

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

***Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*  
Bitkisinin Antosiyanidinlerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması**

**Tezin Sunum Tarihi: 08/07/2013**

**Emre YAZICI**

**Tez Danışmanı:**

**Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY**

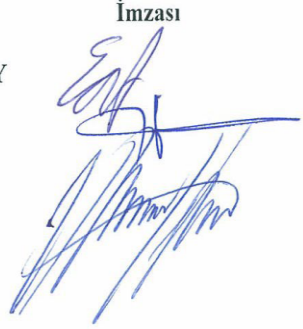
**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**RİZE 2013**

T.C.  
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

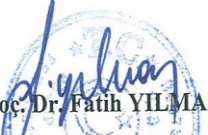
**TEZ ADI:**  
*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*  
Bitkisinin Antosiyanidinlerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması

Bu çalışma, 08 / 07 / 2013 tarihinde yapılan sınav ile Kimya Anabilim Dalı'nda  
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı, Soyadı	İmzası
Tez Danışmanı	: Yrd. Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Oktay TORUL	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK	

ONAY

08 / 08 / 2013

  
Doç. Dr. Fatih YILMAZ  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ÖNSÖZ

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

Eğitim hayatımın bu önemli döneminde bana yardım eden herkese,

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

Çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzman Adem DEMİR'e, aynı laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Kübra ÇAKIR'a, Fatih KOCAİMAMOĞLU'na, Ali DAĞ'a

Bitkilerin toplanıp kurutulmasında bana yardımcı olan baharatçı Mustafa LEZGİOĞLU'na

ve

Bütün hayatım boyunca bana güvenip her türlü desteği sağlayan Aileme, kardeşlerim Ramazan, Mesut ve Yasemin'e

Annem Nazmiye YAZICI ve rahmetli babam Ayhan YAZICI'ya

Bana öğrettikleri insani ve ahlaki değerlerin yanında kesintisiz maddi destekleri için,

Sonsuz Teşekkürler.

## ÖZET

### ***Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* Bitkisinin Antosiyanidinlerinin HPLC-UV ile Aydınlatılması**

Birçok meyve ve sebze de doğal olarak bulunan fenolik bileşikler, sahip oldukları antioksidan, antiviral ve antitümör gibi önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilgi çekmektedir. Antosiyanidinler, flavonoid grubunda yer alan renkli fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bitkiler tarafından ikincil metabolitler olarak sentezlenmektedir. Bir kekik türü olan Anzer çayı (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*) Anzer balını oluşturan bitkilerdendir ve yerel halk tarafından şifa kaynağı olarak kullanılır. Renkli çiçeklere sahip olan bitkinin antosiyanidinlerinin HPLC-UV ile analizleri bu tez çalışmasında yapıldı.

Antosiyanidinlerin HPLC-UV analizleri için öncelikle uygun metot geliştirildi. Anzer çayından antosiyanidinleri izole etmek için uygun iki ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemlerden birinde ekstraktın bir kısmına asit hidrolizi uygulanarak hidrolizin etkisi incelendi. Ayrıca kararsız bileşikler olan antosiyanidinlerin kararlılığı, pH 1'de, 1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda hazırlanan siyanidin standardı ve hidrolizli ve hidrolizsiz elde edilen Anzer çayı ekstraktlarının, -18 °C'de zamana bağlı miktar değişimleri 50 gün boyunca, HPLC-UV analizleri kullanılarak incelendi.

Anzer çayı ekstraktlarında, siyanidin ve pelargonidin tespit edildi. Hidrolizli ve hidroliz edilmeyen ekstraktlar karşılaştırıldığında, hidrolizden önce 11 pik gözlenirken hidrolizin ardından pik sayısı siyanidin dahil 3'e düşmüştür. Hidrolizli ekstrakttaki siyanidin miktarı diğer iki pikin siyanidin eşdeğerine göre 2,28 ve 10,55 kat daha fazladır. Bu veriler ışığında bitkinin başlıca siyanidin glikozitlerince zengin bir antosiyanin içeriğine sahip olduğu sonucuna varıldı.

