iyi kalitede tozun hangi çözücü ile yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edildiğini görmektir. Her denemede alınan veriler bir sonraki analiz için değerlendirildi. Her analizde yalnızca bir parametre değiştirilerek en iyi kalitede toz elde edilmeye çalışıldı.

İlk denemelerin ardından sulu ekstrelerden daha iyi sonuç alındığı görüldü, kalite ve verim artırma çalışmalarına sulu ekstrelerle devam edildi.

Sulu ekstreler ile yapılan birçok denemenin sonunda istenen kalitede kuru toz elde edilemeyince çeşitli çözüm yolları arandı. Bunun için öncelikle bitkinin kimyasal içeriği göz önüne alındı. Bitkide bulunan ve analizi olumsuz etkileyen bazı maddeler elimine edilirse daha sağlıklı sonuç alınabileceği düşünüldü. Bu amaçla yapraklara petrol eteriyle ön ekstraksiyon uygulandı. Soxhlet ekstraktörü yardımıyla 8 saat süreyle ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ardından manyetik karıştırıcıda 3 saat süreyle su ile ekstraksiyon yapıldı. Buna benzer ön ekstraksiyon çalışmalarında da istenen kalitede toz elde edilemeyince kaydırıcı maddelerden yararlanılmasına karar verildi ve bu amaçla laktoz kullanıldı.

Yapılan çalışmaların neticesinde ön ekstraksiyon işlemi uygulamanın ve kaydırıcı kullanımının gerekli olduğu sonucuna varıldı.

Sonuç olarak analiz için 10 g enginar yaprağı tartıldı. Soxhlet ekstraksiyonuyla petrol eteri kullanılarak 8 saat ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ardından manyetik karıştırıcıda 3 saat su ile ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen 100 ml sulu ekstreye 2 g laktoz ilave edilip spray dryer'a uygulandı.

Spray Dryer Şartları

Cihaz	: Büchi B290 Mini Spray Dryer
Dahili Sıcaklık	: 100°C
Aspiratör Durumu	: %100
Pompa Ayarı (Basınç)	: %40 (12 ml/dak)
Nozzle Akış Hızı Oranı	: 25 (nozzle skalasında)

3. BULGULAR

3.1. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. Ekstraksiyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Total ekstre hazırlama yöntemine karar verebilmek amacıyla denenmiş farklı ekstraksiyon teknikleri sonucunda elde edilen ekstre verimleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Cynara scolymus* yapraklarına uygulanan farklı ekstraksiyon yöntemlerine ait ekstrelerin verimleri

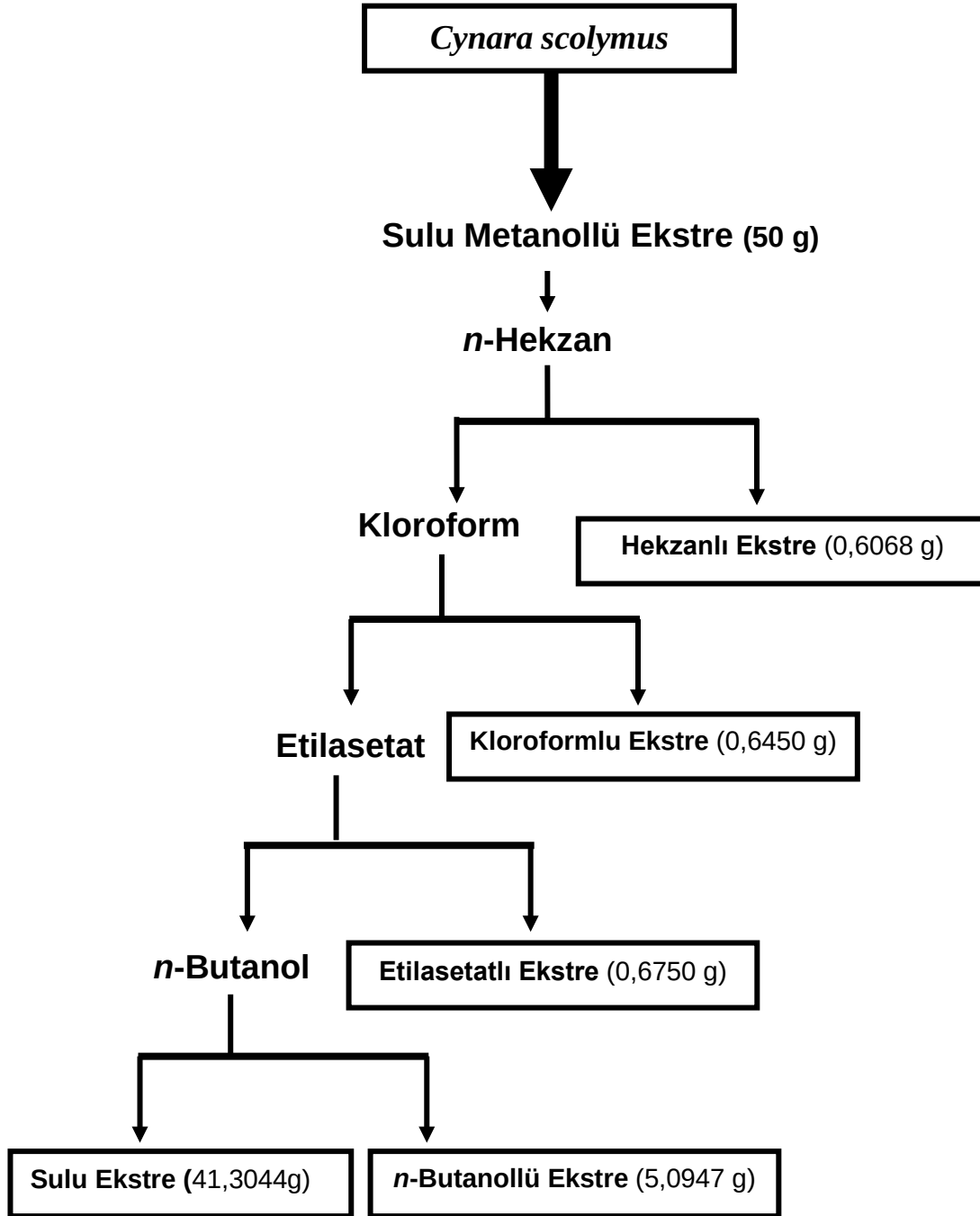
Yöntem	Ekstre Miktarı (g)	Verim (%)
Perkolasyon	4,9247 g	24
Hareketli Maserasyon	5,4811 g	27
Soxhlet Ekstraksiyonu	2,4516 g	12

3.1.2. Metanol-Su Ekstresine Ait Bulgular

Cynara scolymus’un yapraklarından (750 g) metanol:su (70:30) ile hareketli maserasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan total ekstrenin miktarı 199,37 g; verimi ise %26,58 olarak bulundu.

3.1.3. Metanol-Su Ekstresinin Fraksiyonlandırılmasına Ait Bulgular

Cynara scolymus'un yapraklarından hazırlanan sulu metanollü ekstreden elde edilen *n*-hekzan, kloroform, etilasetat, *n*-butanol ve sulu fraksiyonların miktarları Şekil 3.1'de verilmiştir.

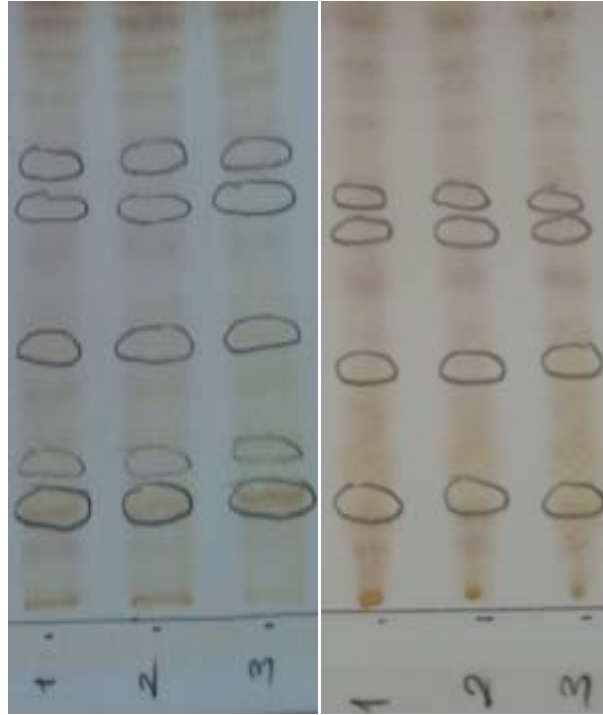


Şekil 3.1. *Cynara scolymus*'tan sulu metanollü ekstraksiyonla elde edilen ekstrenin fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen ekstratlar ve miktarları

3.2. Kromatografik Bulgular

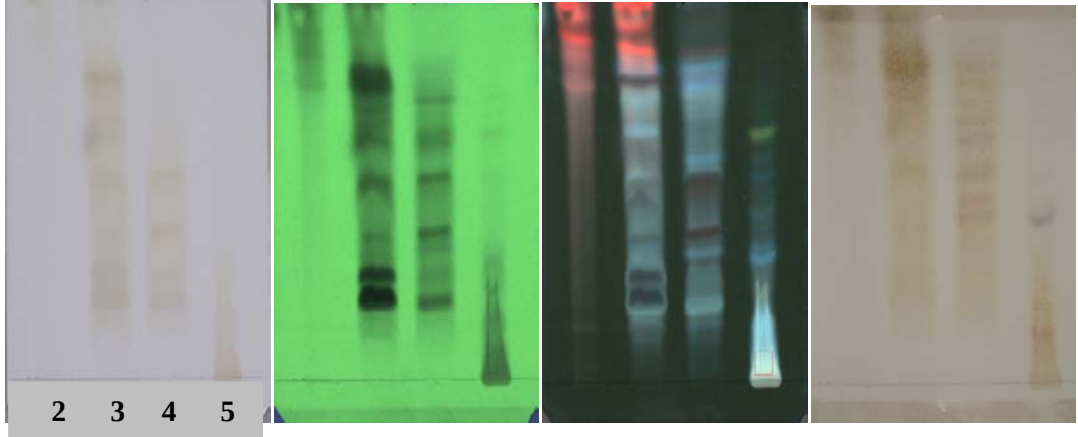
3.2.1. İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

Cynara scolymus yapraklarından farklı ekstraksiyon teknikleriyle hazırlanan ekstreler üzerinde İTK incelemeleri yapıldı. Ayrımın iyi olduğu çözücü sistemi 2'deki İTK sonuçları Şekil 3.2'de sırasıyla Perkolasyon (1), Hareketli Maserasyon (2) ve Soxhlet Ekstraksiyonu (3) şeklinde numaralandırılarak gösterilmiştir.

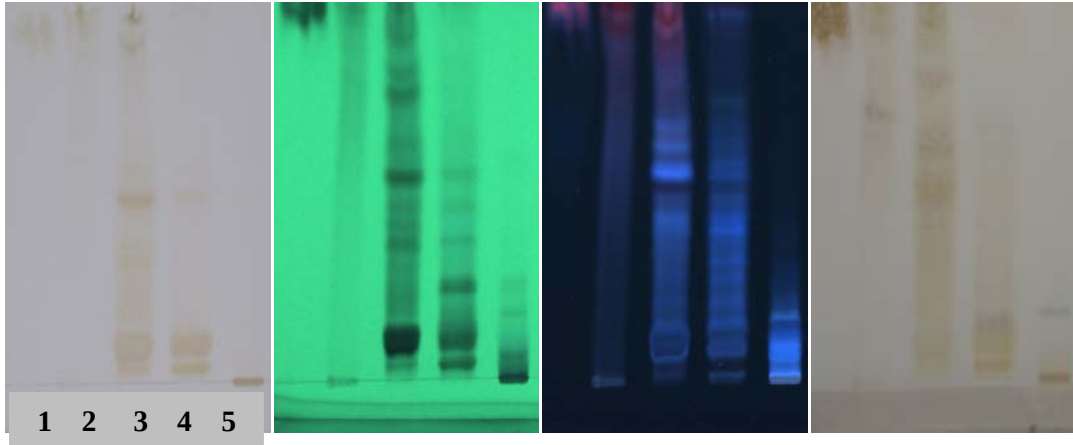


Şekil 3.2. *Cynara scolymus*'tan farklı ekstraksiyon teknikleri ile hazırlanan ekstrelerin çözücü sistemi 2'de Vanilin/ H_2SO_4 ile muamele sonrası İTK kromatogramları

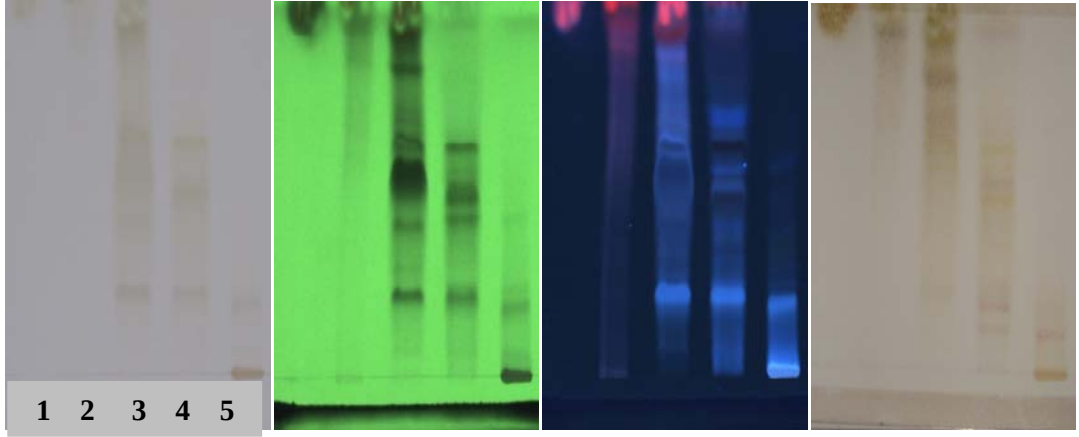
Cynara scolymus'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların İTK analizi yapıldı. Fraksiyonların çözücü sistemi 2, 3, 4 ve 5 ile yapılan İTK sonuçları Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da sırasıyla *n*-hekzanlı fraksiyon (1), kloroformlu fraksiyon (2), etilasetatlı fraksiyon (3), *n*-butanollü fraksiyon (4) ve sulu fraksiyon (5) şeklinde numaralandırılarak gösterilmiştir.



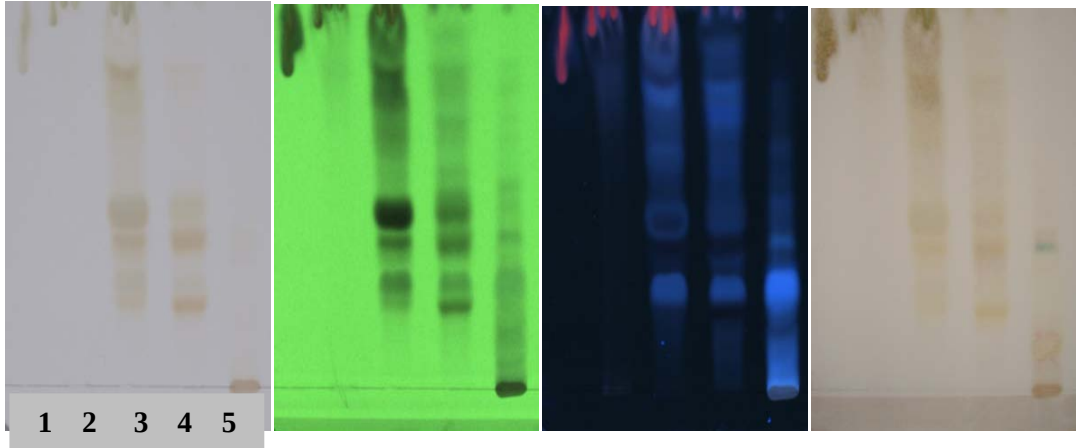
Şekil 3.3. *Cynara scolymus*'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 2'de sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H₂SO₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları



Şekil 3.4. *Cynara scolymus*'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 3'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H₂SO₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları



Şekil 3.5. *Cynara scolymus*'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 4'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H₂SO₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları



Şekil 3.6. *Cynara scolymus*'un sulu metanollü ekstresinden elde edilen fraksiyonların çözücü sistemi 5'te sırasıyla gün ışığında, UV 254 nm'de, UV 366 nm'de ve Vanilin/H₂SO₄ ile muamele sonrası İTK kromatogramları

3.2.2. Kolon Kromatografisi Bulguları

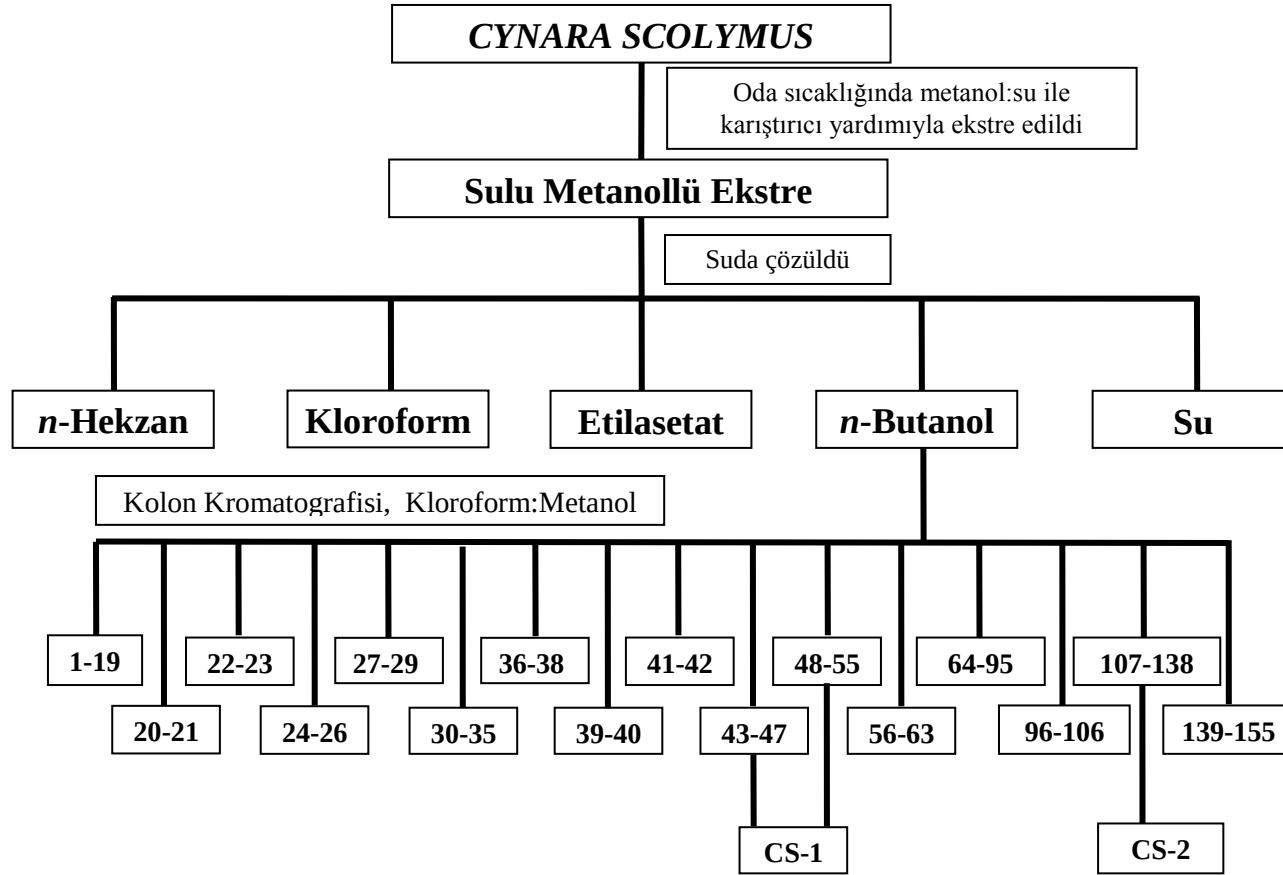
Cynara scolymus yapraklarından oda sıcaklığında hazırlanan sulu metanollü ekstreden elde edilen *n*-butanol fraksiyonundan kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar ve elüsyon için kullanılan çözücülerin oranları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kolon kromatografisinde elde edilen fraksiyonlar ve kullanılan çözücü oranları

