



## Hplc Analysis of Certain Phenolic Compounds and Carotenoid in Two Calendula Species

Nergis Kaya<sup>1,a,\*</sup>, Cüneyt Akı<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Processing, Food Technology Program, Biga Vocational School, Eighteen Mart University of Çanakkale, 17200 Çanakkale, Turkey

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Molecular Biology USA, Terzioğlu Campus, Çanakkale Eighteen Mart University 17020 Çanakkale, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 20/11/2020 Accepted : 21/12/2020</p> <p>Keywords: Calendula HPLC Phenolic compounds Beta carotene Kaempferol</p>	<p><i>Calendula officinalis</i> (pot marigold), a medicinal ornamental plant belonging to the Asteraceae family, has various medicinal activities such as anticancer, antimicrobial, antioxidant and antitumor. The retention time of quercetin (6.445 min), kaempferol (11.246 min), caffeic acid (2.333 min), beta carotene (9.614 min) standards, which were planned to be analyzed by HPLC, was determined. The HPLC conditions that are most suitable for these metabolites have been determined. The amounts of quercetin, kaempferol, caffeic acid and beta carotene in the seedling leaves of these two <i>Calendula</i> species on the 0., 15., 30., 45., 60. days were compared. Caffeic acid and beta carotene have been detected in the leaves. However, quercetin and kaempferol compounds were not detected. It was determined that the caffeic acid and beta carotene amounts of <i>C. officinalis</i> species were higher than that of <i>C. arvensis</i>. The highest caffeic acid in both <i>C. officinalis</i> and <i>C. arvensis</i> seedlings (0.4042±0.0123 µg/g dry weight for <i>C. officinalis</i>, 0.1918±0.0437 µg / g dry weight for <i>C. arvensis</i>) and beta carotene amounts (0.8520±0.0692 µg/g dry weight for <i>C. officinalis</i>, 0.6389±0.0189 µg/g dry weight for <i>C. arvensis</i>) were determined on 60. day. In addition, it was determined that the amount of these metabolites differed according to the seedling development period.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 8(12): 2764-2769, 2020

## İki Calendula Türünde Belirli Fenolik Bileşiklerin ve Karotenoidin Hplc ile Analizi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 20/11/2020 Kabul : 21/12/2020</p> <p>Anahtar Kelimeler: Calendula HPLC Fenolik bileşikler Beta karoten Kaempferol</p>	<p>Asteraceae familyasına ait, tıbbi amaçla kullanılan bir süs bitkisi olan <i>Calendula officinalis</i> (tıbbi nergis, aynısefa) antikanser, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör gibi çeşitli tıbbi aktivitelere sahiptir. HPLC ile analizi yapılması planlanan kuersetin (6,445 dak), kaempferol (11,246 dak), kafeik asit (2,333 dak), beta karoten (9,614 dak) standartlarının en iyi piki ve en fazla miktarı verdiği tutulma zamanı belirlenmiştir. Bu metabolitler için en uygun olan HPLC koşulları saptanmıştır. Bu iki <i>Calendula</i> türünün 0., 15., 30., 45., 60. günlerindeki fide yapraklarındaki kuersetin, kaempferol, kafeik asit ve beta karoten miktarları karşılaştırılmıştır. Yapraklarda kafeik asit ve beta karoten tespit edilmiştir. Fakat kuersetin ve kaempferol bileşikleri tespit edilememiştir. <i>C. officinalis</i> türünün kafeik asit ve beta karoten miktarının, <i>C. arvensis</i> türüne göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. <i>C. officinalis</i> ve <i>C. arvensis</i> fidelerinin her ikisinde de en yüksek kafeik asit (<i>C. officinalis</i> için 0,4042±0,0123 µg/g kuru ağırlık, <i>C. arvensis</i> için 0,1918±0,0437 µg/g kuru ağırlık) ve beta karoten miktarları (<i>C. officinalis</i> için 0,8520±0,0692 µg/g kuru ağırlık, <i>C. arvensis</i> için 0,6389±0,0189 µg/g kuru ağırlık) 60. günde saptanmıştır. Ayrıca fide gelişim dönemine göre, bu metabolitlerin miktarının farklılık gösterdiği saptanmıştır.</p>

<sup>a</sup> [nergisskaya@gmail.com](mailto:nergisskaya@gmail.com)

<sup>id</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4206-1149>

<sup>b</sup> [cuneytaki@gmail.com](mailto:cuneytaki@gmail.com)

<sup>id</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7486-2282>



## Giriş

Süs bitkisi özellikleriyle bilinen *Calendula officinalis* (tıbbi nergis) L., Asteraceae (Compositae) familyasına ait tıbbi bir bitkidir. Tür 20 ila 40 cm boyunda büyüebilmektedir ve 20 çeşidi vardır. Çiçeği sarıdır. Kimyasal bileşenleri arasında triterpen glikozitler, triterpen alkoller, flavonol glikozitler, uçucu yağ, polisakkaritler bulunur (Gantait ve Chattopadhyay, 2005). Birçok çalışma, bitkinin anti-kanser gibi farmakolojik etkilere sahip olduğunu bildirmiştir (Teiten ve ark., 2013). Bitkinin anti-mikrobiyal (Vieira ve ark., 2014), anti-HIV (Kalvatchev ve ark., 1997), antioksidan (Babaee ve ark., 2013), sitotoksik, anti-tümör (Ukiya ve ark., 2006), anti-inflamatuar (Ukiya ve ark., 2006) olduğu ve venöz ülser tedavisinde (Duran ve ark., 2005) kullanıldığı bilinmektedir.