HPLC-UV analizlerine göre, siyanidin standardının her analiz gününde sürekli dondurucudan çıkarılan 1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup> çözeltilerinin konsantrasyonları 50 gün sonunda yaklaşık %60 ve %90 azaldı. Sadece belirlenen günde dondurucudan çıkarılan çözeltilerinde ise konsantrasyon kaybı yaklaşık %20 olarak belirlendi. Anzer çayı ekstraktlarındaki siyanidininin 50 gün sonundaki konsantrasyon kayıplarının benzer şekilde %85 kadar olduğu gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Antosiyanidin, Anzer çayı, HPLC-UV, siyanidin kararlılığı.

## SUMMARY

### Elucidation of anthocyanidins of *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* by HPLC-UV

Phenolic compounds, found naturally in many fruits and vegetables, attract attention because they have important biological activities such as antioxidant, antiviral and antitumor. Anthocyanidins are colorful phenolic compounds placed in the group of flavonoids. Phenolic compounds are synthesized by plants, as secondary metabolites. Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*), as a type of thyme, is in a herbs constituting Anzer honey and used as a healing source by local people. Plant with colorful flowers was analyzed by HPLC-UV for its anthocyanidin in this thesis.

An appropriate method has been developed primarily for HPLC-UV analysis of anthocyanidins. Two suitable extraction method was used to isolate anthocyanidins from Anzer tea. The effect of the hydrolysis was examined applying acid hydrolysis on the some part of the one of these methods. Also the stability of anthocyanidins, known as unstable compounds, was investigated with cyanidin standard at two different concentrations  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  prepared in pH 1 and hydrolyzed and non-hydrolyzed Anzer tea extracts, at  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$  for the time-dependent changes in the amount during 50 days, using HPLC-UV analysis.

Cyanidin and pelargonidin were detected in the Anzer tea extracts. Comparing non-hydrolyzed extracts with hydrolyzed one, while 11 different peaks were observed before hydrolysis, they have dropped to 3 peaks including cyanidin after hydrolysis. The amount of cyanidin was greater than the cyanidin equivalent of the other two peaks 2.28 and 10.55 times in the hydrolyzed extract. In the light of these data, it is concluded that the plant has the main anthocyanin content being rich of cyanidin glycosides.

According to the HPLC-UV analysis the concentration of cyanidin standard extracted from the freezer sequentially in every analysis day at  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  and  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  concentrations were dropped around 60% and 90% at the end of 50 days. The loss of concentrations of the cyanidin extracted from the freezer only one certain day were determined around 20% . The loss of concentration of cyanidin in the Anzer tea extracts were observed similarly around 85% at the at the end of 50 days.