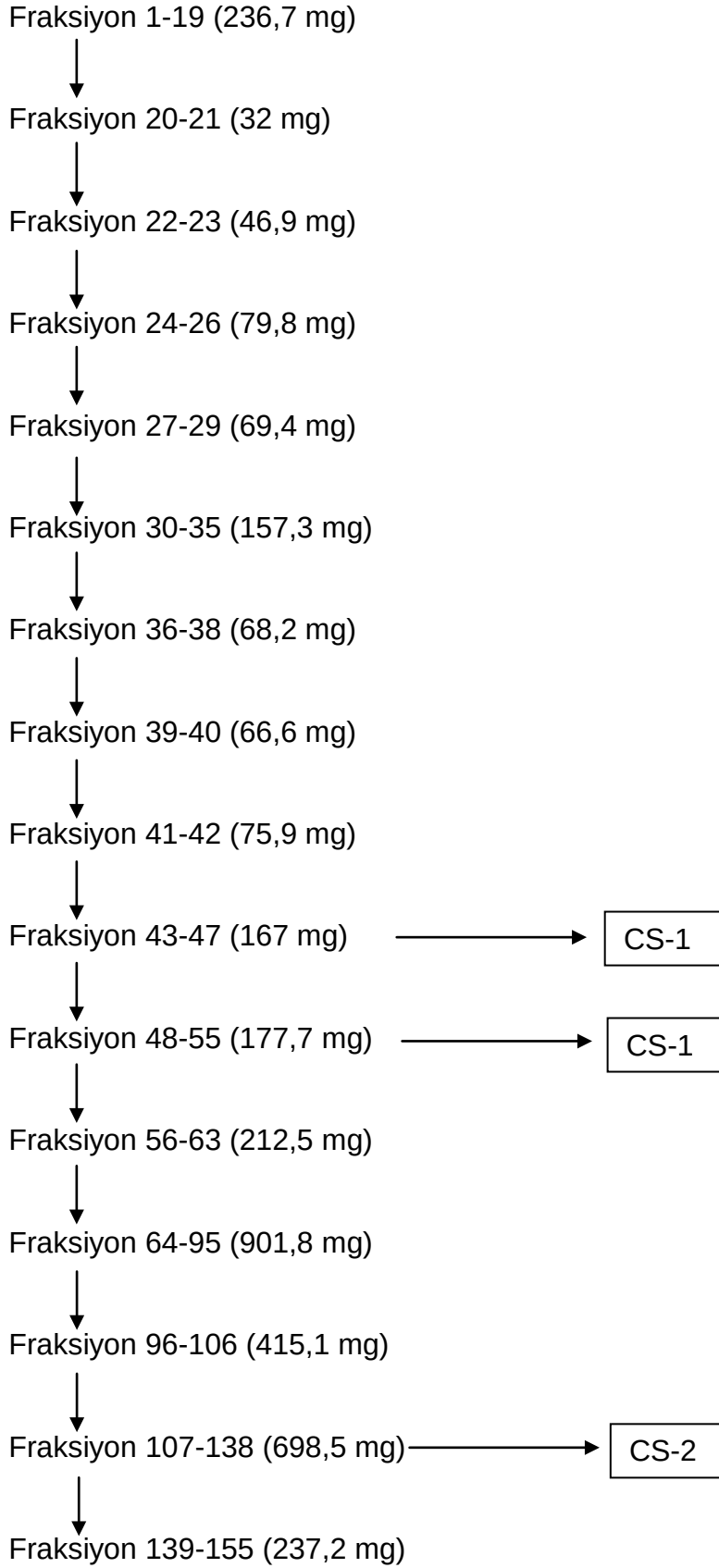
Fraksiyon	Çözücü Oranları
1-9	Kloroform
10-18	Kloroform:Metanol (95:5)
19-38	Kloroform:Metanol (90:10)
39-62	Kloroform:Metanol (85:15)
63-77	Kloroform:Metanol (82,5:17,5)
78-88	Kloroform:Metanol (80:20)
89-99	Kloroform:Metanol (75:25)
100-107	Kloroform:Metanol (70:30)
108-120	Kloroform:Metanol (60:40)
121-132	Kloroform:Metanol (50:50)
133-141	Kloroform:Metanol (40:60)
142-149	Kloroform:Metanol (20:80)
150-155	Metanol

3.2.3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi Bulguları

Kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların içerdikleri bileşikler İTK ve HPLC ile incelendikten sonra aynı bileşikleri içeren fraksiyonlar birleştirildi. Birleştirmeden sonra elde edilen fraksiyonlar preparatif ince tabaka kromatografisi ile Bölüm 2.2.2.3'te anlatıldığı şekilde temizlenerek saflaştırıldı, CS-1 ve CS-2 olarak kodlandırılan bileşikler izole edildi (Şekil 3.7; Şekil 3.8).



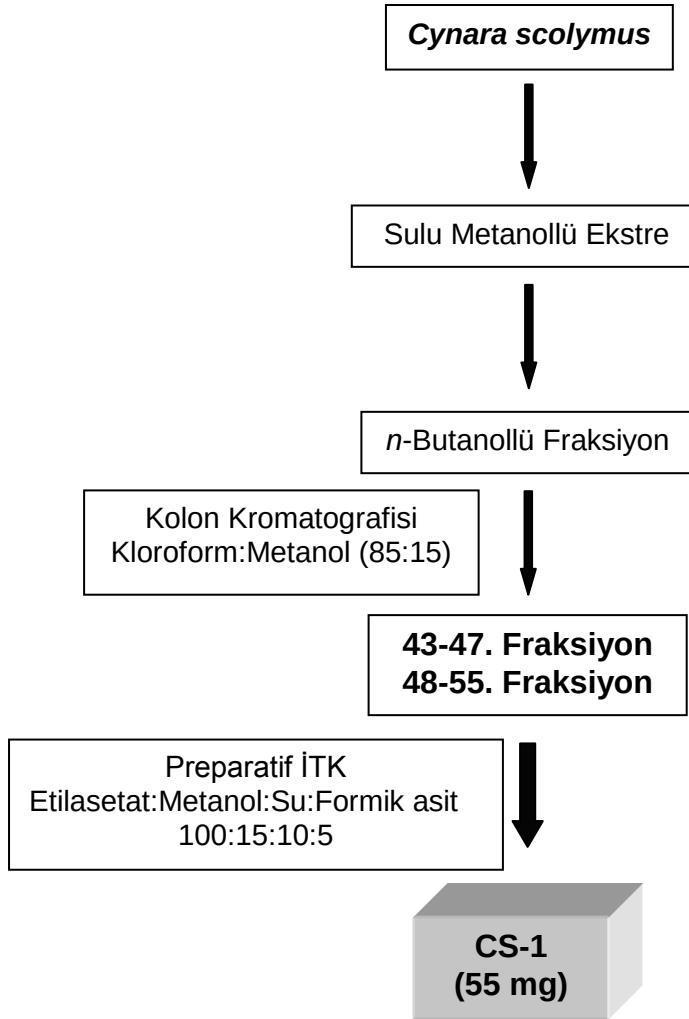
Şekil 3.7. Sıvı-sıvı ekstraksiyon ve kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların şematik gösterimi



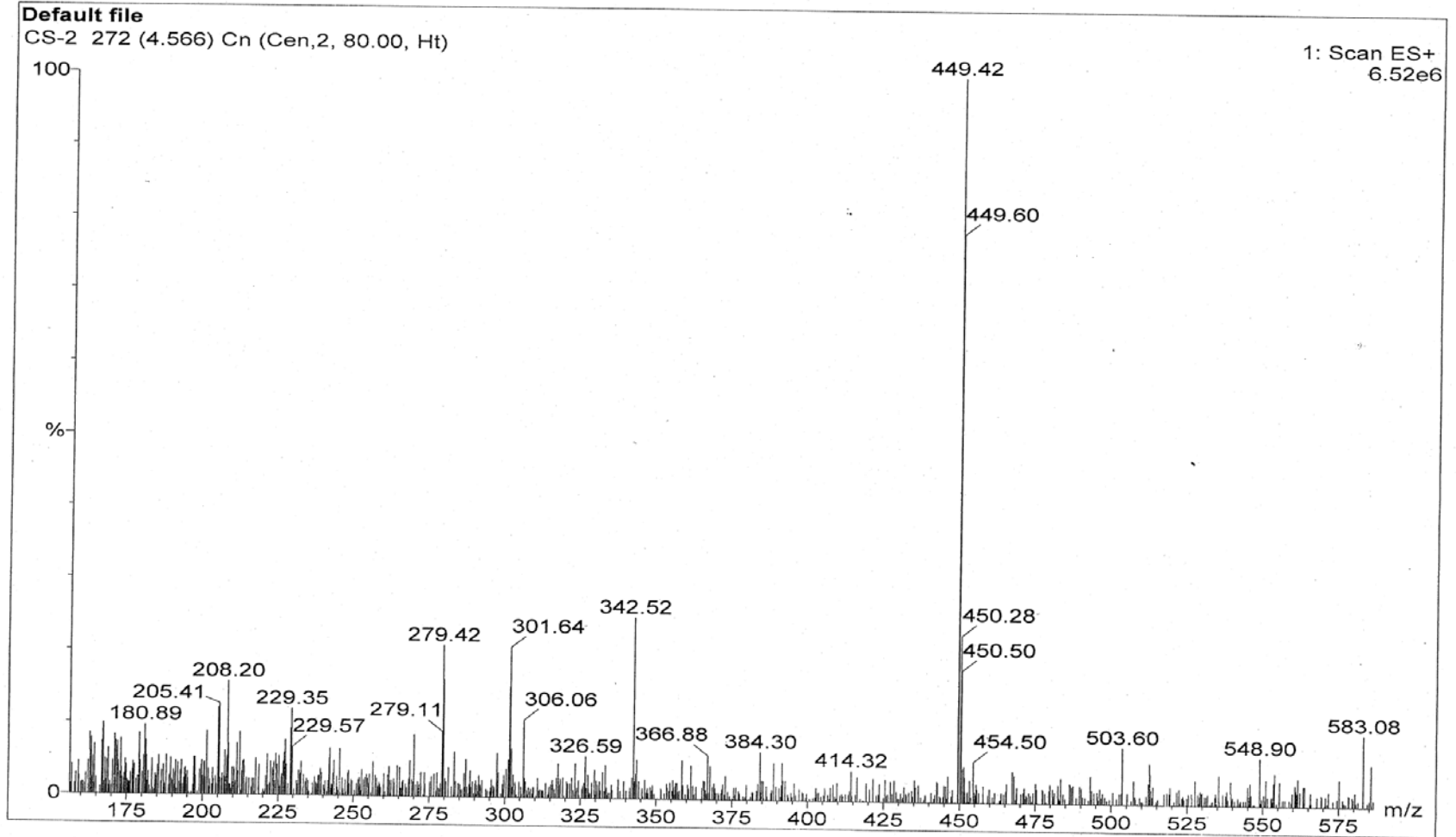
Şekil 3.8. *n*-Butanollü fraksiyondan kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlar ve izole edilen maddeler

3.3. İzole Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini Bulguları

3.3.1. CS-1 Bileşiğinin Yapı Tayini



Şekil 3.9. CS-1 bileşiğinin izolasyon şeması



Şekil 3.10. CS-1 bileşiğinin ES MS spektrumu

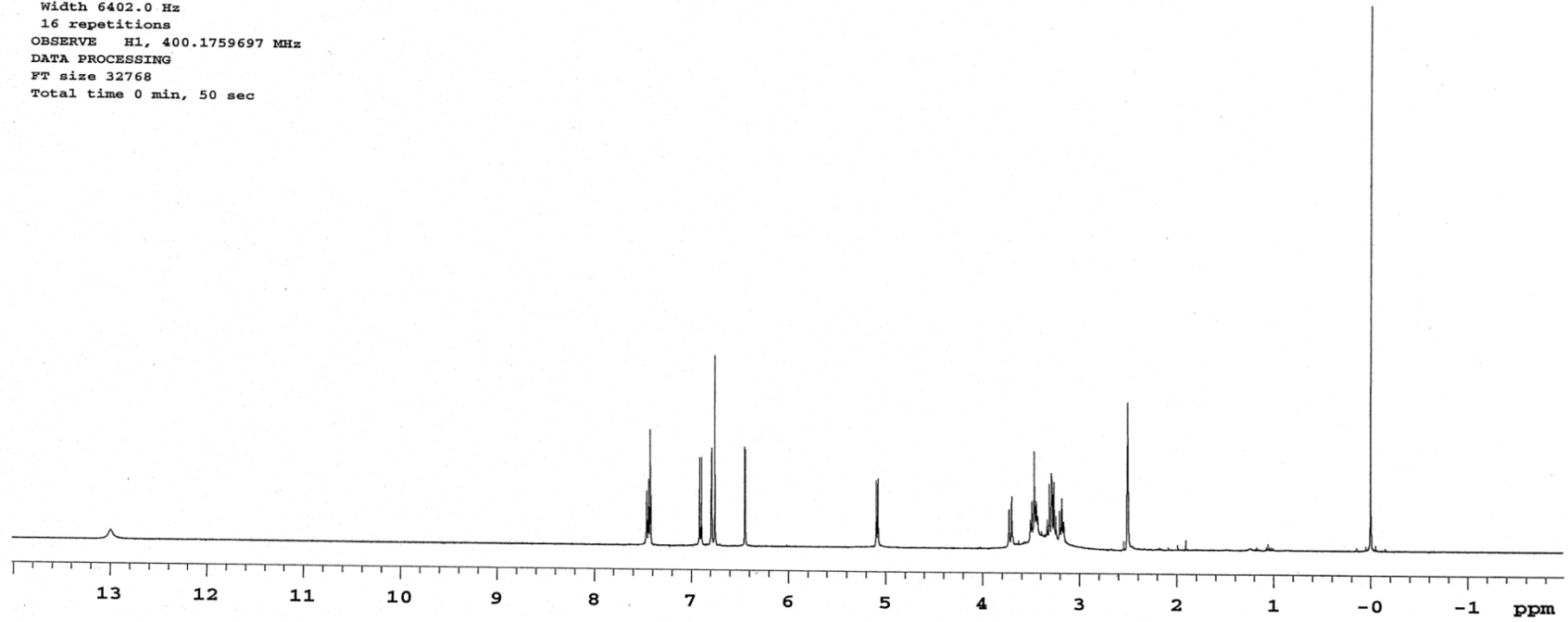
CS-2_20Nov2009

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: CS-2_20Nov2009
File: PROTON

Pulse Sequence: s2pul

Solvent: DMSO
Temp. 22.0 C / 295.1 K
Mercury-400BB "mercury400"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.992 sec
Width 6402.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 400.1759697 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 50 sec



Şekil 3.11. CS-1 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

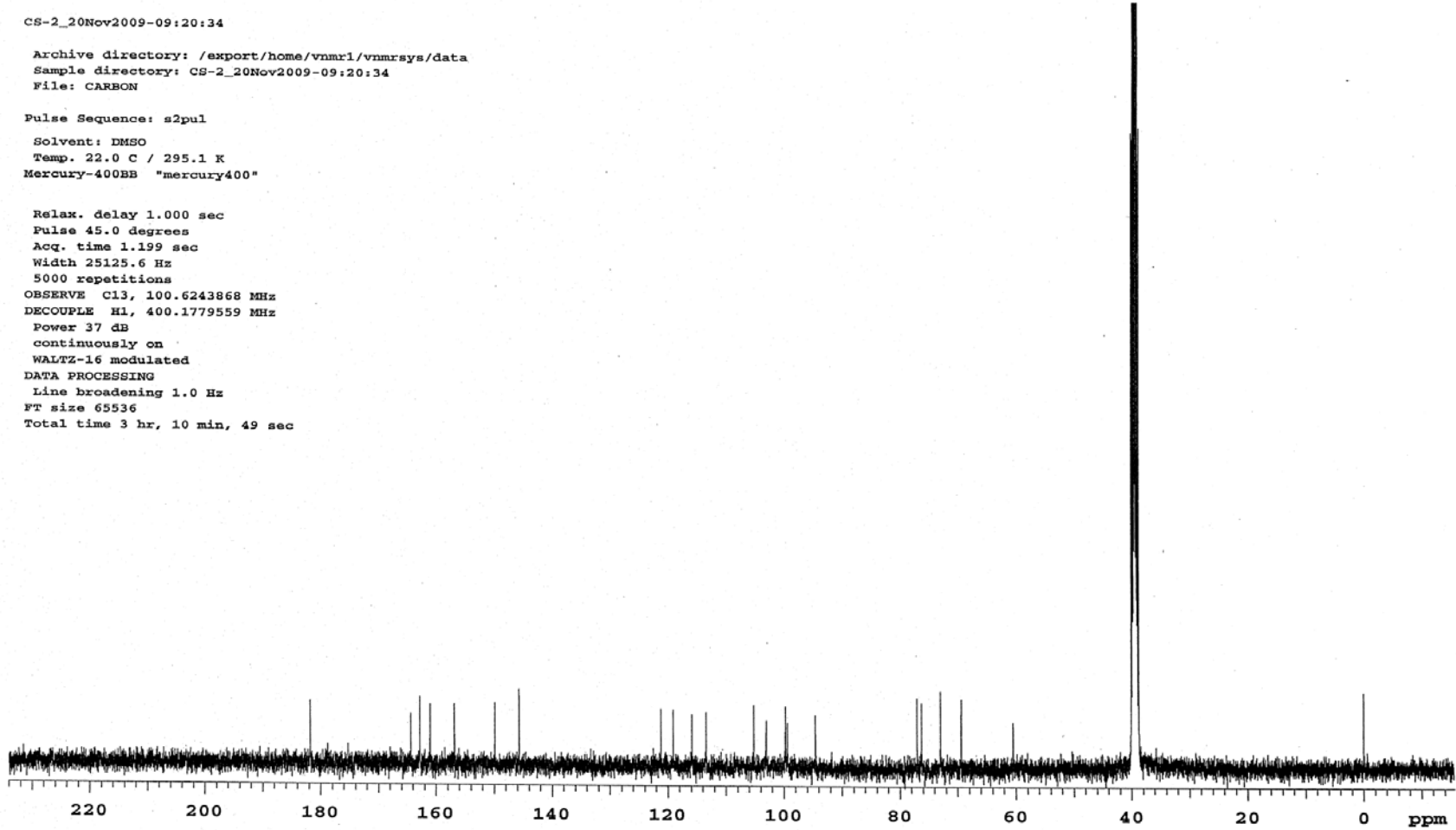
CS-2_20Nov2009-09:20:34

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: CS-2_20Nov2009-09:20:34
File: CARBON