*Calendula* cinsi 25 tür içerir. Bunlardan en yaygın olanlarının *C. officinalis* L., *C. arvensis* M. Bieb., *C. suffruticosa* Vahl, *C. stellata* Cav., *C. tripterocarpa* Rupr., *C. alata* Rech.f olduğu bilinmektedir (Goncariuc, 2003). *C. officinalis* türlerinin farmakolojik aktivite açısından *C. arvensis* türlerine göre daha etkili olduğu bilinmektedir. *Calendula* cinsinde *C. officinalis* türünden sonra *C. arvensis* türünün farmakolojik aktivite açısından önemli olduğu bildirilmiştir. *C. officinalis* ve *C. arvensis* türlerinin yaprak ve çiçekleri tıbbi tedavide kullanılmıştır (Kemper, 1999).

Kafeik asit, antioksidan (Vieira ve ark., 1998), anti-tümör (Tanaka ve ark., 1993), anti-inflamatuar (Fernandez ve ark., 1998) aktiviteye gibi tıbbi aktivitelere sahiptir. Menopoz öncesi kadınlarda yaşa bağlı makula dejenerasyonu ve meme kanseri riskini azaltmak için kullanıldığı tespit edilmiştir (Gandini ve ark., 2000).

Beta karotenin düşük kısmi oksijen basıncında immünomodülatör ve peroksi serbest radikal reaksiyonlarının inhibisyonu gibi özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir (Wang ve ark., 1999). Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek beta karoten alımının kanser ve kalp hastalığı gibi çeşitli hastalıkların riskini azalttığını göstermiştir (Ziegler ve ark., 1996).

Araştırmanın amacı, *C. officinalis* ve *C. arvensis* in vivo yetiştirilen fidelerin (farklı gelişim aşamalarında) yapraklarında üretilen kuersetin, kaemferol, kafeik asit ve beta karoten bileşiklerini HPLC ile araştırmak ve karşılaştırmaktır.

## Materyal ve Yöntem

### Bitkisel Materyal

*C. officinalis* ve *C. arvensis* tohumları Ceylan Tarım firmasından satın alınmıştır.

### Fenolik Bileşiklerin ve Karotenoidin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analizi

Sekonder metabolit analizi amacıyla in vivo olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* fidelerinin yapraklarında kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten miktarı HPLC ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, öncelikle bu sekonder metabolitlere ait standartların uygun konsantrasyonlardaki solüsyonlarının hazırlandığı çözücülerle paralel olarak örneklerden ekstratlar hazırlanmıştır.

### Standartların Hazırlanışı

Kullanılan standartlarının her birinin stok solüsyonları ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle kuersetin, kaemferol, kafeik asit standartları metanol (CH<sub>3</sub>OH); beta karoten standardı n-hekzan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), aseton (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) ile çözülerek her bir standardın ayrı stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra kuersetin standardı aseton ve etanol içinde çözülmüştür. Standartlar için en iyi pikleri; örnekler için en iyi pikleri ve en fazla miktarı veren çözücüler seçilerek çalışmaya devam edilmiştir.

Kuersetin (Roth, Kuersetin dihidrat, >%95, Art.-Nr. 2629.2, HPLC, 50g), Kaemferol (Roth, Rotichrom HPLC, Art. Nr. 7503.1, 10mg) ve kafeik asit (Roth, >%98, Art.-Nr. 5869.3, 5g) standartlarının metanol ile hazırlanan 10 ppm (mg/l) konsantrasyonundaki stok solüsyonundan 8, 6, 4, 2 ppm konsantrasyonlarına seyreltme yapılmıştır. Beta karoten standardı (%97, AB 139265, 1g) stok solüsyonu, aseton (LiChrosolv, for HPLC) ile 50 ppm konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Standart hazırlanması esnasında Chen ve Yang (1992)'ın ve Bhatnagar-Panwar (2015)'in kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Bu stok solüsyondan 25, 15, 5, 1 ppm konsantrasyonlarına aseton ile seyreltme yapılmıştır.