**Key Words:** Anthocyanidin, Anzer tea, HPLC-UV, The stability of cyanidine.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ .....	I
ÖZET .....	II
SUMMARY .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
TABLolar DİZİNİ .....	VI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	VII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Antosiyanidinler.....	2
1.2.1. Antosiyaninlerin Kullanım Alanları.....	5
1.2.2. Antosiyanidinlerin Bitkilerden Ekstraksiyonu .....	8
1.2.3. Bitki Ekstraktlarındaki Antosiyanidinlerin Analizi .....	9
1.2.3.1. Antosiyanidinlerin HPLC-UV Analizi .....	9
1.3. Thymus praecox Opiz subsp. caucasicus var. caucasicus.....	13
1.4. Literatür Özeti .....	14
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	17
2.1. Bitkilerin Toplanması .....	17
2.2. Anzer Çayından Antosiyanidinlerin Ekstraksiyonu.....	17
2.3. Anzer Çayı Ekstraktlarında Antosiyanidinlerin HPLC-UV Analizleri.....	18
2.4. Antosiyanidinlerin kararlılık testleri .....	20
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	22
3.1. Antosiyanidinlerin analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu.....	22
3.2. Anzer çayının HPLC-UV Analizleri.....	24
3.3. Antosiyanidinlerin kararlılık testleri .....	29
4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	37
5. KAYNAKLAR .....	39
ÖZGEÇMİŞ .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Flavilyum Katyonu .....	3
Şekil 2. Siyanidin-3-O-glikozit.....	4
Şekil 3. HPLC-UV cihazının şematik gösterimi.....	10
Şekil 4. Anzer çayının görünümü .....	14
Şekil 5. Standart antosiyanidin karışımının HPLC-UV kromatogramı (2 mg.L <sup>-1</sup> )....	22
Şekil 6. Siyanidinin kalibrasyon eğrisi .....	23
Şekil 7. Pelargonidinin kalibrasyon eğrisi .....	23
Şekil 8. A ekstraktının HPLC-UV kromatogramı .....	25
Şekil 9. B ekstraktının HPLC-UV kromatogramı.....	25
Şekil 10. C ekstraktının HPLC-UV kromatogramı.....	26
Şekil 11. D ekstraktının HPLC-UV kromatogramı .....	26
Şekil 12. Anzer çayı numunelerinin A, B, C, D ekstraksiyon yöntemlerine göre antosiyanidin içeriklerinin bar grafiği halinde gösterimi.....	27
Şekil 13. A, B, C ve D ekstraktlarına ait HPLC-UV kromatogramlarında tanımlanamayan piklerin siyanidin eşdeğeri cinsinden konsantrasyonlarının alan grafiğinde gösterimi.....	28
Şekil 14. Siyanidinin standardının S1 ve T1 çözeltilerinin (1 mg.L <sup>-1</sup> ) günlere göre değişen konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi.....	31
Şekil 15. Siyanidinin standardının S10 ve T10 çözeltilerinin (10 mg.L <sup>-1</sup> ) günlere göre değişen konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi.....	32
Şekil 16. Anzer çayı ekstraktlarının (C ve D) günlere göre değişen siyanidin konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi.....	33
Şekil 17. Siyanidinin standardının S1 ve T1 çözeltilerinin % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi .....	34
Şekil 18. Siyanidinin standardının S10 ve T10 çözeltilerinin % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi .....	35
Şekil 19. Anzer çayının günlere göre % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı grafiği .....	36

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1.	Flavilyum katyonuna bağlanarak antosiyanidinleri oluşturan yan gruplar ....	5
Tablo 2.	Antosiyaninlerin HPLC ile analizi için bazı kaynaklar .....	10
Tablo 3.	Antosiyanidin standartlarının ayırımı için kullanılan gradient sistemi .....	19
Tablo 4.	HPLC’de kullanılan kolonun ayırma parametreleri ve formülleri .....	20
Tablo 5.	HPLC-UV de optimize edilen ayırma parametreleri .....	22
Tablo 6.	Antosiyanidinlerin HPLC-UV yöntemine göre kalibrasyon ve validasyon parametreleri .....	24
Tablo 7.	Anzer çayı numunelerinin A, B, C, D ekstraksiyon yöntemlerine göre antosiyanidin içerikleri .....	27
Tablo 8.	A, B, C ve D ekstraktlarına ait HPLC-UV kromatogramlarında tanımlanamayan piklerin siyanidin eşdeğeri cinsinden konsantrasyonları ..	28
Tablo 9.	S ve T çözeltilerinin iki farklı konsantrasyondaki (1 mg.L <sup>-1</sup> ve 10 mg.L <sup>-1</sup> ) kararlılık testi sonuçları .....	30
Tablo 10.	Anzer çayında mevcut olan siyanidinin kararlılık testi sonuçları .....	33
Tablo 11.	Siyanidin Standartı ve Anzer çayında zamana bağlı % konsantrasyon değişimleri .....	34



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ark.	: Arkadaşları
BSS	: Bağlı standart sapma
C18	: Oktadesil
D	: Dağılma katsayısı
FA	: Formik asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC- UV	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviöle Dedektör
HCl	: Hidroklorik asit
L	: Litre
LOD	: Tespit sınırı (limit of detection)
LOQ	: Tayin sınırı (limit of quantitation)
M	: Molarite
mg	: Miligram
$\mu$ g	: Mikrogram
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mL	: Mililitre
ORTK	: Oksijen radikali tutma kapasitesi
$\mu$ L	: Mikrolitre
UV	: Ultraviöle

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1.Giriş

Antosiyanidinler, doğal renkleri ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle son yıllarda geniş kapsamlı araştırılmaya ve çalışılmaya başlanmıştır. Gıda, ilaç ve kozmetik sanayi için büyük önem arz etmesine rağmen düşük ekstraksiyon yüzdeleri ile birlikte düşük kararlılığa sahip olmaları nedeniyle kullanımları sınırlı olmuştur.