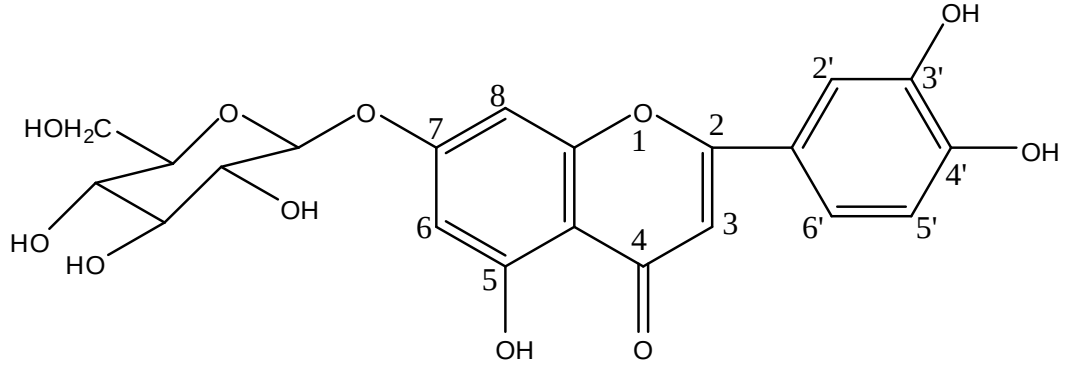
Pulse Sequence: s2pul

Solvent: DMSO
Temp. 22.0 C / 295.1 K
Mercury-400BB "mercury400"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.199 sec
Width 25125.6 Hz
5000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6243868 MHz
DECOUPLE H1, 400.1779559 MHz
Power 37 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 3 hr, 10 min, 49 sec



Şekil 3.12. CS-1 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

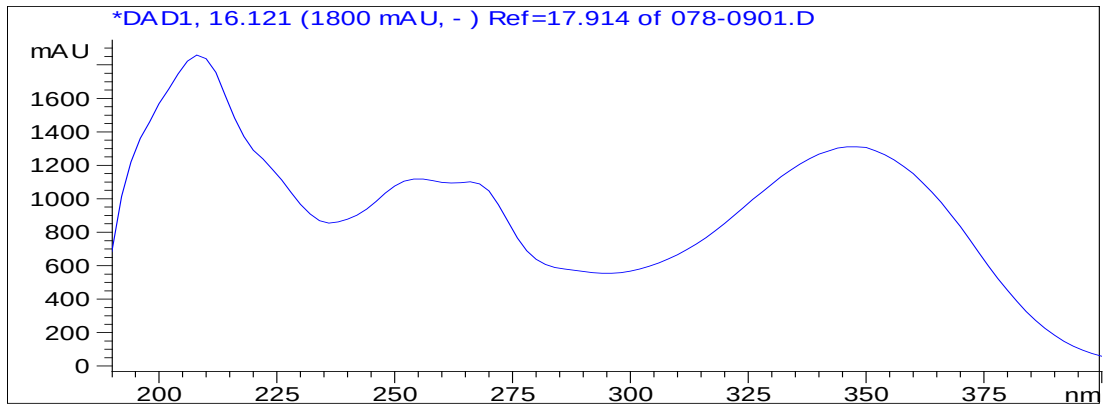
Formülü

Molekül Adı	: Luteolin-7-glukopiranozit (Sinarozit)
Molekül Ağırlığı	: ESMS $[M]^+$, m/z 449,2
Molekül Formülü	: $C_{21}H_{20}O_{11}$
Özelliği	: Sarı amorf toz

Çizelge 3.3. CS-1 bileşiğinin 1H ve ^{13}C -NMR bulguları

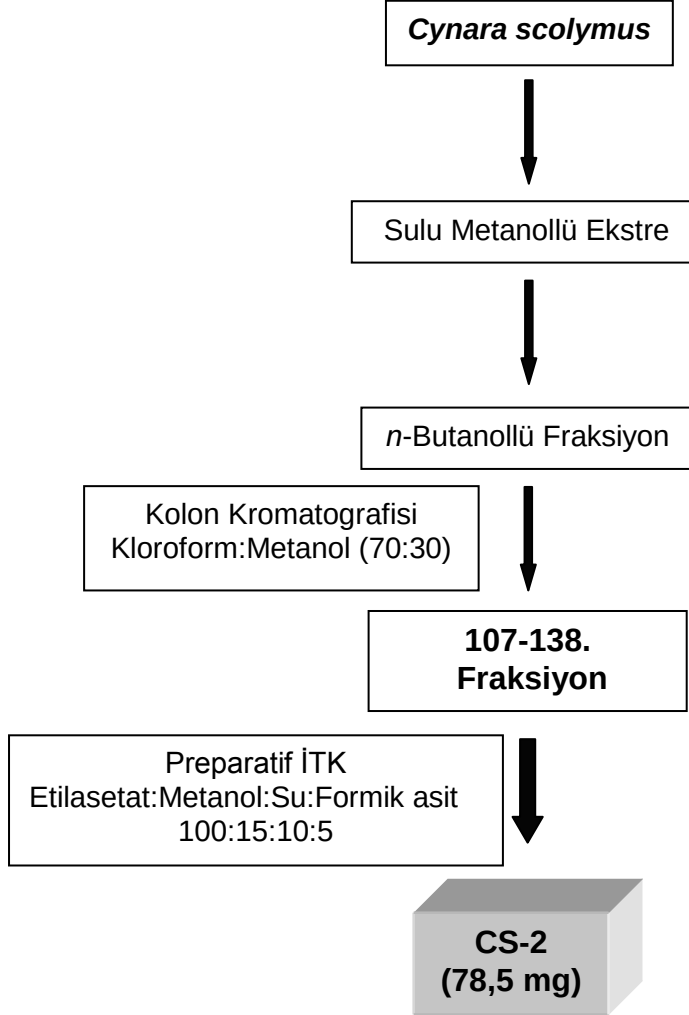
Kimyasal Kayma	Proton	C atomu	δ (ppm)
-	-	C-1	-
-	-	C-2	164,4
6,75 (1H, s)	H-3	C-3	103,0
-	-	C-4	181,8
-	-	C-5	161,0
6,45 (1H, d; $J = 2$)	H-6	C-6	99,7
6,79 (1H, d; $J = 2$)	H-8	C-7	162,8
-	-	C-8	94,6
-	-	C-9	156,8
-	-	C-10	105,2
7,42 (1H, d; $J = 2$)	H-2'	C-1'	121,2
-	-	C-2'	113,4
6,90 (1H, d; $J = 8$)	H-5'	C-3'	145,7
7,46 (1H, dd; $J = 2;8$)	H-6'	C-4'	149,9
-	-	C-5'	115,8
5,08 (1H, d; $J = 6,6$)	glukoz	C-6'	119,0
3,16-3,72 (m)	protonları	C-1"	99,4
-	-	C-2"	72,9
-	-	C-3"	76,3
-	-	C-4"	69,4
-	-	C-5"	77,0
-	-	C-6"	60,4

Sarı renkli, amorf toz görünümünde olan CS-1'in UV₂₅₄'te açık sarı, UV₃₆₆'da koyu sarı renk verdiği gözlenmiştir. Vanilin/sülfürik asit reaktifi ile 105°C'de ısıtılınca sarı turuncu renk gözlenmiş, rengin zamanla kahverengiye dönmesi bileşiğin flavonoit olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil 3.13) flavonoit yapısının sînnamoil sistemi (Bant I 350 nm) ve benzoil sistemi (Bant II 254 nm, 270 nm sh) için iki absorpsiyon bandı gözlenmektedir. 254 nm'de görülen bölünme ise 3' ve 4' konumlarında oksijen fonksiyonlu grubunun olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin DMSO içinde alınan ¹H-NMR spektrumunda δ 13.0'da görülen genişlemiş singlet, C-5 konumundaki hidroksil grubunun varlığını doğrulamaktadır. Aynı zamanda 7,46 [(1H, dd; J = 2; 8)]; 7,42 [(1H, d; J = 2)] ppm'lerde görülen sinyallerin H-6' ve H-2' aromatik protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. Luteolin tipi bu protonlar 3' ve 4' disübstitüe benzen halkası için karakteristik olduğundan bileşiğin bu konumlarında sübstitüent taşıdığına karar verilmiştir. ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları yardımı ile tespit edilen rezonanslar literatür verileri ile karşılaştırıldığında aglikonun luteolin olduğu, MS spektrumunda moleküler iyon pikinin 449'da çıkması nedeni ile de bileşiğin luteolin-7-glukopiranozit olduğu doğrulanmıştır (Wang ve ark., 2003).

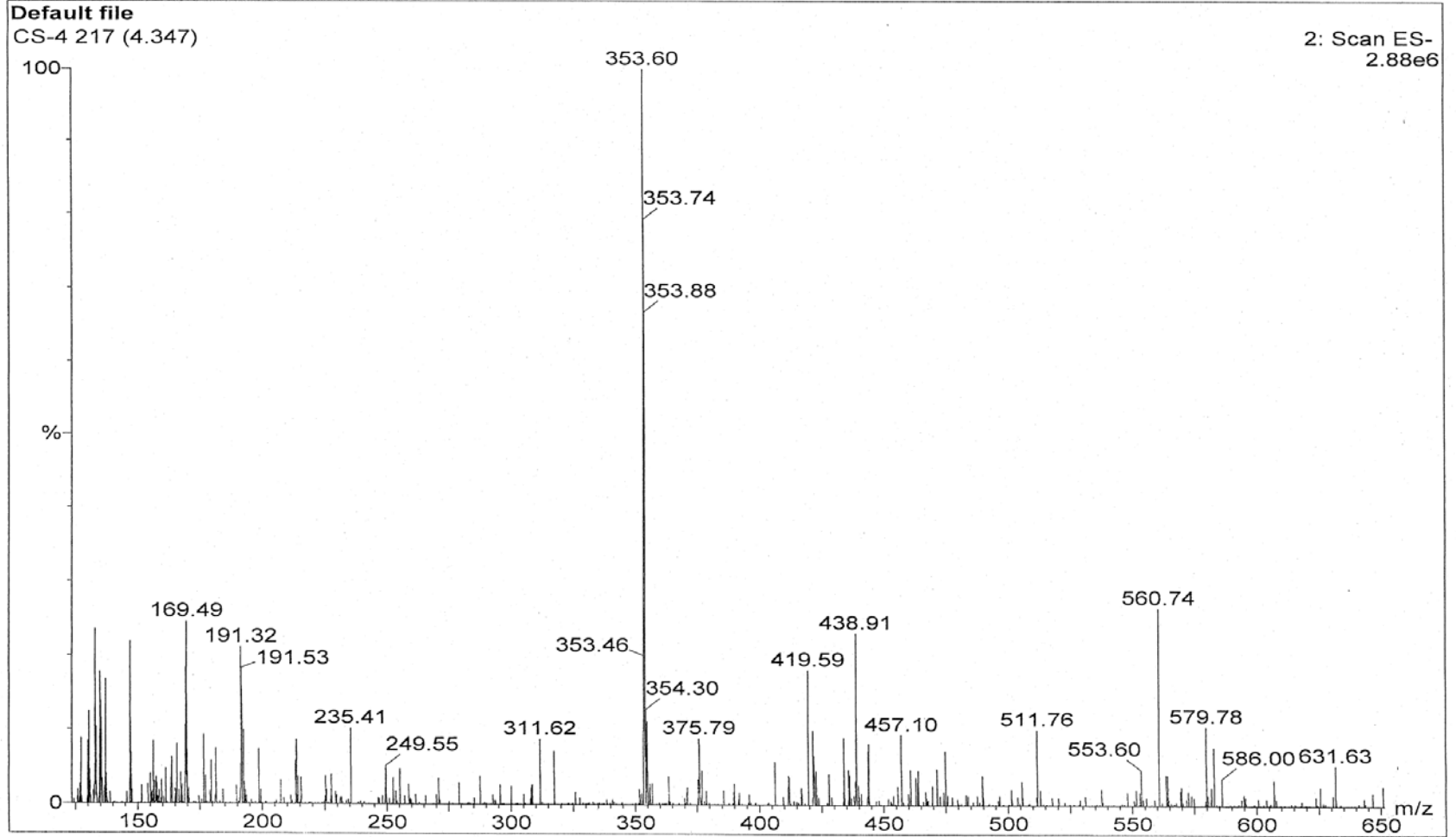


Şekil 3.13. CS-1 bileşiğine ait UV spektrumu

3.3.2. CS-2 Bileşığının Yapı Tayini



Şekil 3.14. CS-2 bileşığının izolasyon şeması



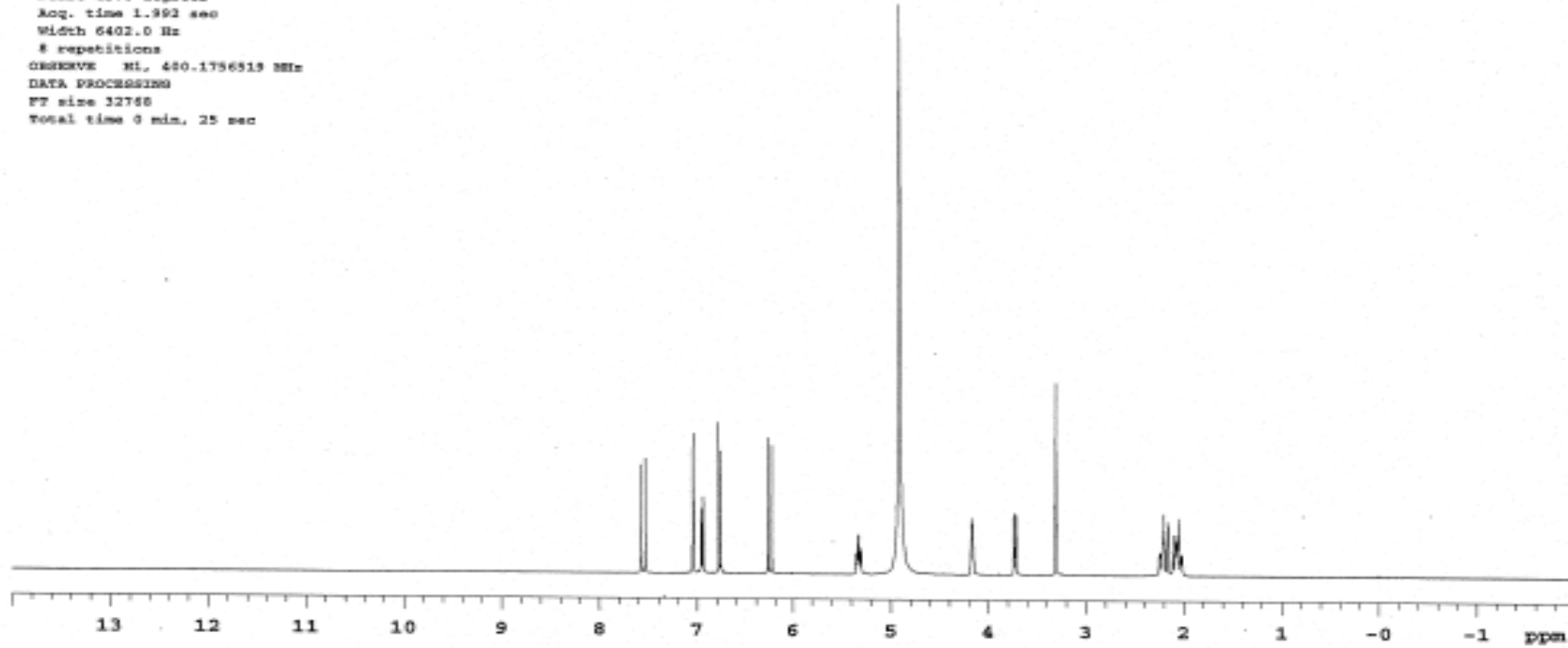
Şekil 3.15. CS-2 bileşiğinin ES MS spektrumu

CS-4_22Dec2009-15:04:18

Archive directory: /export/home/vnmr5/vnmrsw/data
Sample directory: CS-4_22Dec2009-15:04:18
File: PROTON

Pulse Sequence: zgpg30
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Mercury-400SD "mercury400"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.992 sec
Width 6402.0 Hz
repetitions
GHSERVE ML, 480.1756519 MHz
DATA PROCESSING
FT size 32768
Total time 0 min, 25 sec



Şekil 3.16. CS-2 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

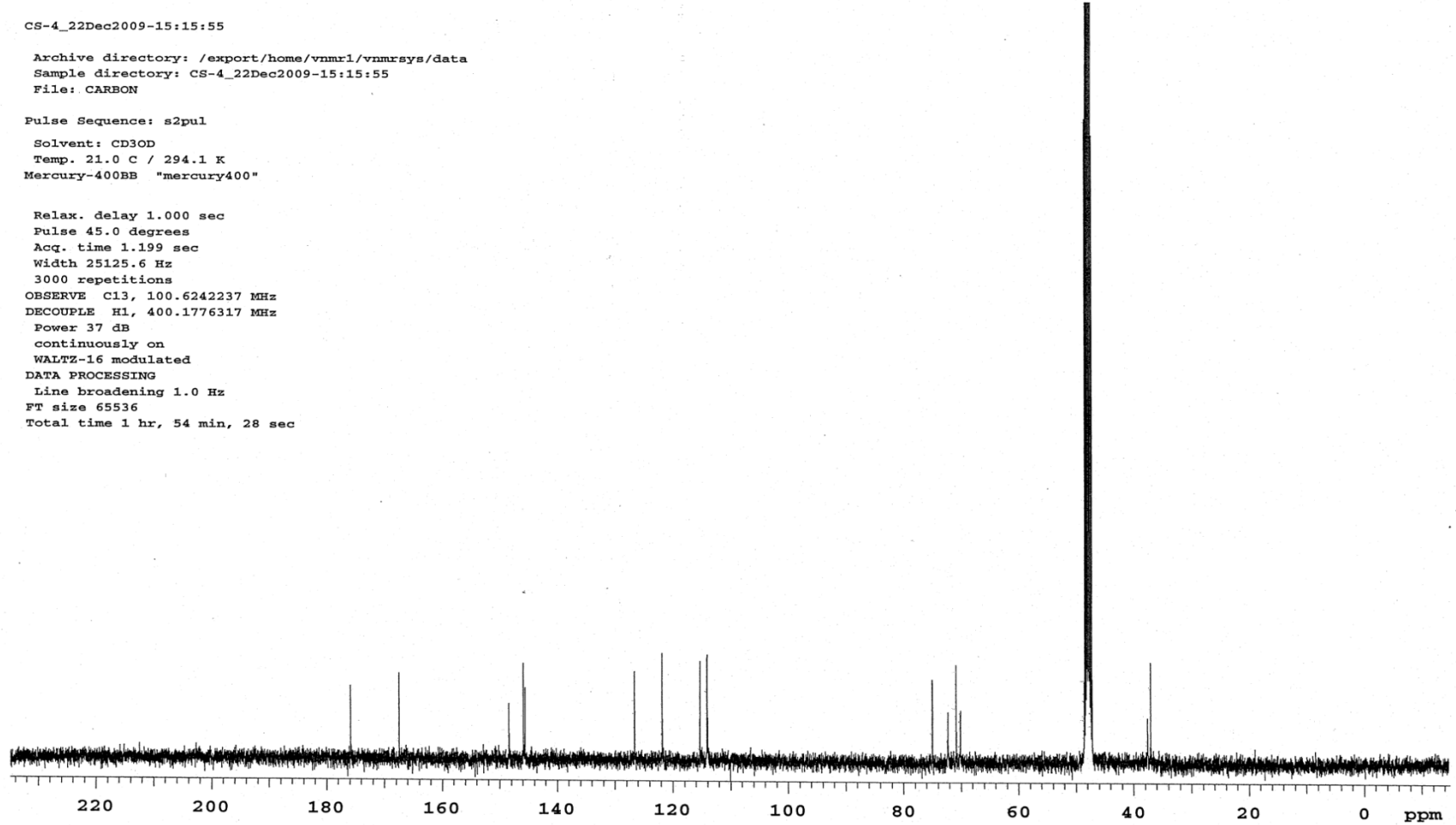
CS-4_22Dec2009-15:15:55

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrsys/data
Sample directory: CS-4_22Dec2009-15:15:55
File: CARBON