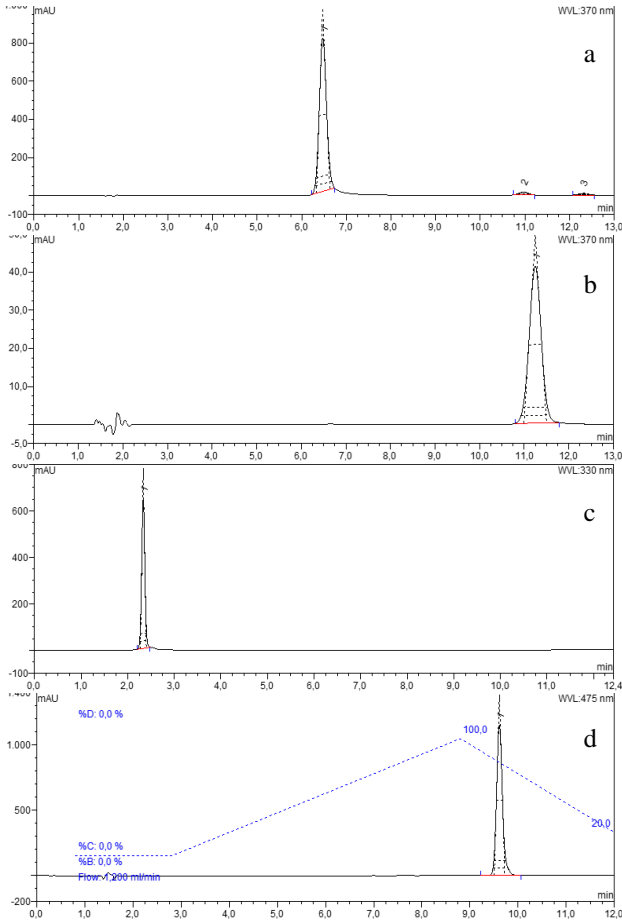
### Yapraklardan Fenolik Bileşiklerin ve Karotenoidin Ekstraksiyonu

In vivo koşullarda yetiştirilen 15, 30, 45, 60 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* fide yapraklarından fenolik bileşiklerin ve karotenoidlerin analizi amacıyla ekstraksiyon yapılmıştır. Fenolik bileşiklerin flavonol grubundaki kuersetin ve kaemferol; fenolik asitler grubundaki kafeik asit bileşikleri Rigane ve ark. (2013) ve Riedel ve ark. (2010) uyguladıkları yöntem değiştirilerek uygulanmıştır.

- Her örnekten 0,5 g tartılmıştır. Üzerine 2 ml metanol ilave edilerek soğuk havanda havan tokmağı ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.
- Ekstrakte edilen örnek, tüpe aktarılarak 5dak, 4500rpm'de, +4°C'de santrifüj edilmiştir.
- Üstte toplanan süpernatant alınarak tüpe aktarılmıştır.
- Süpernatantlar, su banyosunda 55°C sıcaklıkta konsantre edilerek MeOH'ın uçması sağlanmıştır.
- Ardından kalan tortu metanolde çözülmüştür.

Terpenlerin karotenoidler grubundaki beta karoten bileşimini belirlemek için Bhatnagar-Panwar ve ark. (2015) uyguladıkları yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Temel olarak fenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan metot kullanılmıştır. Sadece örneklerin ekstraksiyonunda ve su banyosundan sonra kalan tortuyu çözmek için aseton kullanılmıştır.

Sekonder metabolit standard solüsyonları ve ekstraksiyonu yapılarak hazırlanan örnekler 0,20 µm çapında membran filtreden (non-pirojenik, sartorius stedium biotech) geçirilerek viyallere aktarılmıştır ve HPLC'ye 20µl hacimde enjekte edilmiştir. C18 kolonu (GL Sciences Inc., Intersil ODS-3, 5µl molekül çapı, 4,6×150mm ebatı, S/N. 1A5151685, C/N. 5020-01731) kullanılmıştır.



Şekil 1. Kuersetin (a), kaemferol (b), kafeik asit (c), beta karoten (d) standartlarına ait kromatogramlar  
Figure 1. Chromatograms of quercetin (a), caemferol (b), caffeic acid (c), beta carotene (d) standards.

Çizelge 1. Kuersetin, kaemferol, kafeik asit, beta karoten standartlarının HPLC sonuçları

Table 1. HPLC results of quercetin, caemferol, caffeic acid, beta carotene standards

Standard	Tutulma Zamanı (dak.)	Pik Alanı	Miktar (µg/g)
Kuersetin	6,445	151,629	3,056
Kaemferol	11,246	5,72	0,704
Kafeik Asit	2,333	30,756	0,62
Beta Karoten	9,614	165,979	3,94

Çizelge 2. Kafeik asit açısından günlere ve bitki türlerine göre tanımlayıcı istatistikler ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Table 2. Descriptive statistics and Tukey Multiple Comparison Test results in terms of caffeic acid by days and plant species

Day	C. officinalis $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (µg/g kuru ağırlık)	C. arvensis $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ (µg/g kuru ağırlık)
0.gün	0,0089 ± 0,0004Ca	0,0049 ± 0,0004Ba
15.gün	0,0143 ± 0,0004Ca	0,0064 ± 0,0020Ba
30.gün	0,0269 ± 0,0009Ca	0,0146 ± 0,0012Ba
45.gün	0,0809 ± 0,0025Ba	0,0499 ± 0,0094Ba
60.gün	0,4042 ± 0,0123Aa	0,1918 ± 0,0437Ab

Aynı türde farklı büyük harflerle gösterilen gün ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $P \leq 0,05$ ). Aynı gün içinde farklı küçük harflerle gösterilen tür ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $P \leq 0,05$ ).