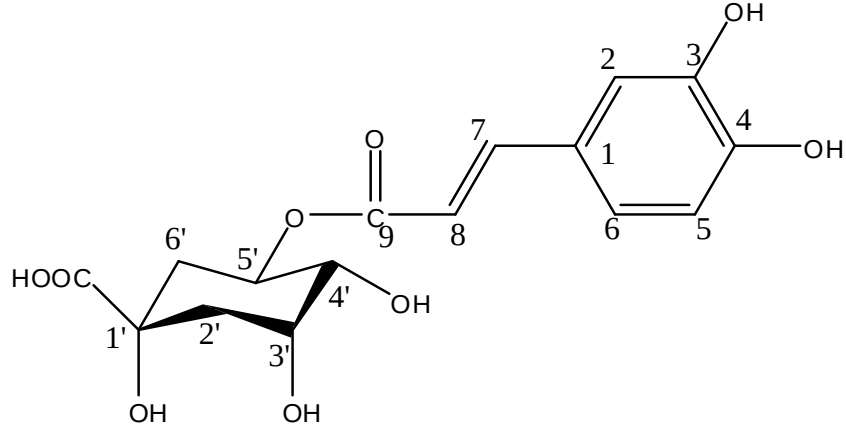
Pulse Sequence: s2pul

Solvent: CD3OD
Temp. 21.0 C / 294.1 K
Mercury-400BB "mercury400"

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.199 sec
Width 25125.6 Hz
3000 repetitions
OBSERVE C13, 100.6242237 MHz
DECOUPLE H1, 400.1776317 MHz
Power 37 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 54 min, 28 sec



Şekil 3.17. CS-2 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Formülü

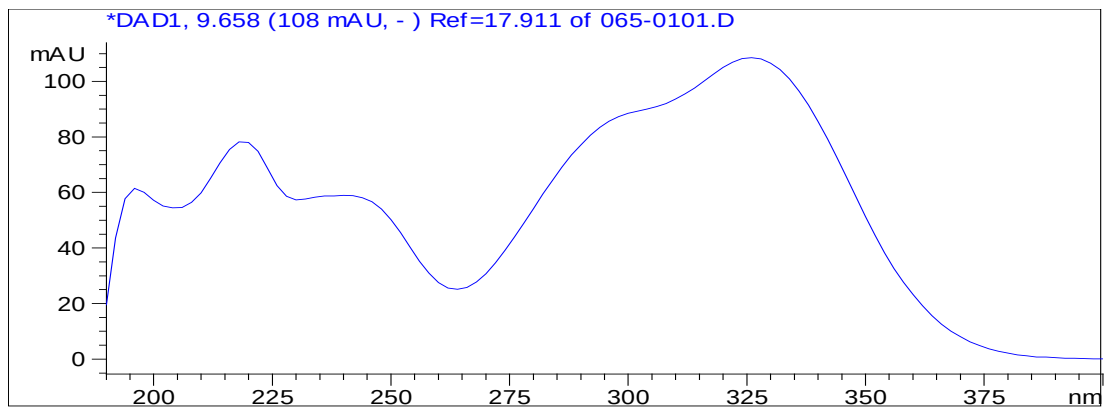
Molekül Adı	: Klorojenik asit
Molekül Ağırlığı	: ESMS [M] ⁻ , <i>m/z</i> 353,60
Molekül Formülü	: C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Özelliği	: Beyaz amorf toz

Çizelge 3.4. CS-2 bileşiğinin ¹H ve ¹³C-NMR bulguları

Kimyasal Kayma	Proton	C atomu	δ (ppm)
-	-	C-1	126,5
7,04 (d; <i>J</i> = 2)	H-2	C-2	114,0
-	-	C-3	145,9
-	-	C-4	148,3
6,77 (d; <i>J</i> = 8)	H-5	C-5	115,2
6,95 (dd; <i>J</i> = 2; 8,4)	H-6	C-6	121,8
7,55 (d; <i>J</i> = 15,6)	H-7	C-7	145,6
6,26 (d; <i>J</i> = 15,6)	H-8	C-8	114,0
-	-	C-9	167,4
-	-	C-1'	74,9
2,05 (2H, d, <i>J</i> = 8)	H-2'	C-2'	37,0
4,16 (d, <i>J</i> = 3,0)	H-3'	C-3'	70,0
3,72 (dd; <i>J</i> = 3,2; 8,4)	H-4'	C-4'	72,2
5,32 (m)	H-5'	C-5'	70,7
2,15 (1H, d, <i>J</i> = 11,3)	H-6'	C-6'	37,5
2,23 (1H, d, <i>J</i> = 11,5)	-	-	-
-	-	C-7'	175,8

Beyaz renkli, amorf toz görünümünde olan CS-2'nin UV spektrumu fenolik yapıyı göstermektedir (Şekil 3.18). Bileşiğin dötoro metanolde alınan ^1H -NMR spektrumunda gözlenen δ 7,04 [d; $J = 2$], 6,95 [dd; $J = 2; 8,4$], 6,77 [d; $J = 8$] sinyalleri trisüstitüe benzen halkasının varlığını göstermektedir. δ 7,55 ve 6,26'da gözlenen dubletler olefinik protonları; ^{13}C -NMR spektrumunda görülen δ 168,6'daki sinyal ise bir karboksil grubunun varlığını işaret etmektedir ki bu bulgular birleştirildiğinde kafeik asitin varlığı ortaya konmaktadır. Diğer taraftan ^{13}C -NMR spektrumunda δ 177,02'de gözlenen sinyal bir başka karboksil grubunun varlığını göstermektedir. ^1H -NMR spektrumunda δ 2,05 [2H, d, $J = 8$], 2,15 [1H, d, $J = 11,3$] ve 2,23 [1H, d, $J = 11,5$] de görülen üç metin protonu ve δ 3,72 [dd; $J = 3,2; 8,4$], 4,16 [d, $J = 3,0$] ve 5,32 [m] sinyallerinin ise kinik asit parçasına ait olduğu tespit edildi. Bu sinyalleri ^{13}C -NMR spektrumunda gözlenen δ 37,0; 37,5; 74,3; 70,7 ve 72,7 sinyallerinin de desteklediği görüldü. MS spektrumunda ise m/z 354 olarak görülmektedir.

Bu sonuçlar ve literatür verileri ışığında CS-2 bileşiğinin yapısı klorojenik asit olarak aydınlatıldı (Saraçoğlu ve ark., 2000; Dürüst ve ark., 2001; Jin ve ark, 2005).



Şekil 3.18. CS-2 bileşiğine ait UV spektrumu

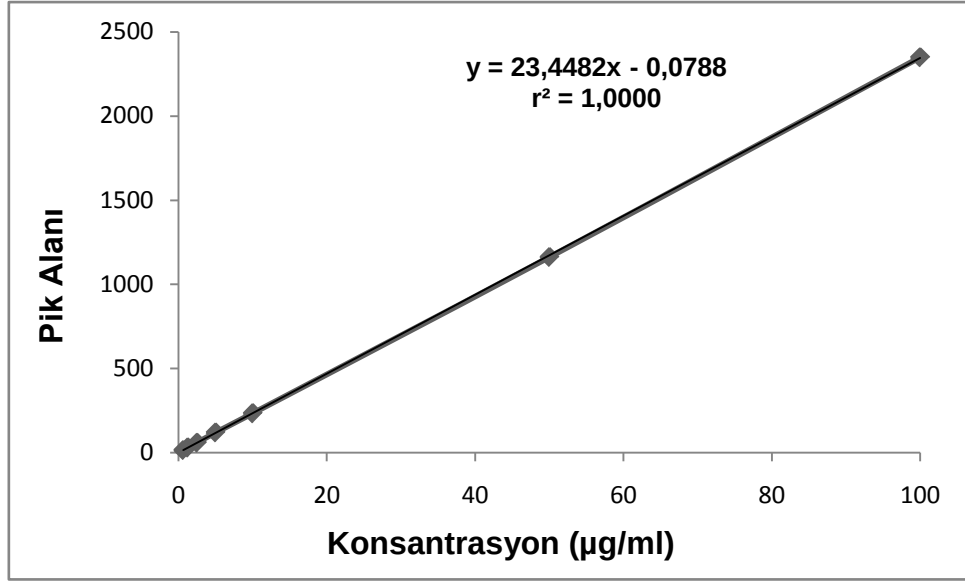
3.4. HPLC ile Kalite Kontrol Çalışmalarına Ait Bulgular

3.4.1. Standart Çözeltiler ile Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

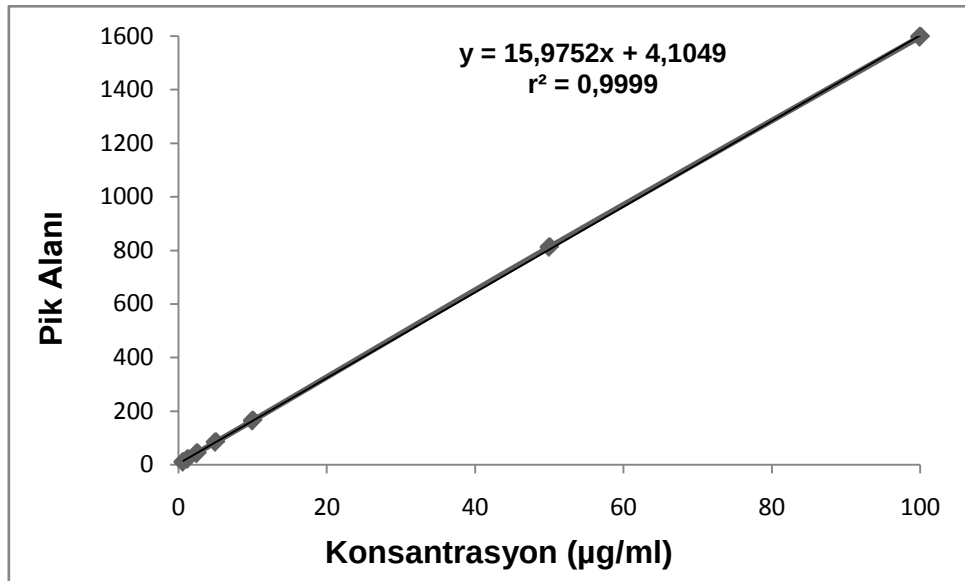
Cynara scolymus'tan CS-1 (luteolin-7-glukopiranozit) (sinarozit) ve CS-2 (5-kafeoilkinik asit) (klorojenik asit) bileşikleri izole edildi. İzole edilen CS-1, CS-2 bileşiklerinin ve standart madde olarak kullanılan apigenin, luteolin, naringenin ve klorojenik asitin, yaprakta ve enginar yaprak ekstresi içeren bitkisel ürünlerde HPLC ile kalite kontrol analizleri yapıldı. İzole edilen bileşiklerin ve standart maddelerin bitkisel ürünlerdeki miktar tayini için kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Standart maddelerin farklı konsantrasyonlarına karşı (x eksen, $\mu\text{g/ml}$), her bir konsantrasyondaki pik alanları bulunarak (y eksen) kalibrasyon eğrileri çizildi. Her bir bileşik için kalibrasyon aralığının belirlenmesinde bileşiklerin bitkisel ürünlerdeki konsantrasyonları dikkate alındı.

İzole edilen klorojenik asit ve sinarozit ile naringenin kalibrasyon grafikleri için Bölüm 2.2.4.2'de hazırlanışı verilen 1 mg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiler seyreltilerek 0,625 $\mu\text{g/ml}$; 1,25 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında enjeksiyonlar yapıldı. Bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri, denklemler ve regresyon katsayıları (r^2) Şekil 3.19, Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'de verilmiştir.

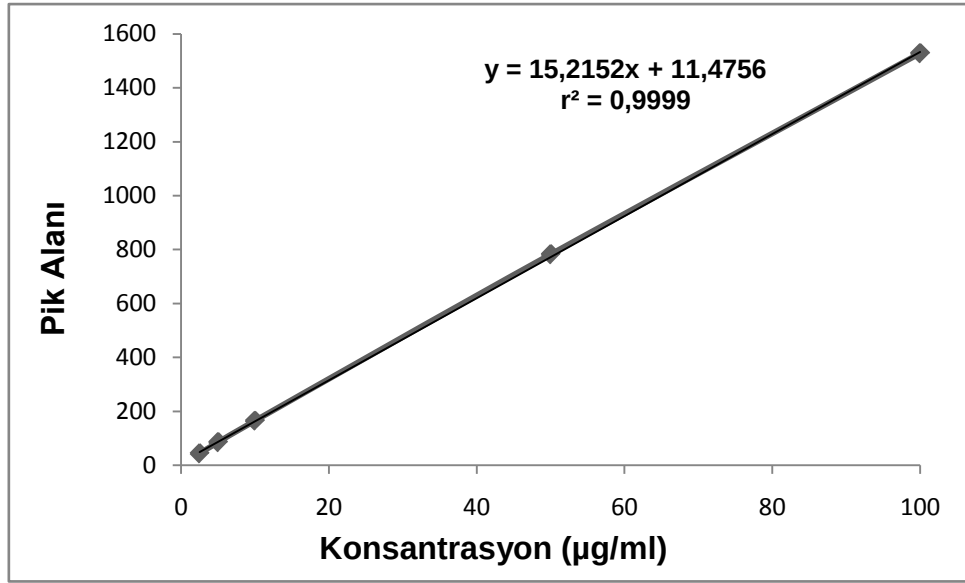
Luteolin ve apigenin için Bölüm 2.2.4.2'de hazırlanışı verilen stok çözelti seyreltilerek 0,625 $\mu\text{g/ml}$; 1,25 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında enjeksiyonlar yapıldı. Bileşiklere ait kalibrasyon eğrileri, denklemler ve regresyon katsayıları (r^2) Şekil 3.22 ve 3.23'te verilmiştir.



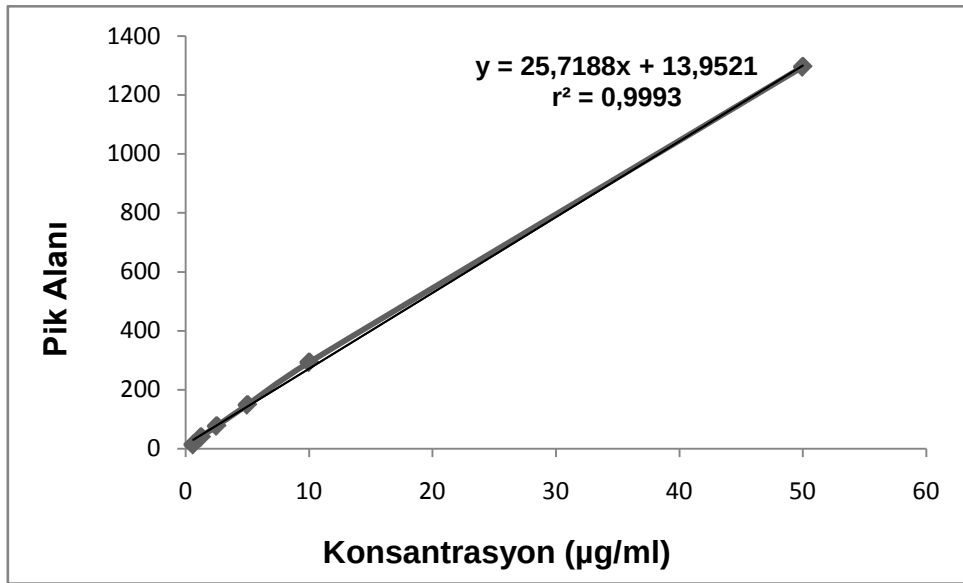
Şekil 3.19. Klorojenik asit'e (CS-2) ait kalibrasyon eğrisi



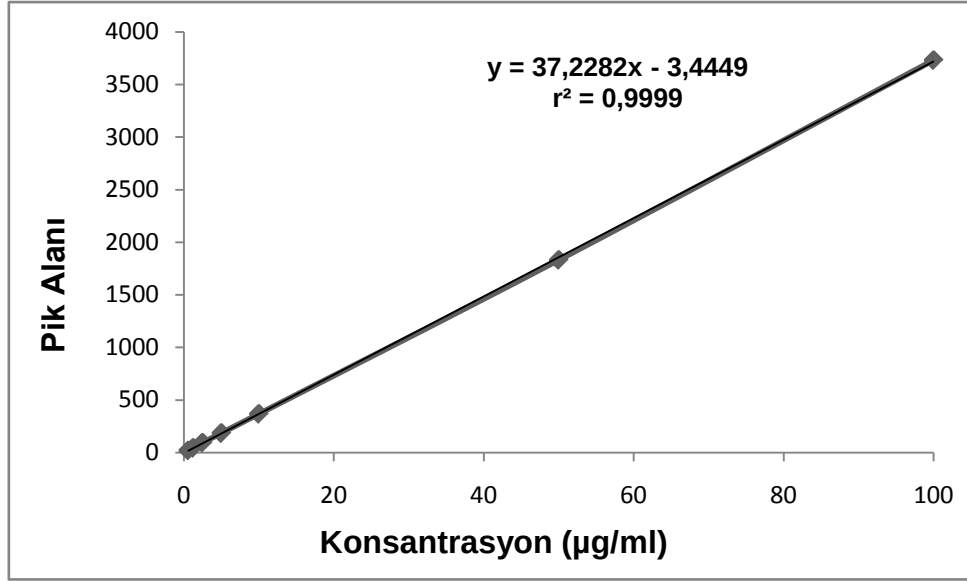
Şekil 3.20. Sinarozit'e (CS-1) ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.21. Naringenin'e ait kalibrasyon eğrisi



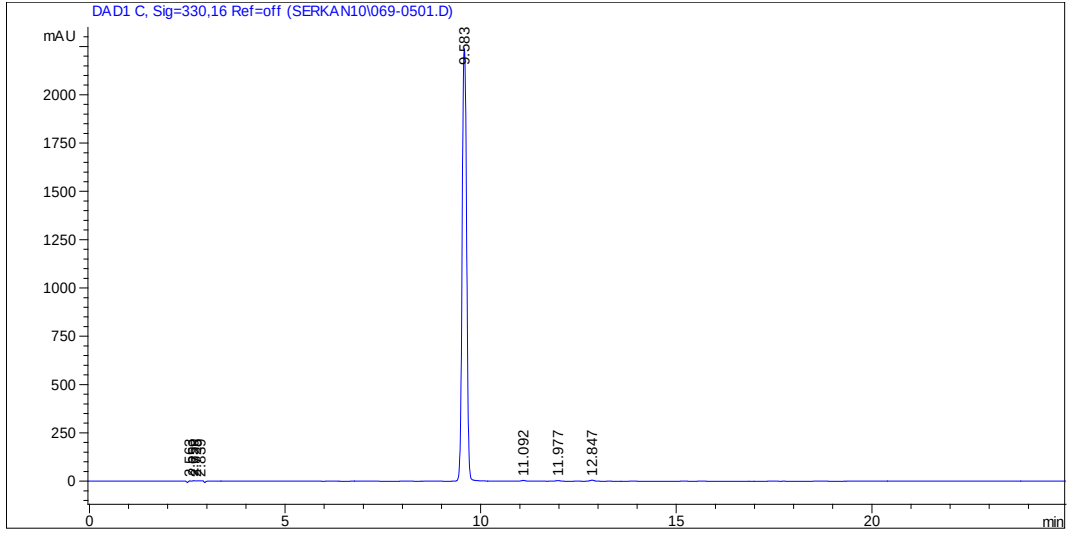
Şekil 3.22. Luteolin'e ait kalibrasyon eğrisi



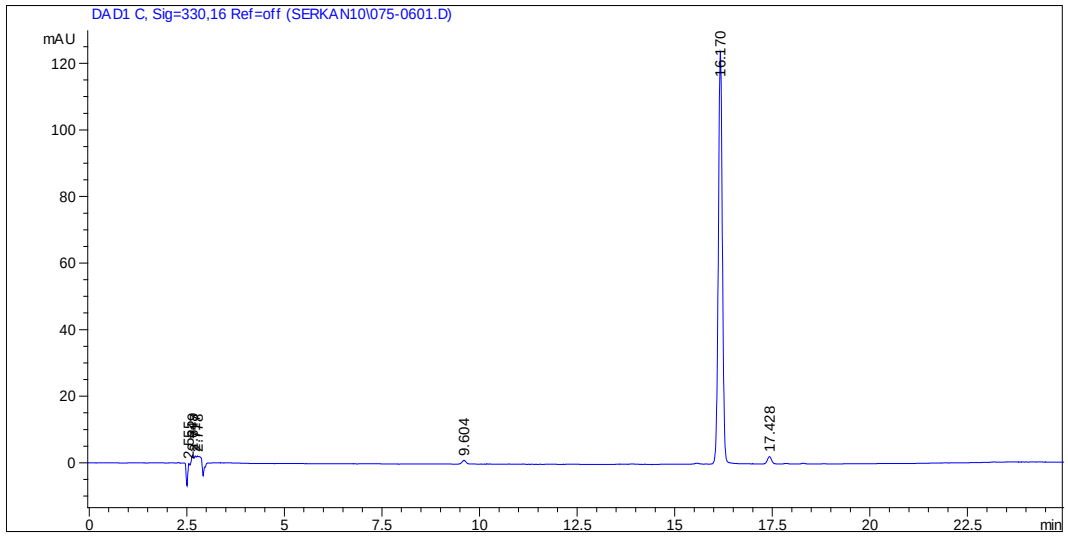
Şekil 3.23. Apigenin'e ait kalibrasyon eğrisi

Bitkisel ürünlerde standart maddelerin var olup olmadığı, HPLC kromatogramlarındaki piklerin alıkonma zamanları ve UV spektrumları karşılaştırılarak kontrol edilmiştir. Standartlara, bitkisel materyale ve bitkisel ürünlere ait HPLC kromatogramları Şekil 3.24-Şekil 3.41 arasında verilmiştir.

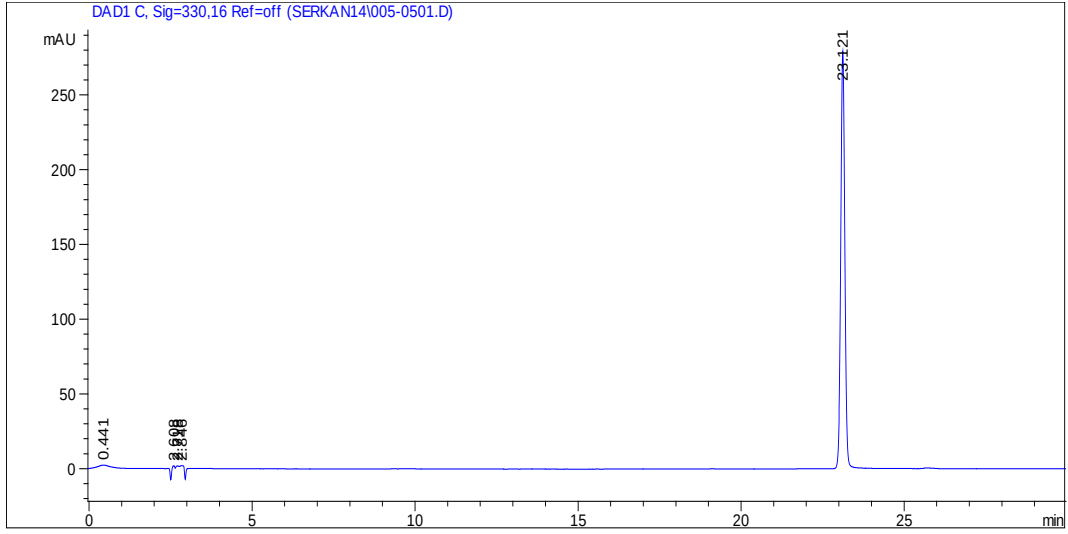
HPLC kromatogramlarında farklı firmalara ait bitkisel ürünler BÜ 1, BÜ 2, BÜ 3, BÜ 4, BÜ 5 ve BÜ 6 kısaltmalarıyla verilmiştir.



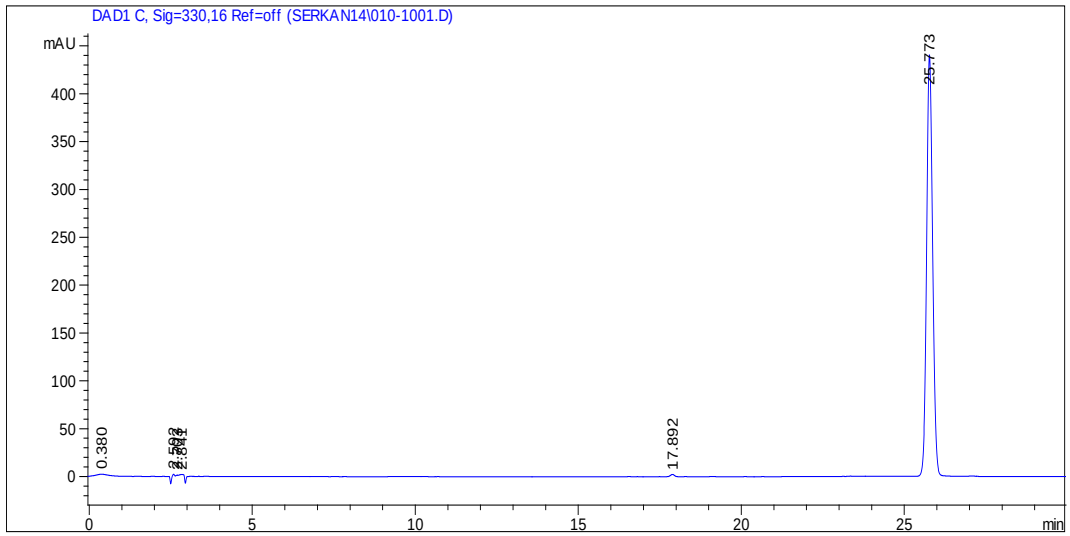
Şekil 3.24. Klorojenik asit'e (CS-2) ait HPLC kromatogramı



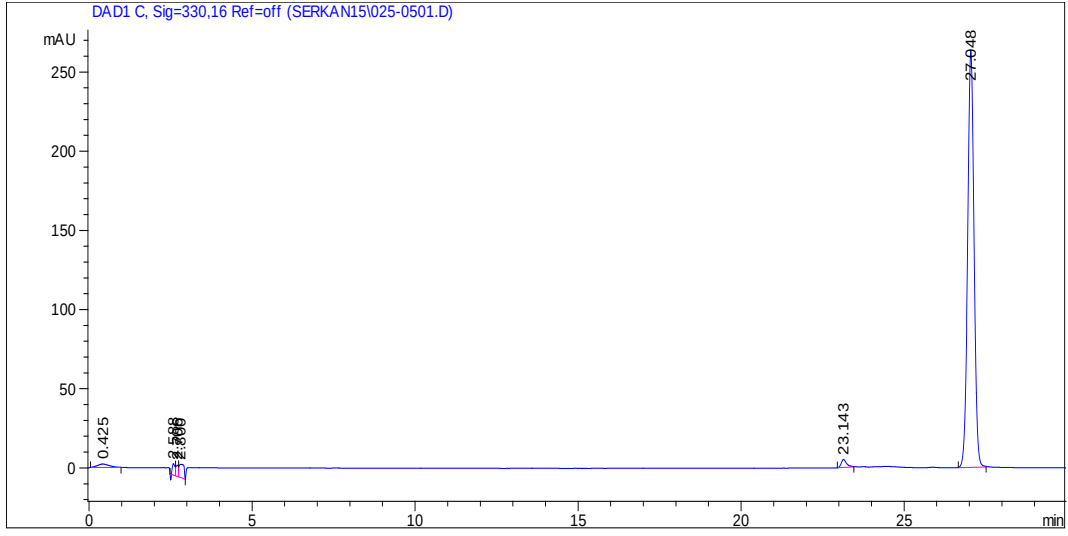
Şekil 3.25. Sinarozit'e (CS-1) ait HPLC kromatogramı



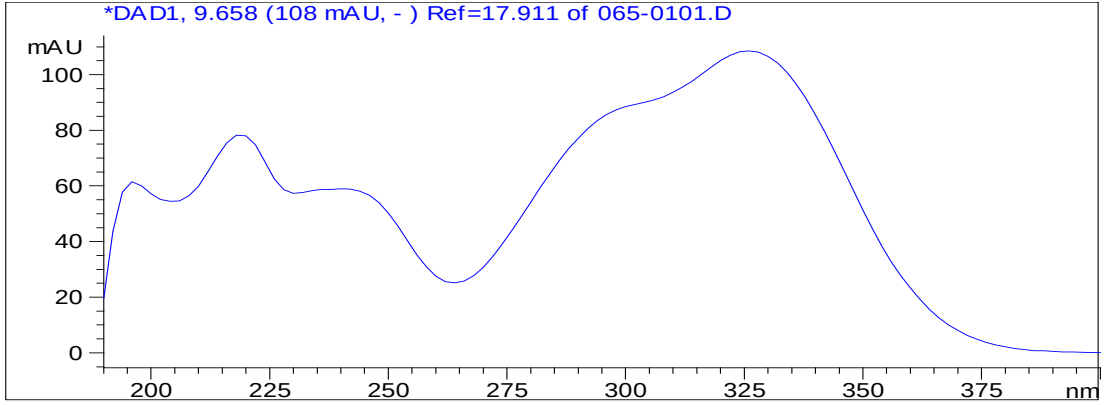
Şekil 3.26. Luteolin'e ait HPLC kromatogramı



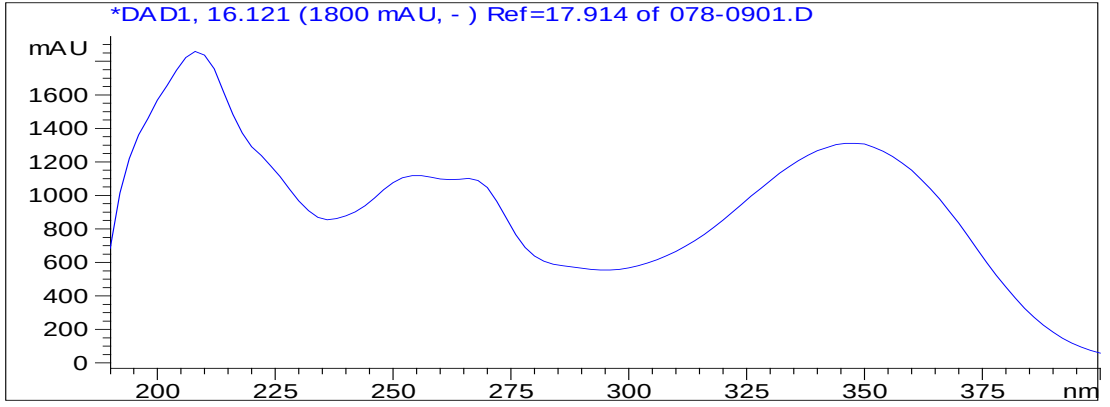
Şekil 3.27. Naringenin'e ait HPLC kromatogramı



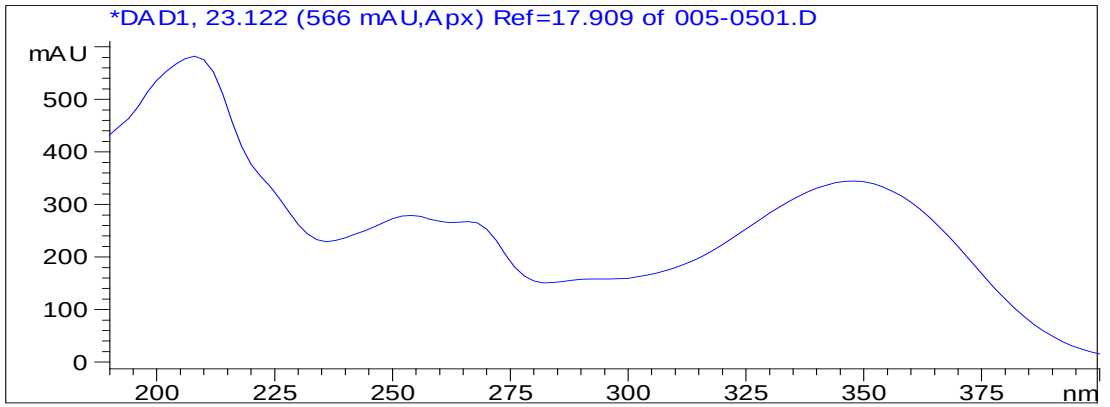
Şekil 3.28. Apigenin'e ait HPLC kromatogramı



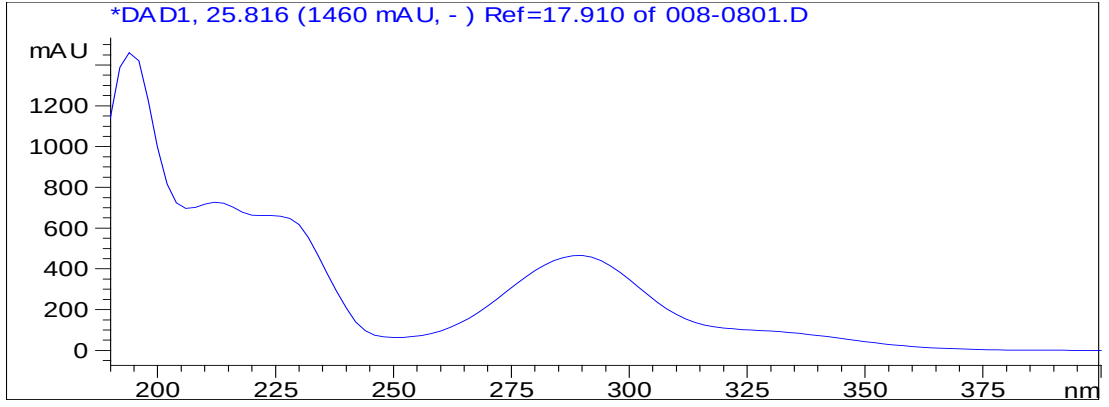
Şekil 3.29. Klorojenik asit'e (CS-2) ait UV spektrumu



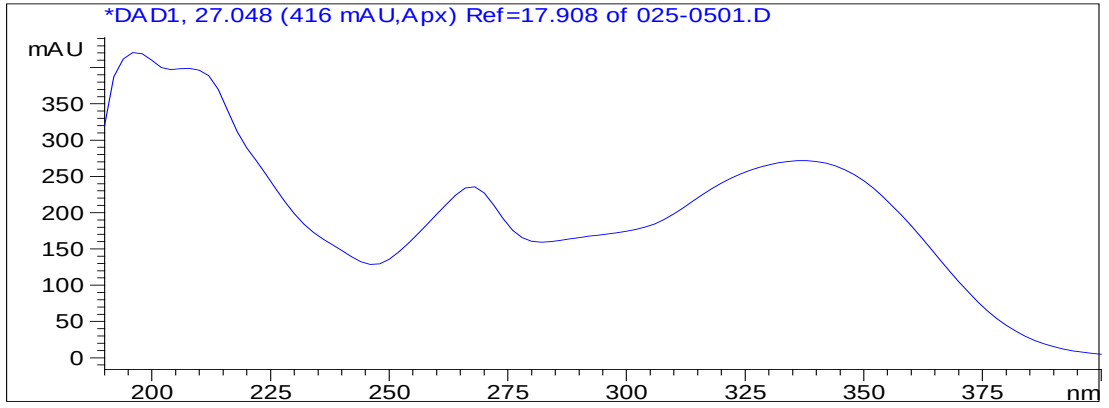
Şekil 3.30. Sinarozit'e (CS-1) ait UV spektrumu



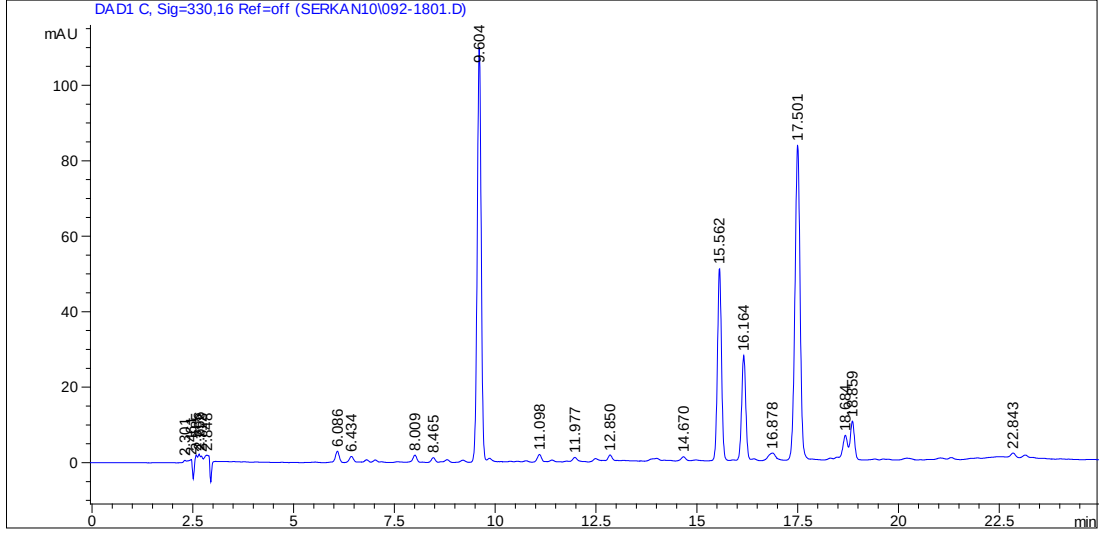
Şekil 3.31. Luteolin'e ait UV spektrumu



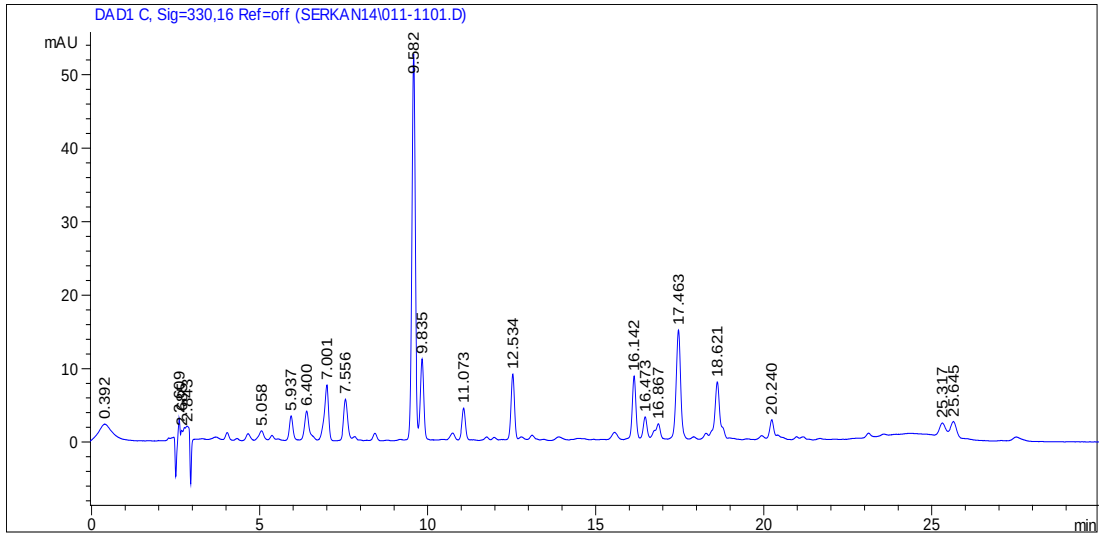
Şekil 3.32. Naringenin'e ait UV spektrumu