### HPLC Koşulları

Standartların tümü metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Sigma Aldrich 34851, for hplc, gradient grade): %5 asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Sigma Aldrich 27225) (ultra pure saf su ile hazırlanmıştır) [20: 20: 60] mobil fazında (pH: 2,75), 1ml/dak. akış hızında HPLC cihazında (Thermo Scientific, Dionex Ultimate 3000) okutulmuştur. Örnekler 10 dak. süresince okutulmuştur. Fenolik bileşiklerin analizi için bu yöntem uygun bulunmuştur. HPLC kolonunun sıcaklığı  $40^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmıştır. Her bir örnek 280 nm, 330 nm (Rigane ve ark., 2013), 370 nm (Palacio ve ark., 2012) ve 450 nm (Dumbrava ve ark., 2013), 475 nm (Radu ve ark., 2012; Linga Rao ve Savithramma, 2014) dalga boylarında 10 dak. süre ile HPLC'de okutulmuştur. Bu HPLC koşullarında, 280 nm ve 330 nm'de aseton ile hazırlanan beta karoten standardının stok solüsyonu pik vermiştir. Fakat literatürde böyle bir bilgi olmadığı için beta karoten için farklı bir metot kullanılmıştır.

HPLC ile beta karoten analizi amacıyla metanol: asetonitril: kloroform (LiChrosolv, for liquid chromatography) (50: 40: 10 v/v/v) olarak solvent A ve metanol: asetonitril: kloroform (35: 35: 30 v/v/v) olarak solvent B mobil faz (pH: 10,26) olarak kullanılmıştır. İlk 2 dak solvent A, sonraki 6 dak solvent B ve ardından 4 dak solvent A olarak ayarlanarak mobil faz, multistep gradient şeklinde 1,2 ml/dak akış hızında HPLC cihazına verilmiştir. Örnekler 20 µl hacimde HPLC'ye enjekte edilerek her bir örnek 12 dak süresince HPLC'de okutulmuştur. HPLC kolonunun sıcaklığı  $30^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmıştır (Bhatnagar-Panwar ve ark., 2015). Beta karoten analizi amacıyla HPLC cihazı 450 nm (Dumbrava ve ark., 2013), 455 nm (Strati ve ark., 2012; El-Qudah, 2014), 461 nm (Varzakas ve Kiokias, 2016), 475 nm (Olives Barba ve ark., 2006; Radu ve ark., 2012) dalga boyuna ayarlanmıştır.

Belirtilen mobil fazlar, öncelikle 15 dak. süreyle sonikatör (Bandelin Sonorex) ile sonike edilerek homojenizasyonu tamamlandıktan sonra HPLC'ye verilmiştir.

Bitki örneklerinden HPLC'de 2 tekrarlı olarak okuma yapılmıştır. Standartların her birinin enjeksiyonları HPLC'de ayrı ayrı yapılmıştır. Ayrıca kuersetin, kaemferol, kafeik asit standartlarının (MeOH'da çözünen) her birinin 10 ppm konsantrasyonda eklenmesiyle oluşturulan ana standard solüsyonu HPLC'ye enjekte edilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

#### Fenolik Bileşiklerin ve Karotenoid Standard Solüsyonlarının Hazırlanmasına Dair Bulgular

HPLC'de standartların okutulması sonucu her bir sekonder metabolit standardına ait pikin tutulma zamanı ve pik alanı belirlenmiştir. Kuersetin ve kaemferol standartları 370 nm'de; kaemferol standardı 330 nm'de; beta karoten standardı 450, 455, 461 ve 475 nm'de pik vermiştir. Fakat beta karoten standard solüsyonu en iyi piki ve tutulma zamanını 475 nm'de vermiştir. Kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm), kafeik asit (10 ppm) ve beta karoten (50 ppm) standartlarının her birinin ayrı ayrı HPLC'de okutulması sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 1'de verilmiştir.

Metanol ile hazırlanan kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm) ve kafeik asit (10 ppm) standartlarının üçünü birden ihtiva eden numune HPLC'de okutulduğunda, her üç standardın 330 nm'de pik verdiği belirlenmiştir (Şekil 2).