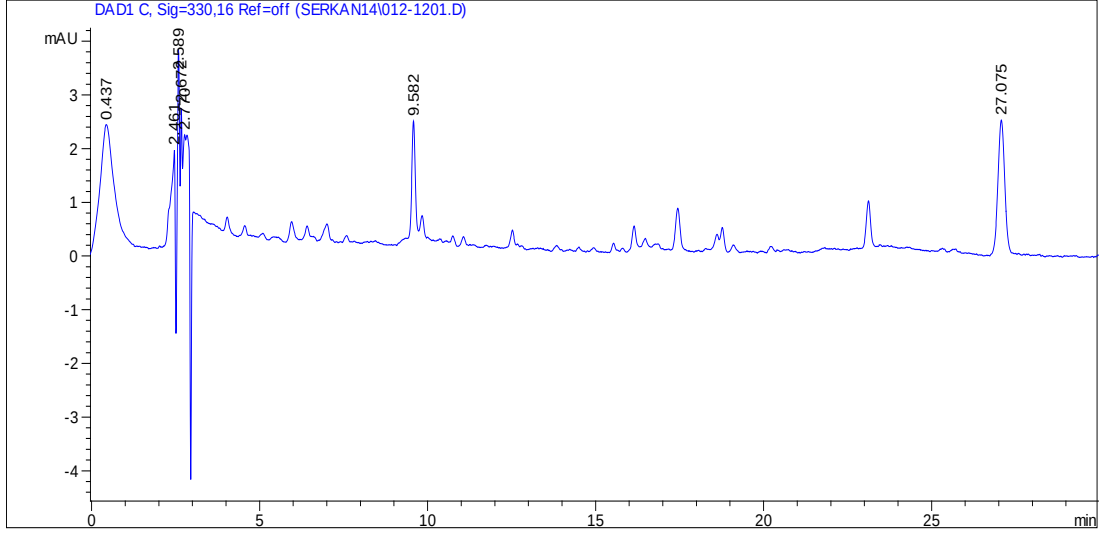
Şekil 3.33. Apigenin'e ait UV spektrumu



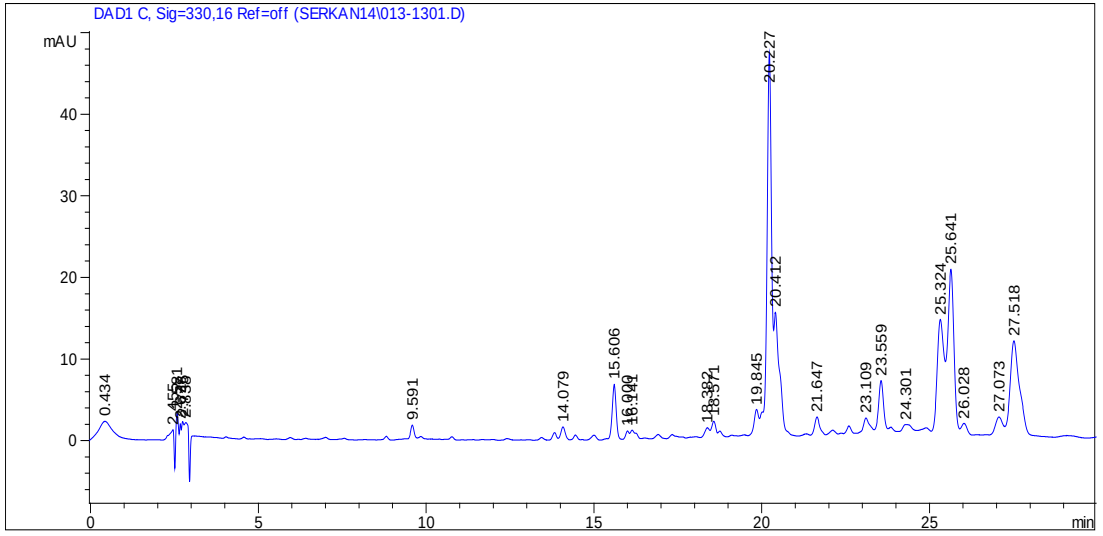
Şekil 3.34. *Cynara scolymus*'tan %70 metanol ile hazırlanan yaprak ekstresine ait HPLC kromatogramı



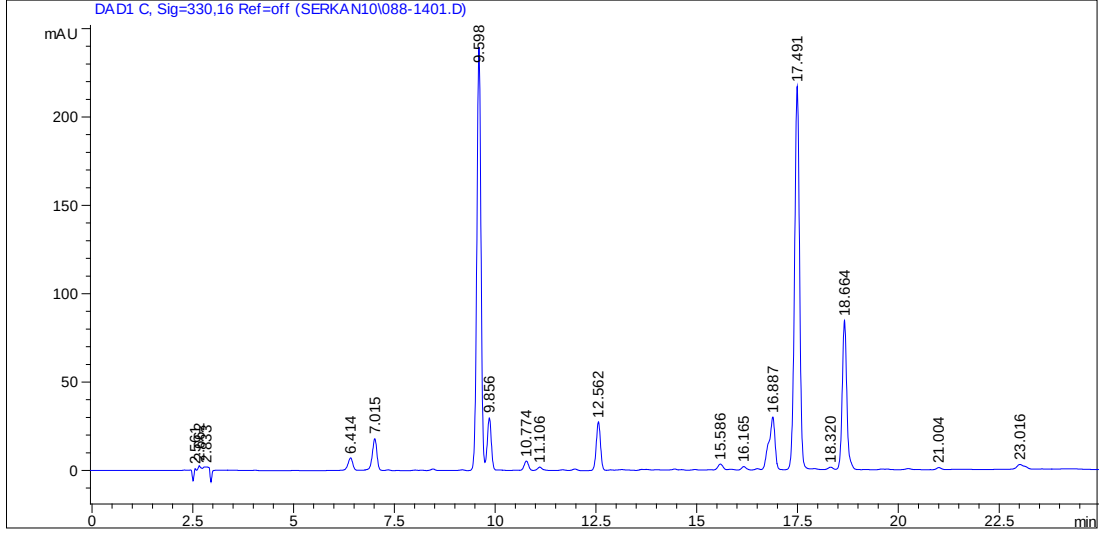
Şekil 3.35. BÜ 1'e ait HPLC kromatogramı



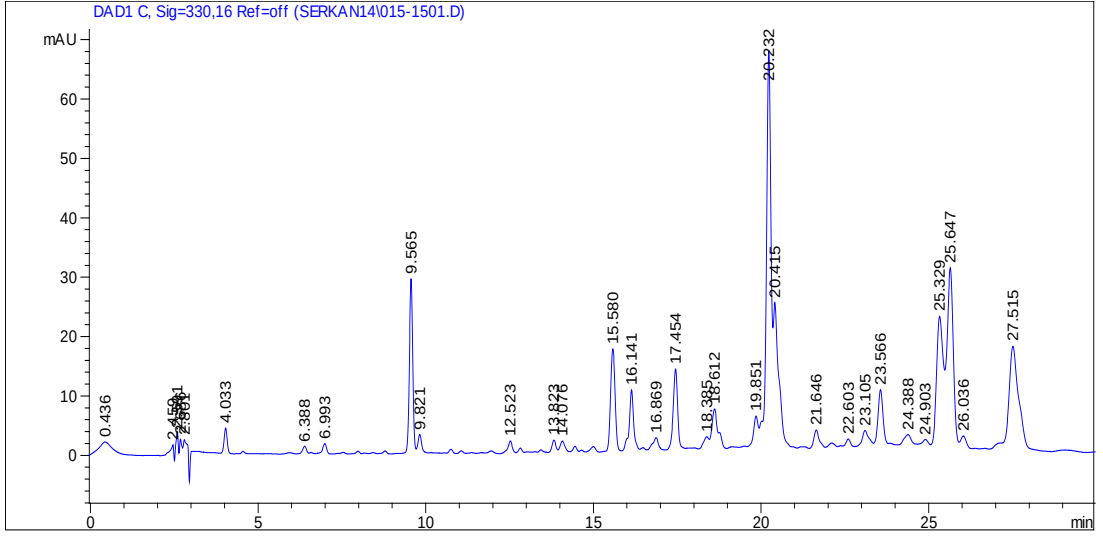
Şekil 3.36. BÜ 2'ye ait HPLC kromatogramı



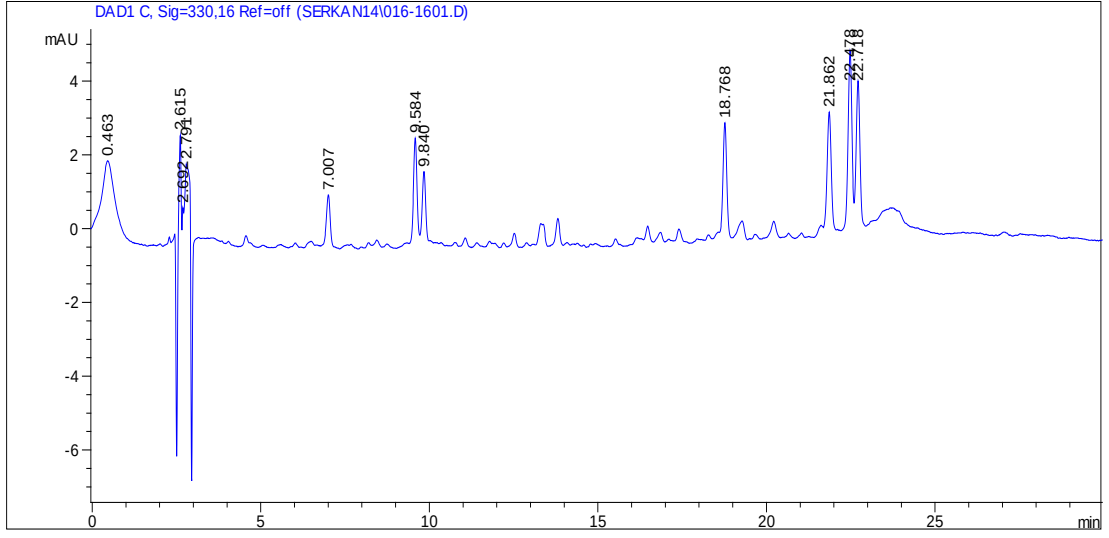
Şekil 3.37. BÜ 3'e ait HPLC kromatogramı



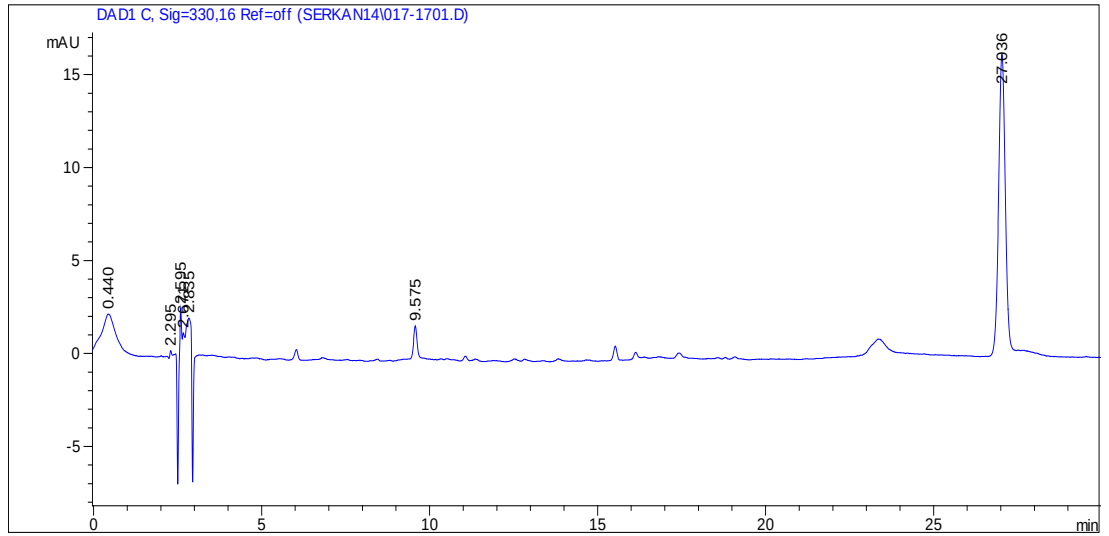
Şekil 3.38. BÜ 4'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 3.39. BÜ 5'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 3.40. BÜ 6'ya ait HPLC kromatogramı



Şekil 3.41. Spray dryer ile kurutulan enginar yaprak ekstresine ait HPLC kromatogramı

Bitkisel materyal (yaprak), bitkisel ürünler ve spray dryer ile kurutulan ekstreye ait kromatogramlarda, miktar tayini yapılan bileşiklerin alıkonma zamanları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. Bileşiklere ait alıkonma zamanları

Bitkisel Ürün	Alıkonma Zamanları				
	Klorojenik asit (CS-2)	Sinarozit (CS-1)	Luteolin	Naringenin	Apigenin
BÜ 1	9,582	16,142	TE	25,645	TE
BÜ 2	9,582	TE	TE	TE	27,075
BÜ 3	9,591	16,141	23,109	25,641	27,073
BÜ 4	9,593	16,169	22,973	TE	TE
BÜ 5	9,565	16,141	23,105	25,647	TE
BÜ 6	9,584	TE	TE	TE	TE
Spray Dryer ile kurutulan ekstre	9,575	TE	TE	TE	27,036
Bitkisel Materyal	9,604	16,164	22,843	TE	TE

TE: Tespit edilemedi

3.4.2. Bitkisel Materyalde, Bitkisel Ürünlerde ve Spray Dryer ile Kurutulan Ekstrede Klorojenik Asit (CS-2), Sinarozit (CS-1), Luteolin, Naringenin ve Apigenin Miktar Tayinine Ait Hesaplamalar

Bitkisel materyal, bitkisel ürünler ve spray dryer ile kurutulan ekstrenin HPLC analizleri için Bölüm 2.2.4.4'te verilen şekilde analiz çözeltileri hazırlandı ve enjeksiyonları gerçekleştirildi. Bitkisel materyale, bitkisel ürünlere ve spray dryer ile kurutulan ekstreya ait kromatogramlarda bulunan bileşiklerin pik alanları kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak, bileşiklerin konsantrasyonları hesaplandı. Bulunan değerler seyreltme faktörleriyle çarpılarak bir kapsüldeki standart madde miktarları mg olarak hesaplandı. Hesaplamalara ait örnek aşağıda verilmiş olup örnek hesaplama BÜ 1'de bulunan klorojenik asit üzerinden gerçekleştirilmiştir.

BÜ 1'de klorojenik asit miktar tayinine ait örnek hesaplama:

Klorojenik asit için kalibrasyon denklemi:

$$y = 23,4482x - 0,0788; \text{ pik alanı: } 367,1401$$

$$367,1401 = 23,4482x - 0,0788$$

$$x = 15,6609 \mu\text{g/ml} \text{ (0,01566 mg/ml)}$$

1 kapsül (300 mg); 300 mg/100 ml'de; 0,01566 mg/ml klorojenik asit bulundu.

Bir kapsüldeki klorojenik asit miktarını bulabilmek için 0,01566 mg/ml seyreltme faktörüyle çarpıldı.

$$0,01566 \text{ mg/ml} \times 100 \text{ ml} = 1,566 \text{ mg}$$

BÜ 1'in bir kapsülünde 1,566 mg (%0,52) klorojenik asit bulunmaktadır.

Sayfa 96'da verilen örnek hesaplama göre bitkisel ürünlerdeki, bitkisel materyaldeki ve spray dryer ile kurutulan ekstredeki klorojenik asit (CS-2), sinarozit (CS-1), luteolin, naringenin ve apigenin miktarları tayin edildi. Hesaplanan miktarlar ve yüzdeleri Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Temin edilen bitkisel ürünlerde hesaplanan etkili bileşik miktarları (mg/kapsül) $\pm$ standart hata

Bitkisel Ürün	Klorojenik asit (CS-2)	Sinarozit (CS-1)	Luteolin	Naringenin	Apigenin
BÜ 1	1,57 $\pm$ 0,002	0,37 $\pm$ 0,003	TE	0,39 $\pm$ 0,002	TE
BÜ 2	0,06 $\pm$ 0,001	TE	TE	TE	0,10 $\pm$ 0,001
BÜ 3	0,05 $\pm$ 0,000	0,05 $\pm$ 0,001	0,17 $\pm$ 0,001	4,42 $\pm$ 0,034	0,10 $\pm$ 0,001
BÜ 4	6,98 $\pm$ 0,006	0,10 $\pm$ 0,001	0,21 $\pm$ 0,002	TE	TE
BÜ 5	0,89 $\pm$ 0,001	0,57 $\pm$ 0,012	0,27 $\pm$ 0,002	6,66 $\pm$ 0,013	TE
BÜ 6	0,09 $\pm$ 0,000	TE	TE	TE	TE

TE: Tespit edilemedi

Çizelge 3.7. Spray dryer ile kurutulan ekstre ve *Cynara scolymus* yapraklarında hesaplanan etkili bileşik miktarları (mg/300 mg) $\pm$ standart hata

Bitkisel Ürün	Klorojenik asit (CS-2)	Sinarozit (CS-1)	Luteolin	Naringenin	Apigenin
Spray Dryer ile kurutulan ekstre	0,06 $\pm$ 0,001	TE	TE	TE	0,60 $\pm$ 0,115
Bitkisel Materyal	3,19 $\pm$ 0,007	1,21 $\pm$ 0,002	0,10 $\pm$ 0,022	TE	TE

TE: Tespit edilemedi

Çizelge 3.8. Temin edilen bitkisel ürünlerde hesaplanan etkili bileşik yüzdesi (%)

Bitkisel Ürün	Klorojenik asit (CS-2)	Sinarozit (CS-1)	Luteolin	Naringenin	Apigenin
BÜ 1	0,52	0,12	TE	0,13	TE
BÜ 2	0,02	TE	TE	TE	0,03
BÜ 3	0,02	0,02	0,06	1,47	0,03
BÜ 4	2,33	0,03	0,07	TE	TE
BÜ 5	0,30	0,19	0,09	2,22	TE
BÜ 6	0,03	TE	TE	TE	TE

TE: Tespit edilemedi

Çizelge 3.9. Spray dryer ile kurutulan ekstre ve *Cynara scolymus* yapraklarında hesaplanan etkili bileşik yüzdesi (%)

Bitkisel Ürün	Klorojenik asit (CS-2)	Sinarozit (CS-1)	Luteolin	Naringenin	Apigenin
Spray Dryer ile kurutulan ekstre	0,02	TE	TE	TE	0,2
Bitkisel Materyal	1,06	0,4	0,03	TE	TE

TE: Tespit edilemedi

3.5. Spray Dryer Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.5'te anlatıldığı üzere spray dryer çalışmalarında farklı denemeler sonunda birçok veri elde edildi. Bu veriler ışığında yapılan çalışma sonunda elde edilen kuru ekstre tartıldı ve sonuç 3,23 g olarak bulundu. İki gram laktozun da ekstrede yer aldığı düşünüldüğünde elde edilen enginar yaprak ekstresinin miktarı 1,23 g olarak hesaplandı. Bu analiz %12,3 verimle gerçekleşmiştir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda bitkisel materyal olarak Konya Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi Bitkiler Çiftliği'nde kültüre alınan *Cynara scolymus* L. (enginar) yapraklarından yararlanılmıştır.

Bitkisel materyal olarak yararlanılan enginar yapraklarında klorojenik asit miktarı %1,06 olarak hesaplanmıştır. Avrupa Farmakopesi'nde yer alan monografta ofisinal olarak kullanılacak bitkilerin klorojenik asit içeriğinin en az %0,8 olması gerektiği belirtilmektedir (European Pharmacopoeia, 2007). Kullandığımız bitkisel materyalin bu koşula uygunluk gösterdiği elde edilen veriler ile tespit edilmiştir (Çizelge 3.9).

Enginar çok uzun yıllardan bu yana geleneksel tedavide sindirim şikayetleri ve karaciğer rahatsızlıklarında kullanılmaktadır (Wittmer ve ark., 2005; Azzini ve ark., 2007). Enginar Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve Kanarya Adaları'nı içine alan Akdeniz Ülkeleri'nde doğal olarak yetişmekle beraber, bitkinin kültürü de yapılmaktadır (Sonnante ve ark., 2007b). Ülkemizde enginar kültürü kıyı bölgelerimizde yaygındır.

Enginarda bulunan etkili bileşikler daha çok yapraklarda yoğunlaşmıştır. Bu nedenle tedavide, bitkisel preparatların, çeşitli ilaçların ve standardize ekstrelerin hazırlanmasında kullanılan kısım bitkinin yapraklarıdır (Meriçli ve Seyhan, 1998).

Enginar yapraklarından hazırlanan ekstrelerin biyolojik etkisinden kafeoilkinik asitlerin ve flavonoidlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Fritsche ve ark., 2002). Kafeoilkinik asitlerden klorojenik asit, sinarin; flavonoidlerden sinarozit, skolimozit, luteolin, apigenin ve glukozitleri ile seskiterpen laktonlar etkili bileşiklerin en önemlileridir.

Çalışmamızda ilk olarak total ekstre hazırlamak amacıyla farklı ekstraksiyon yöntemleri denenmiştir. Bu yöntemler arasından en yüksek verime sahip yöntemin hareketli maserasyon olduğu tespit edilmiş olup (Çizelge 3.1) bu bulguyu destekleyen literatür verileri de mevcuttur (Sanchez-Rabaneda ve ark., 2003; Schütz ve ark., 2006). Ardından total ekstreden hareketle etkili bileşikler izole etmek amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyon yapılmıştır (Şekil 3.1). Farklı fraksiyonların profilleri İTK ve HPLC ile kontrol edilmiş ve etkili bileşikler bu fazda içerdiği düşünülen *n*-butanol fraksiyonu ile izolasyon çalışmalarına geçilmiştir. Bu seçimi destekleyen literatür verileri de mevcuttur (Wang ve ark., 2003).

İzolasyon çalışmaları, silika jel ile hazırlanan açık kolonda gradient elüsyon akış tipi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2). Toplanan fraksiyonlar İTK ve HPLC ile incelenmiş, aynı profile sahip fraksiyonlar birleştirilmiştir (Şekil 3.7). Etkili bileşiklerin saf olarak elde edilebilmesi için preparatif İTK'dan yararlanılmış, CS-1 ve CS-2 kodlu bileşikler izole edilmiştir (Şekil 3.8). İzole edilen bileşiklerin saflıkları HPLC ile farklı dalga boylarında kontrol edilmiş ve yapıları NMR spektroskopisi ile luteolin-7-glukopiranozit (sinarozit) (CS-1) ve 5-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) (CS-2) olarak tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür verileriyle desteklenmektedir (Saraçoğlu ve ark., 2000; Dürüst ve ark., 1999; Jin ve ark, 2005).

Sarı renkli, amorf toz görünümünde olan CS-1'in UV₂₅₄'te açık sarı, UV₃₆₆'da koyu sarı renk verdiği gözlenmiştir. Vanilin/sülfürik asit reaktifi ile 105°C'de ısıtılınca sarı turuncu renk gözlenmiş, rengin zamanla kahverengiye dönmesi bileşiğin flavonoit olabileceğini düşündürmüştür. Bileşiğin DMSO içinde alınan ¹H-NMR spektrumunda δ 13.0'da gözlenen genişlemiş singlet, C-5 konumundaki hidroksil grubunun varlığını doğrulamaktadır. Aynı zamanda 7,46 [(1H, dd; J = 2; 8)]; 7,42 [(1H, d; J = 2)] ppm'lerde görülen sinyallerin H-6' ve H-2' aromatik protonlarına ait olduğu düşünülmüştür. Luteolin tipi bu protonlar 3' ve 4' disüstitüe benzen halkası için karakteristik olduğundan bileşiğin bu konumlarında süstitüent taşıdığına karar verilmiştir. ¹H-NMR ve

¹³C-NMR spektrumları yardımı ile tespit edilen rezonanslar literatür verileri ile karşılaştırıldığında aglikonun luteolin olduğu, MS spektrumunda moleküler iyon pikinin 449'da çıkması nedeni ile de bileşiğin luteolin-7-glukopiranozit olduğu doğrulanmıştır (Wang ve ark., 2003).

Beyaz renkli, amorf toz görünümünde olan CS-2'nin UV spektrumu fenolik yapıyı göstermektedir (Şekil 3.18). Bileşiğin dötoro metanolde alınan ¹H-NMR spektrumunda gözlenen δ 7,04 [d; $J = 2$], 6,95 [dd; $J = 2; 8,4$], 6,77 [d; $J = 8$] sinyalleri trisüstitüe benzen halkasının varlığını göstermektedir. δ 7,55 ve 6,26'da gözlenen dubletler olefinik protonları; ¹³C-NMR spektrumunda görülen δ 168,6'daki sinyal ise bir karboksil grubunun varlığını işaret etmektedir. Diğer taraftan ¹³C-NMR spektrumunda δ 177,02'de gözlenen sinyal bir başka karboksil grubunun varlığını göstermektedir. ¹H-NMR spektrumunda δ 2,05 [2H, d, $J = 8$], 2,15 [1H, d, $J = 11,3$] ve 2,23 [1H, d, $J = 11,5$] de görülen üç metin protonu ve δ 3,72 [dd; $J = 3,2; 8,4$], 4,16 [d, $J = 3,0$] ve 5,32 [m] sinyallerinin ise kinik asit parçasına ait olduğu tespit edildi. MS spektrumunda ise m/z 354 olarak görülmektedir. Bu sonuçlar ve literatür verileri ışığında CS-2 bileşiğinin yapısı klorojenik asit olarak aydınlatıldı (Saraçoğlu ve ark., 2000; Dürüst ve ark., 2001; Jin ve ark., 2005).

Ülkemizde çiçek tablası gıda olarak tüketilen enginarın yaprakları değerlendirilmemektedir (Aktay ve ark., 2000). Çalışmamızda enginarın kullanım alanının genişletilmesine katkıda bulunmak amacıyla enginar yapraklarından spray dryer ile kuru ekstre elde edilmeye çalışılmıştır. Pilot ölçekte elde edilen veriler (Bölüm 3.5) sanayi boyutunda üretime katkı sağlayacak niteliktedir. Bu çalışma esnasında bitkiden spray dryer ile kuru ekstre elde etme denemelerinde bir takım güçlüklerle karşılaşmıştır. Örneğin; hazırlanan sulu ekstrelerden elde edilen toz yeterince kurumamış ve cihazın cam aksamalarına yapışarak eldesini olanaksız kılmıştır. Bu durumun aşılabilmesi için nonpolar çözücüler ile ön ekstraksiyon ve kaydırıcı kullanımı gibi çeşitli çözüm yolları denenmiş ve sonuç alınmıştır. Kaydırıcı olarak laktoz, sukroz ve mikrokristal selüloz kullanılabilmektedir (Imtiaz-UI-

Islam ve Langrish, 2009). 100 ml sulu çözeltilerden kuru ekstresinde 2 g laktoz kullanılmış; çalışma sonunda 3,23 g kuru ekstresinde elde edilmiştir. Böylelikle 1,23 gramı enginar yaprak ekstresi olan numunede verim %12,3 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler, ileride yapılacak verim artırma çalışmalarına ışık tutacaktır.

Bitkisel ürünlerin birbirleri ile etkinlik ve güvenilirlik açısından eşdeğer olduğunu göstermek için yapılan, temelinde miktar tayini ve kromatografik parmakizi (fingerprint) yönteminin olduğu kalite kontrol çalışmalarına “Fitoeşdeğerlik çalışmaları” adı verilmektedir (Liang ve ark., 2004).

Kalite kontrol çalışmaları elimizdeki mevcut luteolin, naringenin, apigenin standartlarının ve numuneden izole edilen sinarozit (CS-1) ile klorojenik asit (CS-2)'in maksimum pik alanı gösterdiği dalga boyu ve HPLC yönteminin esas özellikleri dikkate alınarak yürütülmüştür. Sinarozit (CS-1), klorojenik asit (CS-2), luteolin ve apigenin standartlarının maksimum pik alanı verdikleri dalga boyu 330 nm, naringenin standardının maksimum pik alanı verdiği dalga boyu 270 nm olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatür bilgileriyle uyumludur (Schütz ve ark., 2004).

İzole edilen bileşikler ve standart maddelerin belirli konsantrasyonlarına karşı okunan pik alanı değerleri grafiklere geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin yüksek olması okunan pik alanlarından bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olduğunu göstermektedir (Şekil 3.19; Şekil 3.20; Şekil 3.21; Şekil 3.22; Şekil 3.23).

Elde edilen kalibrasyon denklemlerinden hareketle piyasadan temin edilen altı adet bitkisel ürünün, spray dryer ile kurutulan ekstrenin ve bitkisel materyalin kalite kontrol çalışmaları miktar tayini esas alınarak yürütülmüştür. Bitkisel ürünlerin kalite kontrollerinin, farmakolojik olarak aktif olduğu düşünülen bir ya da iki bileşen üzerinden yapılması yaygın bir yöntemdir.

Buna karşılık bu durum bazı problemleri içermektedir. Örneğin; bitkisel ürünlerin etkileri üzerinde, içerisinde bulunan majör bileşiklerin yanı sıra diğer bileşiklerin sinerjik etkileşimi de rol oynayabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda; piyasadan temin edilen bitkisel ürünler, spray dryer ile kurutulan ekstre ve bitkisel materyaldeki ana etkiden sorumlu olduğu düşünülen klorojenik asitin yanı sıra sinerjik etkili olduğu düşünülen bazı flavonoidlerin de miktarı araştırılmıştır (Çizelge 3.8; Çizelge 3.9).

Çizelge 3.8’de görüldüğü üzere Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın izni ile üretilen veya ithal edilen altı adet bitkisel ürünün içerdiği klorojenik asit miktarlarının yalnızca BÜ 4’te %2 civarında olduğu, diğer bitkisel ürünlerde %0,5’ten daha az olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak klorojenik asit miktarının en yüksek olarak bulunduğu BÜ 4’ün etiketinde %10 olduğu bildirilen klorojenik asit miktarı bizim çalışmamızda %2,33 olarak hesaplanmıştır. BÜ 1’in etiketinde de ürünün klorojenik asit olarak en az %5 kafeoilkinik asit içerdiği bildirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda BÜ 1’deki klorojenik asit miktarı da %0,52 olarak hesaplanmıştır.

Spray dryer ile kurutulan ekstredeki klorojenik asit miktarının ise bazı bitkisel ürünler ile aynı değerde olduğu görülmüştür. Verim arttırma çalışmaları iyileştikçe elde edilen etkin madde miktarlarında artış beklenmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüzyıllardan bu yana kullanılan enginar ve yapraklarının etkinliği ve güvenilirliği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. İstenen etkinin sağlanması için tedaviye yardımcı standardize ekstrelerin etkin madde miktarları belli değerlerin üzerinde olmalıdır.

Bu çalışmada Türkiye’de Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı’ndan satış ve üretim izni alarak eczane ve marketlerde satılan ve standardize enginar yaprak ekstresi içeren altı adet bitkisel ürünün kalite kontrolü HPLC-DAD yöntemi ile klorojenik asit ve flavonoit miktarları belirlenerek yapılmıştır. Analizler sonucunda kıyaslanan bitkisel ürünler fitoeşdeğerlikleri açısından değerlendirilmiştir.

Çalışma sırasında izole edilen luteolin-7-glukopiranozit (sinarozit) (CS-1) ve 5-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) (CS-2) bileşikleri standart olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, bitkisel ürünlerde analizi yapılan etkin maddelerin miktarlarının çok düşük olduğu, hatta bazı bitkisel ürünlerde HPLC ile tayin edilemedikleri, standart maddelerin şahitliğinde tespit edilmiştir. Tahşışat ya da kullanılan ekstraksiyon yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanan nedenlerden ötürü bu sonuçların doğruğu düşünülmektedir.

İlaç kapsamında bulunmayan ve gıda desteği olarak pazarda yer alan ürünlerin standart olarak belirlenen değerlere uymadıkları halde tedavi amacıyla kullanıldıkları düşünüldüğünde, sağlık açısından bazı problemleri de beraberinde getirecekleri aşıkardır. Bu gibi nedenler göz önünde bulundurulduğunda tıbbi amaçla kullanılacak bitkisel ürünlerin sağlık otoriteleri tarafından ruhsatlandırılıp satışlarına izin verilmesi oldukça önemli ve gereklidir.

Bitkisel ürünlerin hazırlanmasında farklı teknikler kullanılmaktadır. Spray dryer ile sulu ekstreleri püskürterek kurutma işlemi bu yöntemlerden bir tanesidir. Çeşitli parametreler (sıcaklık, basınç, akış hızı) değiştirilerek gerçekleştirilen analizler sonucunda kuru ekstre elde edilmiş; ancak ekstre miktarı arzu edilen düzeyde olmamıştır. Elde edilen kuru ekstrelerde, HPLC ile miktar tayini sonucunda standardizasyon çalışmalarının yapıldığı bileşiklerden olan klorojenik asit miktarının düşük olduğu görülmüştür. Verimin ise istenilen ölçüde olmaması daha fazla çalışmanın gerektiğini düşündürmektedir.

Verim artırma çalışmaları başarıya ulaştığında pilot ölçekte elde edilen verilerin sanayide değerlendirilmesi hem enginar yapraklarının kullanım alanının genişlemesi hem de standardize ekstrelerin yurt içinde uygun farmasötik şekilde hazırlanarak piyasaya sürülmesi açısından önemlidir. Bu sonuç ülke ekonomisine katkıyı da beraberinde getirecektir.

Bu çalışmamız güncel olmasının yanı sıra Türkiye piyasasında bulunan ve enginar yaprak ekstresi içeren ürünlerin güvenilirliklerinin ortaya konması açısından da önem taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar enginar yapraklarından hareketle ülke ekonomisine katkıda bulunabilecek standardize ekstrelerin hazırlanabileceğini göstermekte olup ileriki çalışmalara da ışık tutacak niteliktedir.

ÖZET

Türkiye’de Bulunan Karaciğer ve Sindirim Sistemi Hastalıklarında Kullanılan *Cynara scolymus* L. (enginar) Preparatlarının Standardizasyonunun ve Fitoeşdeğerliğinin Kontrolü

Bu tez çalışmasında bitkisel materyal olarak Compositae familyasına ait *Cynara scolymus*’un (enginar) yapraklarından yararlanılmıştır. Enginar, Güney Amerika ve Akdeniz Ülkeleri’nde doğal olarak yetişen ve dünyanın birçok bölgesinde kültürü yapılan bir bitkidir. Ülkemizde de kıyı bölgelerimizde enginar kültürü yapılmaktadır.

Bu çalışmada öncelikle farklı ekstraksiyon teknikleri denenmiş ve en yüksek verime ulaşılan hareketli maserasyon ile ekstraksiyon yapılmasına karar verilmiştir. Metanol:su (70:30) ile yapılan ekstraksiyonu sırasıyla hekzan, kloroform, etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon takip etmiş ve etkili bileşikler açısından zengin olduğu İTK ile saptanan *n*-butanol fraksiyonu ile izolasyon çalışmalarına geçilmiştir. Kolon kromatografisi ile toplanan fraksiyonlar, İTK ve HPLC ile kontrol edilmiş, izole edilen bileşikler preparatif İTK ve kristallendirme teknikleri ile saflaştırılmıştır. Bitkiden CS-1 kodlu luteolin-7-glukopiranozit (sinarozit) ve CS-2 kodlu 5-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) bileşikler izole edilmiştir.

Çalışmada ayrıca standardize ekstre hazırlanmasında kullanılan spray dryer ile sulu enginar ekstrelerinden hareketle standardize kuru ekstre elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla farklı parametreler denenmiş ve sonuç alınmıştır. Verim artırma çalışmaları ve elde edilen ekstrenin kalitesini arttırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Tez çalışmamızda, farklı üretici firmalara ait *Cynara scolymus* yaprak ekstresi içeren altı adet bitkisel ürün üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu ürünlerdeki sinarozit, luteolin, apigenin, naringenin ve klorojenik asitin HPLC-DAD ile miktar tayinleri yapılmış ve fitoeşdeğerlikleri değerlendirilmiştir. Kalite kontrol çalışmaları sırasında bitkiden izole edilen sinarozit ve klorojenik asit de standart madde olarak kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda incelenen bitkisel ürünlerin bir kısmında yukarıda belirtilen bileşiklerin tamamına rastlanmamış, bazılarında da bu bileşiklerin bir kapsüldeki miktarlarının olması gereken değerlerin altında olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cynara scolymus*, Fitoeşdeğerlik, HPLC, İzolasyon, Spray dryer

SUMMARY

Controls of Standardization and Phytoequivalence of *Cynara scolymus* L. (artichoke) Preparations Used for Liver and Digestive Disorders in Turkey

Leaves of *Cynara scolymus* (artichoke), a member of the Compositae family, were used in this thesis study as the herbal material. Artichoke is a plant indigenous to South American and Mediterranean countries and is also cultured in many other regions throughout the world. Artichoke is cultured in the coastal regions of our country.

In this study, several extraction techniques were tested initially, and it was decided to use dynamic maceration for extraction, since it produced the highest yield. Following extraction with methanol:water (70:30), further fluid:fluid extractions with hexane, chloroform and ethylacetate were studied, respectively, followed by isolation phase using *n*-butanol, which was detected to highly contain active substances by TLC. Fractions collected with column chromatography were checked with TLC and HPLC and the isolated compounds were purified using preparative TLC and crystallization techniques. The compounds CS-1 coded luteolin-7-glucopyranoside (cynaroside) and CS-2 coded 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) were isolated from the plant.

In this study, further attempts were made to obtain standardized dry extract from the aqueous artichoke extracts by using the spray dryer utilized in preparing the standardized extract. Different parameters were tested for this purpose with success. Studies to increase the yield and to improve the quality of the extract obtained are ongoing.

Analyses on six herbal products containing *Cynara scolymus* leaf extract from different manufacturers were carried out as a part of this thesis study. Cynaroside, luteolin, apigenin, naringenin and chlorogenic acid were assayed using HPLC-DAD and their phytoequivalence was evaluated. Cynaroside and chlorogenic acid isolated from the plant were used as standard substances during quality control analyses.

Each of the above-mentioned compounds could not be detected in some of the herbal products studied, while in some products, these compounds were present but with amounts less than required to be contained in a capsule.