Çizelge 3. Beta karoten açısından günlere ve bitki türlerine göre tanımlayıcı istatistikler ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Table 3. Descriptive statistics and Tukey Multiple Comparison Test results in terms of beta carotene according to days and plant species

Day	<i>C. officinalis</i> $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ( $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)	<i>C. arvensis</i> $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ( $\mu\text{g/g}$ kuru ağırlık)
0.gün	0,0221 $\pm$ 0,0034Ca	0,0151 $\pm$ 0,0004Ca
15. gün	0,271 $\pm$ 0,0035Ca	0,0201 $\pm$ 0,0006Ca
30. gün	0,0539 $\pm$ 0,0068Ca	0,0411 $\pm$ 0,0013BCa
45. gün	0,1619 $\pm$ 0,0205Ba	0,1260 $\pm$ 0,0038Ba
60. gün	0,8520 $\pm$ 0,0692Aa	0,6389 $\pm$ 0,0189Ab

Aynı türde farklı büyük harflerle gösterilen gün ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $P \leq 0,05$ ). Aynı gün içinde farklı küçük harflerle gösterilen tür ortalamaları arasındaki farklar önemlidir ( $P \leq 0,05$ ).

Kuersetin, kaemferol, kafeik asit (10 ppm) ve beta karoten (50 ppm) standard stok solüsyonlarından seyreltilerek hazırlanan ve 3 tekrarlı olarak HPLC'de okutulan standard solüsyonlarından ppm'e karşılık gelen alan verileri ile oluşturulan doğrusal kalibrasyon eğrileri ve elde edilen denklemler (yordama eşitliği ve yordama katsayısı) Şekil 3-6'da gösterilmiştir.

Metanol ile çözülen kuersetin (10 ppm), kaemferol (10 ppm), kafeik asit (10 ppm) standardına ve aseton ile çözülen beta karoten (50 ppm) standardına ait pikin tutulma zamanı, pik alanı ve miktarı Çizelge 1'de belirtilmiştir.

#### İki Calendula Türünün Yapraklarında HPLC ile Analiz Edilen Fenolik Bileşikler ve Karotenoid Miktarları

*In vivo* olarak yetiştirilen 0, 15, 30, 45, 60 günlük *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarından elde edilen HPLC analiz sonuçlarına ait kafeik asit ve beta karoten ortalama miktarları ( $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık) ve standard hataları belirlenmiştir (Çizelge 2, Çizelge 3). Kuersetin ve kaemferol bileşikleri iki *Calendula* türünün yaprağında da saptanmamıştır. Kafeik asit ve beta karoten miktarına ilişkin istatistiksel sonuçlarımız Çizelge 2 ve Çizelge 3'te gösterilmiştir. Atmış günlük *C. officinalis* fide yapraklarında *C. arvensis* fide yapraklarındakine göre kafeik asit miktarı istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bitki gelişim dönemi arttıkça yapraklarda daha fazla kafeik asit ve beta karoten miktarının biriktiği belirlenmiştir (Çizelge 2, Çizelge 3). Bitki gelişim dönemi arttıkça her iki türde de beta karoten miktarının arttığı belirlenmiştir. Altmış günlük fidelerde, *C. officinalis* yapraklarında *C. arvensis* yapraklarına göre daha fazla beta karoten birikimi belirlenmiştir (Çizelge 3).

Anca ve ark. (2012), *C. officinalis* ile ilgili yaptıkları araştırmada HPLC analizlerine göre kafeik asit miktarını 148,3  $\mu\text{g/g}$  ve toplam fenolik türevlerinin konsantrasyonunu 2195,0  $\mu\text{g/g}$  olarak saptamışlardır. Araştırmamızda *in vivo* olarak yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında 60. günde saptanan kafeik asit miktarları sırası ile 0,425 ve 0,243  $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Ćurković-Perica ve ark. (2014), Asteraceae familyasından *C. rupestris* türü ile ilgili yaptıkları araştırmada, en yüksek kafeik asit miktarının *in vivo* olarak yetiştirilen yapraklarda 789,84  $\mu\text{g/g}$ , bunu takiben çiçeklerde 109,18  $\mu\text{g/g}$  ve köklerde 99,34  $\mu\text{g/g}$  kuru ağırlık

olarak belirlemişlerdir. Bunghez ve Ion (2011), *C. officinalis* yaprak ve çiçek kısımlarından UV-VIS ve FT-IR spektrofotometrik yöntemleri ile beta karoten pigmentinin çok miktarda bulunduğunu ortaya koymuştur. Bakó ve ark. (2002), *C. officinalis* köklerinin, yapraklarının, petallerinin ve polenlerinin karotenoid bileşiminin analizini HPLC ile yapmışlardır. Yapraklarda çoğunlukla  $\beta$ -karoten bileşiklerinin olduğu saptanmıştır. Britton ve ark. (1995), tipik yeşil dokuların bileşimi arasında çeşitli karotenoidlerin yanı sıra  $\beta$ -karoten bileşimini de içerdiğini tespit etmiştir. Nan ve ark. (2012), *Inula helenium* L. (Asteraceae) yapraklarında, temel olarak %38,7  $\beta$ -karoten olduğunu ve 18,84  $\mu\text{g/g}$  bulunduğunu saptamıştır. Yapraklardaki toplam karotenoid miktarı (48,7  $\mu\text{g/g}$  taze ağırlık) olarak belirlenmiştir. İnfloresanslarında ise beta karoten miktarı 1,33  $\mu\text{g/g}$  olarak saptanmıştır. Tamamlanan araştırmamızda *C. officinalis* ve *C. arvensis* yaprak ekstraktlarında beta karoten varlığı saptanmıştır. *C. officinalis* türündeki beta karoten miktarının fazlalığı dikkati çekmektedir. Dumbrava ve ark. (2013), *C. officinalis* çiçeklerinden petroleum eter: etanol %96 (8:2, v/v) olarak hazırlanan çözücü kullanılarak ekstrakt hazırlamıştır. Toplam karotenoidler ve  $\beta$ -karoten RP-HPLC ile belirlenmiştir. *C. officinalis* çiçeklerinden hazırlanan karotenoid ekstreğinde en yüksek toplam karotenoid miktarı (1667,42  $\mu\text{g/g}$ ) ve  $\beta$ -karoten miktarı (145,45  $\mu\text{g/g}$ ) saptanmıştır. Chakraborty ve ark. (2010), *C. officinalis* çiçeklerini kurutarak metanol ekstraktlarını hazırlamışlardır. Bu ekstrakt içinde bulunan kuersetin miktarını HPTLC analizi ile belirlemişlerdir. Bu yöntemin rutin olarak kullanılan diğer kuersetin belirleme yöntemlerine göre daha hızlı ve ucuz olduğunu saptamışlardır. Sujatha ve ark. (2011), *C. officinalis* türünün çiçeklerinde yaptıkları HPLC analizinde kuersetin bileşimini %8,72 olarak belirlemişlerdir.

Kafeik asit (Flamini ve ark., 2001), kuersetin-3-O-rutinosit (Beck ve Häberlein., 1999), kuersetin-3-O-glukosit (Manguro ve ark., 2003), kuersetin-3-O-(6-O-malonil)-glukosit (Katsube ve ark., 2006) *A. weberbaueri*'de tespit edilmiştir. Benzer şekilde, kuersetin-3-O-glukoronit *T. diversifolia*'de saptanmıştır (Bouktaib et al., 2002). Çalışmamızla uyumlu olarak, kafeik asit ester türevlerinin Asteraceae'de yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir (Ccana-Ccapatinta ve ark., 2018). Kuersetin ve kaemferol bileşikleri, Asteraceae familyasının taksonomik belirteçleridir (Calabria ve ark., 2007). *Serratula coronata* L.'de karoten varlığı saptanmıştır. Üçüncü yılındaki *S. coronata* bitkilerinin en yüksek karoten miktarını içerdiği belirlenmiştir (Ивашенко ve ark., 2019). *C. officinalis* yaprakları, petalleri ve polenlerinin metanol ekstreğinin birçok karotenoidi içerdiği saptanmıştır. Polen, yaprak, sap ve petallerde bulunan karotenoidlerden biri de beta karotendir. Yapraklarda bulunan toplam karotenoidlerin %85 olduğu belirtilmiştir (Bako ve ark., 2002; Goodwin, 1954). *C. officinalis* etanol ekstraktından kuersetin izole edilmiştir (Kurkin ve Sharova, 2007). *A. argentea*, *A. macbrideana* ve *A. weberbaueri*'de kafeik asit ester türevlerinin bulunması sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir (Ccana-Ccapatinta ve ark., 2019).

Pehlivan ve Sevindik (2018), *Salvia multicaulis*'in yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini tespit etmiştir. Fakat yüksek oksidatif stres nedeniyle bitkinin aşırı

tüketilmesinden kaçınılması gerektiği belirtilmiştir. Bitkinin doğal bir antioksidan ve antimikrobiyal kaynak olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Sevindik ve ark. (2017), *Mentha longifolia* L. Hudson subsp. *Longifolia*'nın etanol ekstraktlarının doğal antioksidan ve antimikrobiyal kaynak olarak kullanılabilmesini belirtmiştir. Mohammed ve ark. (2019), *Adiantum capillus-veneris*'in yaprak ekstraktlarının DNA koruyucu aktivitesinin pozitif kontrol ile karşılaştırıldığına zayıf olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, HPLC analizlerinde kateşin, kinnamik asit, klorojenik asit, kafeik asit, p-kummerik asit, rosmarinik asit ve 4-hidroksibenzoik asit saptanmıştır. *A. capillus-veneris*'in farmakolojik olarak potansiyel bir doğal kaynak olabileceği belirtilmiştir.

### Sonuç

*In vivo* şartlarda yetiştirilen *C. officinalis* ve *C. arvensis* yapraklarında kuersetin, kaemferol, kafeik asit ve beta karoten miktarları araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle standartların en iyi pikleri ve en yüksek miktarı verdiği çözücüler belirlenmiştir. Sonrasında bu çözücüler ile iki *Calendula* yaprağından ekstraksiyon yapılmıştır. Araştırılan sekonder metabolitler için en uygun olan HPLC koşulları belirlenmiştir. İki *Calendula* türünün yapraklarında kafeik asit ve beta karoten saptanırken, kuersetin ve kaemferol saptanmamıştır.