Key Words: *Cynara scolymus*, HPLC, Isolation, Phytoequivalence, Spray dryer

KAYNAKLAR

- ABDO, Z. M. A., RADWAN, N. L., SELİM, N. A. (2007). The Effect of Artichoke Leaves Meal on the Utilization of Dietary Energy for Broiler Chicks. *International Journal of Poultry Science*, **6**: 973-982
- ACQUADRO, A., PORTIS, E., LEE, D., DONINI, P., LANTERI, S. (2005). Development and characterization of microsatellite markers in *Cynara cardunculus* L.. *Genome*, **48**: 217-225
- ADZET, T., JORGE, C., LAGUNA, J. C. (1987). Hepatoprotective Activity of Polyphenolic Compounds From *Cynara scolymus* Against CCl₄ Toxicity In Isolated Rat Hepatocytes. *Journal of Natural Products*, **50(4)**: 612-617
- AKTAY, G., DELİORMAN, D., ERGUN, E., ERGUN, F., YEŞİLADA, E., ÇEVİK, C. (2000). Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury. *Journal of Ethnopharmacology*, **73**: 121-129
- ALAMANNI, M. C., COSSU, M. (2003). Antioxidant Activity of The Extracts of The Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) var. *spinoso sardo*. *Italian Journal of Food Science*, **15(2)**: 187-195
- ALONSO, M. R., GARCIA, M. C., BONELLI, C. G., FERRARO, G., RUBIO, M. (2006). Validated HPLC Method for Cynarin Determination in Biological Samples. *Acta Farm. Bonaerens*, **25(2)**: 267-270
- AYDEMİR, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, **87**: 59-67
- AZZINI, E., BUGIANESI, R., ROMANO, F., DI VENERE, D., MICCADEI, S., DURAZZO, A., FODDAI, M. S., CATASTA, G., LINSALATA, V., MAIANI, G. (2007). Absorption and metabolism of bioactive molecules after oral consumption of cooked edible heads of *Cynara scolymus* L. (Cultivar Violette di Provenza) in human subjects: a pilot study. *British Journal of Nutrition*, **97**: 963-969
- BAYTOP, T. (1999). Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi (Geçmişte ve Bugün), İlaveli 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, s.: 204
- BLUMENTHAL, M., BUSSE, W. R., GOLDBERG, A., GRUENWALD, J., HALL, T., RIGGINGS, C. W., RISTER, R. S. (1998). The Complete German Commission E Monographs (Therapeutic Guide to Herbal Medicines). American Botanical Council: Integrative Medicine Communications, Boston, Massachusetts.
- BUNDY, R., WALKER, A. F., MIDDLETON, R. W., MARAKIS, G., BOOTH, J. C. L. (2004). Artichoke Leaf Extract Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome and Improves Quality of Life in Otherwise Healthy Volunteers Suffering from Concomitant Dyspepsia: A Subset Analysis. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **10(4)**: 667-669
- BUNDY, R., WALKER, A. F., MIDDLETON, R. W., WALLIS, C., SIMPSON, H. C. R. (2008). Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*, **15**: 668-675
- CERVELLATI, R., RENZULLI, C., GUERRA, M. C., SPERONI, E. (2002). Evaluation of Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenolic Compounds Using the Briggs-Rauscher Reaction Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50(26)**: 7504-7509

- CHAZARRA, S., SIDRACH, L., LOPEZ-MOLINA, D., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, **17**: 1393-1400
- CLIFFORD, M. N., KIRKPATRICK, J., KUHNERT, N., ROOZENDAAL, H., SALGADO, P. R. (2008). LC–MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. *Food Chemistry*, **106**: 379-385
- COMINO, C., HEHN, A., MOGLIA, A., MENIN, B., BOURGAUD, F., LANTERI, S., PORTIS, E. (2009). The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. *BMC Plant Biology*, **9(30)**: 1-13
- COON, J. S. T., ERNST, E. (2003). Herbs for serum cholesterol reduction: A systematic review. *The Journal of Family Practice*, **52(6)**: 468-478
- CURADI, M., PICCIARELLI, R., LORENZI, R., GRAIFENBERG, A., CECCARELLI, N. (2005). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds In The Edible Parts of Early and Late Italian Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Varieties. *Italian Journal of Food Science*, **17(1)**: 33-44
- CURADI, M., GRAIFENBERG, A., GIORGI, I. (2007). An Initial Comparison of The Content of Bitter Substances In *Cynara scolymus* L. Plants Obtained From Rooted Offshoots and Micropropagation. *Italian Journal of Food Science*, **19(3)**: 351-356
- DAVIS, P. H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5. Edinburgh: Edinburgh University Press
- DAVIS, P. H. (1978). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 6, Edinburgh: Edinburgh University Press
- DAVIS, P. H., MILL, R.R., KIT TAN (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.10, Edinburgh: Edinburgh University Press
- DE PAOLIS, A., PIGNONE, D., MORGESE, A., SONNANTE, G. (2008). Characterization and differential expression analysis of artichoke phenylalanine ammonia-lyase-coding sequences. *Physiologia Plantarum*, **132**: 33-43
- DOĞAN, S., TURAN, Y., ERTÜRK, H., ARSLAN, O. (2005). Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(3)**: 776-785
- DÜRÜST, N., ÖZDEN, S., UMUR, E., DÜRÜST, Y., KÜÇÜKİSLAMOĞLU, M. (2001). The Isolation of Carboxylic Acids from the Flowers of *Delphinium formosum*. *Turkish Journal of Chemistry*, **25**: 93-97
- EMENDÖRFER, F., EMENDÖRFER, F., BELLATO, F., NOLDIN, V. F., CECHINEL-FILHO, V., YUNES, R. A., MONACHE, F. D., CARDOZO, A. M. (2005). Antispasmodic Activity of Fractions and Cynaropicrin from *Cynara scolymus* on Guinea-Pig Ileum. *Biological&Pharmaceutical Bulletin*, **28(5)**: 902-904
- ESCOP (2003). ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd Ed.. Exeter, United Kingdom: European Scientific Cooperative on Phytotherapy. p.: 126-140
- ESER, B., ÖZEN, Ş. (2005). Possible Reasons of One-Way Variation in Globe Artichoke. *Acta Horticulturae*, **681**: 59-67
- ESPIN, H. C., TUDELA, J., GARCIA-CANOVAS, F. (1997). Monophenolase Activity of Polyphenol Oxidase from Artichoke Heads (*Cynara scolymus* L.). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*, **30(8)**: 819-825
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 (2007). Council of Europe, Strasbourg: France

- FERRACANE, R., PELLEGRINI, N., VISCONTI, A., GRAZIANI, G., CHIAVARO, E., MIGLIO, C., FOGLIANO, V. (2008). Effects of Different Cooking Methods on Antioxidant Profile, Antioxidant Capacity, and Physical Characteristics of Artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(18): 8601-8608
- FİTOMED TÜRKİYE (2009). Sayı 7, İstanbul: Ege Basım
- FRATIANNI, F., TUCCI, M., DE PALMA, M., PEPE, R., NAZZARO, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, **104**: 1282-1286
- FRITSCH, J., BEINDORFF, M. C., DACHTLER, M., ZHANG, H., LAMMERS, G. J. (2002). Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *European Food Research and Technology*, **215**: 149-157
- GARCIA, S. M., FIRPO, I. T. (2005). Artichoke Situation in Argentina. *Acta Horticulturae*, **681**: 195-200
- GEBHARDT, R. (1997). Antioxidative and Protective Properties of Extracts from Leaves of the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) against Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **144**: 279-286
- GEBHARDT, R. (1998). Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in Primary Cultured Rat Hepatocytes by Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Extracts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **286**(3): 1122-1128
- GEBHARDT, R. (2002). Inhibition of Cholesterol Biosynthesis in HepG2 Cells by Artichoke Extracts is Reinforced by Glucosidase Pretreatment. *Phytotherapy Research*, **16**: 368-372
- GEBHARDT, R., FAUSEL, M. (1997). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Artichoke Extracts and Constituents in Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicology In Vitro*, **11**: 669-672
- GIL-IZQUIERDO, A., GIL, M. I., CONESA, M. A., FERRERES, F. (2001). The effect of storage temperatures on vitamin C and phenolics content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Innovative Food Science&Emerging Technologies*, **2**: 199-202
- GONI, I., JIMENEZ-ESCRIG, A., GUDIEL, M., SAURA-CALIXTO, F. D. (2005). Artichoke (*Cynara scolymus* L) modifies bacterial enzymatic activities and antioxidant status in rat cecum. *Nutrition Research*, **25**: 607-615
- GOUBRAN, F., HALE, G., SALIB, S., TOMKINS, B., CLARKE, R. (2005). The Globe Artichoke Industry in Australia. *Acta Horticulturae*, **681**: 483-488
- GRUENWALD, J., BRENDLER, T., JAENICKE, C. (2004). PDR for Herbal Medicines, 3rd Ed. Montvale, NJ: Thomson Healthcare, p.: 267-274
- HAUSLER, M., GANZERA, M., ABEL, G., POPP, M., STUPPNER, H. (2002). Determination of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids in *Cynara scolymus* L. by High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, **56**: 407-411
- HELLWEGE, E. M., RAAP, M., GRITSCHER, D., WILLMITZER, L., HEYER, A. G. (1998). Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNAs. *FEBS Letters*, **427**: 25-28
- HOLTMANN, G., ADAM, B., HAAG, S., COLLET, W., GRUNEWALD, E., WINDECK, T. (2003). Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, **18**: 1099-1105

- HUBER, R., MULLER, M., NAUMANN, J., SCHENK, T., LUDTKE, R. (2009). Artichoke leave extract for chronic hepatitis C – A pilot study. *Phytomedicine*.
- IMTIAZ-UL-ISLAM, Md., LANGRISH, T. A. G. (2009). Comparing the crystallization of sucrose and lactose in spray dryers. *Food and Bioprocess Processing*, **87**: 87-95
- JIMENEZ-ESCRIG, A., DRAGSTED, L. O., DANESHVAR, B., PULIDO, R., SAURA-CALIXTO, F. (2003). In Vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Effect on Biomarkers of Antioxidants in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(18)**: 5540-5545
- JIN, U. H., LEE, J. Y., KANG, S. K., KIM, J. K., PARK, W. H., KIM, J. G., MOON, S. K. KIM, C. H. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life sciences*, **77**: 2760-2769
- JOY, J. F., HABER, S. L. (2007). Clinical uses of artichoke leaf extract. *Alternative Therapies*, **64**: 1906-1909
- JUZYSZYN, Z., CZERNY, B., PAWLIK, A., DROZDZIK, M. (2008a). Effect of artichoke extract (*Cynara scolymus* L.) on palmitic-1-¹⁴C acid oxidation in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**: 589-594
- JUZYSZYN, Z., CZERNY, B., PAWLIK, A., DROZDZIK, M. (2008b). The Effect of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Extract on ROS Generation in HUVEC Cells. *Phytotherapy Research*, **22**: 1159-1161
- LANTERI, S., ACQUADRO, A., COMINO, C., MAURO, R., MAUROMICALE, G., PORTIS, E. (2006). A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **112**: 1532-1542
- LATTANZIO, V., KROON, P. A., LINSALATA, V., CARDINALI, A. (2009). Globe Artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, **10**: 1-14
- LI, H., XIA, N., BRAUSCH, I., YAO, Y., FORSTERMAN, U. (2004). Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Up-Regulate Endothelial-Type Nitric-Oxide Synthase Gene Expression in Human Endothelial Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **310(3)**: 926-932
- LIANG, Y. Z., XIE, P., CHAN, K. (2004). Quality Control of Herbal Medicines. *Journal of Chromatography B*, **812(1-2)**: 53-70
- LLORACH, R., ESPIN, J. C., FRANCISCO, A., BARBERAN, T., FERRERES, F. (2002). Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting Antioxidant Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3458-3464
- LLORENTE, E. B., BRUTTI, C. B., CAFFINI, N. O. (2004). Purification and Characterization of a Milk-Clotting Aspartic Proteinase from Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(26)**: 8182-8189
- LOPEZ-MOLINA, D., HINER, A. N. P., TUDELA, J., GARCIA-CANOVAS, F., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. (2003a). Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**: 738-742
- LOPEZ-MOLINA, D., HEERING, H. A., SMULEVICH, G., TUDELA, J., THORNELEY, R. N. F., GARCIA-CANOVAS, F., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. (2003b). Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **94**: 243-254

- LOPEZ-MOLINA, D., NAVARRO-MARTINEZ, M. D., MELGAREJO, F. R., HINER, A. N. P., CHAZARRA, S., RODRIGUEZ-LOPEZ, J. N. (2005). Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry*, **66**: 1476-1484
- LÖHR, G., DETERS, A., HENSEL, A. (2009). *In vitro* investigations of *Cynara scolymus* L. extract on cell physiology of HepG2 liver cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **45(2)**: 201-208
- LUPATTELLI, G., MARCHESI, S., LOMBARDINI, R., ROSCINI, A. R., TRINCA, F., GEMELLI, F., VAUDO, G., MANNARINO, E. (2004). Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipemia. *Life Sciences*, **76**: 775-782
- MARAKIS, G., WALKER, A. F., MIDDLETON, R. W., BOOTH, J. C. L., WRIGHT, J., PIKE, D. J. (2002). Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. *Phytomedicine*, **9**: 694-699
- MAURI, P., PIETTA, P. (2000). Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **23**: 61-68
- MEHMETÇİK, G., ÖZDEMİRLER, G., KOÇAK-TOKER, N., ÇEVİKBAŞ, U., UYSAL, M. (2008). Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **60**: 475-480
- MERİÇLİ, A. H., SEYHAN, G. V. (1998). Constituents of the leaves of *Cynara cardunculus* L. naturalized around Sinop. *Acta Pharmaceutica Turcica*, **40(3)**: 137-139
- MERİÇLİ, A. H., SEYHAN, G. V. (2006). Constituents of *Cynara syriaca* Leaves. *Pharmaceutical Biology*, **44(9)**: 643-645
- MICCADEI, S., DI VENERE, D., CARDINALI, A., ROMANO, F., DURAZZO, A., FODDAI, M. S., FRAIOLI, R., MOBARHAN, S., GIUSEPPE, M. (2008). Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. *Nutrition and Cancer*, **60(2)**: 276-283
- MOGLIA, A., LANTERI, S., COMINO, C., ACQUADRO, A., DE VOS, R., BEEKWILDER, J. (2008). Stress-Induced Biosynthesis of Dicafeoylquinic Acids in Globe Artichoke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(18)**: 8641-8649
- MOSSI, A. J., ECHEVERRIGARAY, S. (1999). Identification and Characterization of Antimicrobial Components In Leaf Extracts of Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Acta Horticulturae*, **501**: 111-114
- MULINACCI, N., PRUCHER, D., PERUZZI, M., ROMANI, A., PINELLI, P., GIACCHERINI, C., VINCIERI, F. F. (2004). Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **34**: 349-357
- ÖZTÜRK, G., ERTAŞ, F. N., AKYILMAZ, E., DİNÇKAYA, E., TURAL, H. (2004). Novel Amperometric Biosensor Based on Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Tissue Homogenate Immobilized in Gelatin for Hydrogen Peroxide Detection. *Artificial cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, **32(4)**: 637-645
- PIETTA, P., SIMONETTI, P., MAURI, P. (1998). Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46(11)**: 4487-4490
- PITTLER, M. H., WHITE, A. R., STEVINSON, C., ERNST, E. (2003). Effectiveness of artichoke extract in preventing alcohol-induced hangovers: a randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, **169(12)**: 1269-1273

- RODRIGUEZ, T. S., GIMENEZ, D. G., VAZGUEZ, R. P. (2002). Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*, **9**: 687-693
- ROMANI, A., PINELLI, P., CANTINI, C., CIMATO, A., HEIMLER, D. (2006). Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry*, **95**: 221-225
- ROSERIO, L. B., BARBOSA, M., MAMES, J., WILBEY, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants—the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, **56(2)**: 76-85
- SANCHEZ-RABANEDA, F., JAUREGUI, O., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., BASTIDA, F., VILADOMAT, F., CODINA, C. (2003). Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1008**: 57-72
- SARAÇOĞLU, İ., HARPUT, Ü. Ş., ÇALIŞ, İ. (2000). Phenolic Constituents from *Phlomis lycia*. *Turkish Journal of Chemistry*, **26**: 133-142
- SCHÜTZ, K., KAMMERER, D., CARLE, R., SCHIEBER, A. (2004). Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(13)**: 4090-4096
- SCHÜTZ, K., MUKS, E., CARLE, R., SCHIEBER, A. (2006). Quantitative Determination of Phenolic Compounds in Artichoke-Based Dietary Supplements and Pharmaceuticals by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54(23)**: 8812-8817
- SHIMODA, H., NINOMIYA, K., NISHIDA, N., YOSHINO, T., MORIKAWA, T., MATSUDA, H., YOSHIKAWA, M. (2003). Anti-Hyperlipidemic Sesquiterpenes and New Sesquiterpene Glycosides from the Leaves of Artichoke (*Cynara scolymus* L.): Structure Requirement and Mode of Action. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, **13**: 223-228
- SONNANTE, G., PIGNONE, D., HAMMER, K. (2007a). The Domestication of Artichoke and Cardoon: From Roman Times to the Genomic Age. *Annals of Botany*, **100**: 1095-1100
- SONNANTE, G., CARLUCCIO, A. V., VILATERSANA, R., PIGNONE, D. (2007b). On the origin of artichoke and cardoon from the *Cynara* gene pool as revealed by rDNA sequence variation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54**: 483-495
- SPERONI, E., CERVETALLATI, R., GOVONI, P., GUIZZARDI, S., RENZULLI, C., GUERRA, M. C. (2003). Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *Journal of Ethnopharmacology*, **86**: 203-211
- TANKER, N., KOYUNCU, M., COSKUN, M. (2004). *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, s.: 31
- UĞUR, A. (2008). Enginar Üretimi Ticareti ve Yakın Gelecekte Beklenen Gelişmelerin Ülkemiz Perspektifinde Değerlendirilmesi. Erişim: [www.ziraat.ktu.edu.tr/bahce/Atnan/enginar_ticareti.ppt]. Erişim Tarihi: 08.07.2009
- VIDELock, E. J., CHANG, L. (2007). Irritable Bowel Syndrome: Current Approach to Symptoms, Evaluation and Treatment. *Gastroenterology Clinics of North America*, **36**: 665-685
- WALKER, A. F., MIDDLETON, R. W., PETROWICZ, O. (2001). Artichoke Leaf Extract Reduces Symptoms of Irritable Bowel Syndrome in a Post-marketing Surveillance Study. *Phytotherapy Research*, **15**: 58-61

- WANG, M., SIMON, J.E., AVILES, I.F., HE, K., ZHENG, Q., TADMOR, Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**: 601-608
- WITTEMER, S. M., VEIT, M. (2003). Validated method for the determination of six metabolites derived from artichoke leaf extract in human plasma by high-performance liquid chromatography–coulometric-array detection. *Journal of Chromatography*, **793**: 367-375
- WITTEMER, S. M., PLOCH, M., WINDECK, T., MULLER, S. C., DREWELOW, B., DERENDORF, H., VEIT, M. (2005). Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine*, **12**: 28-38
- ZAPOLSKA-DOWNAR, D., ZAPOLSKA-DOWNAR, A., NARUSZEWICZ, M., SIENNICKA, A., KRASNODEBSKA, B., KOLODZIEJ, B. (2002). Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sciences*, **71**: 2897-2908
- ZHU, X., ZHANG, H., LO, R. (2004). Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52(24)**: 7272-7278
- ZHU, X., F., ZHANG, H., X., LO, R. (2005a). Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. *Fitoterapia*, **76**: 108-111
- ZHU, X., ZHANG, H., LO, R., LU, Y. (2005b). Antimicrobial Activities of *Cynara scolymus* L. Leaf, Head, and Stem Extracts. *Journal of Food Science*, **70(2)**: 149-152

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı : Serkan
 Soyadı : Özbilgin
 Doğum yeri ve tarihi : Antalya – 01.02.1983
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Bekar
 İletişim adresi : Anıttepe Mahallesi Nigar Sokak 8/10
 Maltepe/ANKARA
 Telefonu : 0 537 404 27 74

II. Eğitimi

1994-1989 Mehmet Akif Ersoy İlkokulu/Antalya
 2001-1994 Antalya Metin Nuran Çakallıklı
 Anadolu Lisesi
 2006-2002 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 ----- -2006 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 Farmakognozi Anabilim Dalı
 Yabancı Dili İngilizce

III. Ünvanları

2006 Eczacı

IV. Mesleki Deneyimi

2007-2006 Alp Eczanesi Mesul Müdürlüğü
 ----- -2007 Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
 Farmakognozi Anabilim Dalı

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Farmakognozi ve Fitoterapi Derneği (FFD)

VI. Bilimsel İlgili Alanları

Yayınları ve Tebliğleri:

- Özbilgin Serkan, Çitoğlu Saltan Gülçin (2009). High Performance Liquid Chromatographic Analysis Of Chlorogenic Acid Of *Cynara Scolymus* L. Plants from High Altitude – Phytochemistry and Bioactivity Obergurgl/Tyrol, Austria, 26 – 29 April 2009

VII. Bilimsel Etkinlikleri

Verdiği konferans ya da seminerler :

- 'Monascus Purpureus Went' (Çin Mayası) Eczacılıktaki Önemi ve Kullanımı' başlıklı seminer