### Teşekkür

Bu araştırma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen FDK 2015-401 nolu projenin bir bölümünden oluşmaktadır. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederiz.

### Kaynaklar

Anca B, Ranga F, Fetea F, Zăgrean F, Socaciu C. 2012. Fingerprint and Quantification of Phenolic Derivatives in *Melissa off.* and *Calendula off.* Extracts in Relation to Their Antioxidant Potential. *Hop and Medicinal Plants* 20: 80-86 pp.

Babae N, Moslemi D, Khalilpour M, Vejdani F, Moghadamnia Y, Bijani A, Baradaran M, Kazemi MT, Khalilpour A, Pouramir M, Moghadamnia AA. 2013. Antioxidant capacity of *Calendula officinalis* flowers extract and prevention of radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. *J. Pharm. Sci.* 7: 21(1)-18.

Bakó E, Deli J, Toht G. 2002. HPLC Study on The Carotenoid Composition of *Calendula* Products. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 53: 241-250.

Beck MA, Häberlein H. 1999. *Phytochemistry* 50: 329-332.

Bhatnagar-Panwar M, Bhatnagar-Mathur P, Bhaaskarla VV, Dumbala SR, Sharma KK. 2015. Rapid, accurate and routine HPLC method for large-scale screening of pro-vitamin A carotenoids in oilseeds. *Plant Biochem Biotechnol* 24: 84-92.

Bouktaib M, Atmani A, Rolando C. 2002. *Tetrahedron Lett.* 43, 6263.

Britton G, Liaen-Jensen S, Pfander H (eds) 1995. *Carotenoids. Isolation and Analysis.* Vol. 1A, Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin, 20-236.

Bunghaz IR, Ion RM. 2011. Complex Spectral Characterization of Active Principles from Marigold (*Calendula officinalis*). *J Sci Arts* 1: 59-64.

Calabria LM, Emerenciano VP, Ferreira MJP, Scotti MT, Mabry TJ. 2007. *Nat. Prod. Commun.* 22: 77-285.

Ccana-Ccpatinta GV, Ferreira PL, Groppo M, Da Costa FB. 2019. Caffeic acid ester derivatives and flavonoids of genus *Arnaldoa* (Asteraceae, Barnadesioideae). *Biochem Syst Ecol*, 86, 103911.

Ccana-Ccpatinta GV, Monge M, Ferreira PL, Da Costa FB. 2018. *Phytochemistry Rev.* 17: 471-489.

Chakraborty GS. 2010. Phytochemical Screening of *Calendula officinalis* Linn. Leaf Extract by TLC. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 1: 131-134.

Chen BH, Yang SH. 1992. An Improved Analytical Method for the Determination of Carotenoids and Xanthophylls in Dried Plant Materials and Mixed Feeds. *Food Chem* 44: 61-66.

Ćurković-Perica M, Likić S, Rusak G. 2014. Phenolic Compounds in *Centaurea rupestris* Tissues and Their Antiphytoviral Activity. *Croat. Chem. Acta.* 87: 79-84.

Dumbravă DG, Hădăruță NG, Moldovan C, Raba DN, Popa MV. 2013. Obtaining and Comparative Analysis of Some Carotenoidic Extracts from Marigold (*Calendula officinalis* L.) Flowers and Celandine (*Chelidonium majus* L.) Flowers. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 19: 74-78.

Duran V, Matic M, Jovanovic M, Mimica N, Gajinovic Z, Poljacki M, Boza P. 2005. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *Int. J. Tissue React* 27: 101-106.

El-Qudah JM. 2014. Contents of Chlorophyll and Carotenoid Pigments in Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *World Applied Sciences Journal* 29: 1277-1281.

Fernandez MA, Saenz MT, Garcia MD. 1998. Antiinflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. *J. Pharm. Pharmacol* 50: 1183-1186.

Flamini G, Antognoli E, Morelli I. 2001. *Phytochemistry* 57: 559-564.

Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. 2000. Meta-analysis of Studies on Breast Cancer Risk and Diet: The Role of Fruit and Vegetable Consumption and The Intake of Associated Micronutrients. *Eur. J. Cancer* 36: 636-646.

Gantait S, Chattopadhyay TK. 2005. Agrotechniques to maximize productivity of hydroalcoholic extract from medicinal garden herb *calendula*. *J Nat Prod Rad* 4: 113-116.

Goncariuc M. 2003. Contributions to *Calendula officinalis* L. Breeding. *Bul Acad Stiinte. a Mold, Stiinte Biol. Chimsi Agric* 2: 101-103.

Goodwin TW. 1954. Studies in carotenogenesis: the carotenoids of the flower petals of *Calendula officinalis*. *Biochem J*, 58: 90-94.

Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. 1997. Anti-HIV Activity of Extracts from *Calendula officinalis* Flowers. *Biomed Pharmacother*, 51: 176-80.

Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yamane Y. 2006. *Food Chem.* 97: 25-31.

Kemper KJ. 1999. *Calendula (Calendula officinalis)*. The Longwood Herbal Taskforce and the center for Holistic Pediatric Education and Research, 767 p.

Kurkin VA, Sharova OV. 2007. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. *Khim Prirod. Soed.* 2: 179-180.

Linga Rao M, Savithamma N. 2014. Isolation and Identification of Phenolic compounds by HPLC and Electrospray Ionization Mass Spectrometry of *Svensonia Hyderabadensis* - A Rare Medicinal Plant Taxon. *Int. J. Drug Dev. and Res* 6: 199-207.

Manguro LO, Ugi I, Lemmen P, Hermann R. 2003. *Phytochemistry* 64: 891-896.

Mohammed FS, Sevindik M, Bal C, Akgül H, Selamoglu Z. 2019. Biological Activities of *Adiantum capillus-veneris* Collected from Duhok Province (Iraq). *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology* 28: 128-142.

Nan M, Pinteau A, Bunea A, Eşianu S, Tămaş M. 2012. HPLC Analysis of Carotenoids from *Inula helenium* L. Flowers and Leaves. *Farmacia* 60: 501-509.

- Olives Barba AI, Camara Hurtado M, Sanchez Mata MC, Ferná'ndez Ruiz V, Tejada ML. 2006. Application of a UV-Vis Detection-HPLC Method for a Rapid Determination of Lycopene and B-Carotene in Vegetables. *Food Chemistry* 95: 328-336.
- Palacio L, Cantero J, Cusido RM, Goleniowski ME. 2012. Phenolic Compound Production in Relation to Differentiation in Cell and Tissue Cultures of *Larrea divaricate* (Cav.). *Plant Sci* 193-194: 1-7.
- Pehlivan M, Sevindik M. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 6: 628-631.
- Radu GL, Litescu SC, Albu C, Teodor E, Truica G. 2012. Beta-Carotene and Lycopene Determination in New Enriched Bakery Products by HPLC-DAD Method. *Romanian Biotechnological Letters* 17: 7006-7012.
- Riedel H, Cai Z, Kütük O, Smetanska I. 2010. Obtaining Phenolic Acids from Cell Cultures of Various *Artemisia* species. *African Journal of Biotechnology* 9: 8805-8809.
- Rigane G, Ben Younes S, Ghazghazi H, Ben Salem R. 2013. Investigation into The Biological Activities and Chemical Composition of *Calendula officinalis* L. Growing in Tunisia. *I.F.R.J* 20: 3001-3007.
- Sevindik M, Akgul H, Pehlivan M, Selamoglu Z. 2017. Determination of therapeutic potential of *Mentha longifolia* ssp. *longifolia*. *Fresen Environ Bull* 26: 4757-4763.
- Strati IF, Sinanoglou VJ, Kora L, Miniadis-Meimaroglou S, Oreopoulou V. 2012. Carotenoids from Foods of Plant, Animal and Marine Origin: An Efficient HPLC-DAD Separation Method. *Foods* 1: 52-65.
- Sujatha K, Chitra K, Poliseti H, Karri S, Nimmalapudi S, Reddy C.U. 2011. Standardization of *Calendula officinalis* Linn. with Reference to Quercetin by High Performance Thin Layer Chromatography. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1: 789-792.
- Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, Mori H. 1993. Inhibition of 4-Nitroquinoline- 1-Oxide-Induced Rat Tongue Carcinogenesis by The Naturally Occurring Plant Phenolics Caffeic, Ellagic, Chlorogenic and Ferulic Acids. *Carcinogenesis* 14: 1321-1325.
- Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. 2013. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem Pharmacol* 86: 1239-1247.
- Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. 2006. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. *J Nat Prod* 69: 1692-6.
- Varzakas T, Kiokias S. 2016. HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigments in Commercially Available Plant Extracts. *Curr. Res. Nutr. Food Sci. Jour* 4: 1-14.
- Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L. 1998. Cholesteryl Ester Hydroperoxide Formation in Myoglobin-Catalyzed Low Density Lipoprotein Oxidation. Concerted Antioxidant Activity of Caffeic and p-Coumaric Acids with Ascorbate. *Biochemical Pharmacology* 55: 333-340.
- Wang XD, Russell RM. 1999. Procarcinogenic and Anticarcinogenic Effects of Beta-Carotene. *Nutr Rev* 57: 263-272.
- Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. 1996. Nutrition and Lung Cancer. *Cancer Causes Control* 7: 157-177.
- Івашенко ІВ, Рахметов Д.Б, Вергун ОМ. 2019. Biochemical features of the introduced population of *Serratula coronata* L. (Asteraceae) in Central Polissia of Ukraine. *Plant varieties studying and protection*, 15: 200-205.