Antosiyanidinler doğada tek başlarına bulunmazlar, bunlar antosiyanidinlerin glikozitleri antosiyaninler şeklinde bulunur. Renkli meyve ve sebzelerde bolca buldukları literatürde belirtilmiştir. Ayrıca renkli çiçeklerin renk bileşenleri olarak da bilinmektedirler. Bu bileşenlerin renkli olmaları doğal gıda boyası olarak kullanılmalarına da olanak sağlamaktadır. Antosiyaninler, gıdaların renklendirilmesinde yüksek boyama güçleri ve yüksek kalitede ürün oluşumunu sağlamaları nedenleriyle aranan bileşiklerdir. Ayrıca antosiyanin kullanımı ile yapay renklendirici kullanımı azalmaktadır. Gıda endüstrisinde sentetik renklendiricilerin yerine, doğal pigmentlerin kullanılması yönünde artan bir eğilim görülmektedir (Camire ve ark., 2007). Ancak antosiyaninler bilinen en iyi doğal gıda boyaları olmalarına rağmen saflaştırılmalarında yaşanan güçlükler ve kimyasal açıdan yapılarının kararlı olmaması kullanımını zorlaştırmakta ve yaygınlaşmasını engellemektedir (G. Özen, M. Akbulut 2008).

Antosiyaninlerin en önemli biyolojik özelliği, doğal biyoaktif bileşenlerden olup antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Oksijen radikallerinin neden olduğu oksidasyonu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El, 1997 ; Espin ve ark., 2000). Meyve ve sebzelerin antioksidan özelliklerinin, içerdikleri C ve E vitaminleri ile  $\alpha$ -karotenden daha çok flavon, izoflavon, antosiyanin, kateşin ve izokateşin gibi flavonoidlerden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Wang ve ark., 1996). Siyanidin ve siyanidin-3-glikozitin çeşitli sistemlerde antioksidatif aktivite gösterdiği, hatta bazı sistemlerde  $\alpha$ -tokoferolden daha fazla antioksidatif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Tsuda ve ark., 1994).

Bitkilerden antosiyanidinlerin eldesi ve saflaştırılmaları bu bileşenlere kaynak oluşturma açısından önemlidir. Antosiyanidinlerin, kromatografik yöntemlerden ultraviyole dedektöre (UV) bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizleri, ayrılan bileşenlerin tanımlanması, saflaştırılması için yaygın olarak ve etkin şekilde kullanılmaktadır. Kararsız bileşikler olan antosiyanidinlerin endüstriye

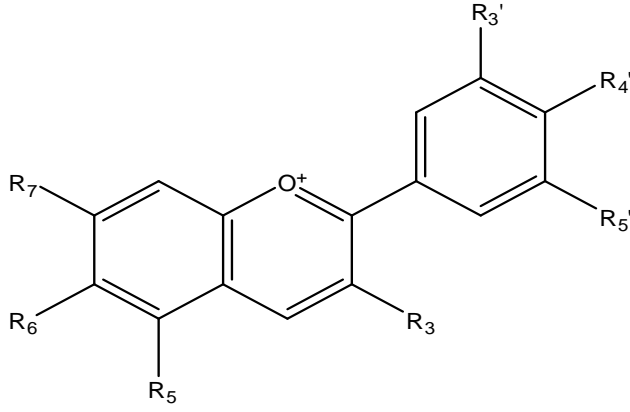
uyarlanması ve analiz edilmeleri zordur. Bu açıdan antosiyanidinlerin analizleri yanı sıra kararlı oldukları ortamların da belirlenmesi önemlidir.

Anzer çayı olarak bilinen *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisi Lamiaceae familyasına ait bir kekik türüdür. Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı, farmakoloji ve parfüm sanayinde de kullanılırlar (Malingré ve ark., 1974; Orhan I. ve ark., 2009). Lamiaceae familyası uzun yıllardır farklı ve benzersiz fenolik bileşiklerce zengin bir kaynak olarak görülmektedir (Saito ve Harborne, 1992; Phippen ve Simon, 1998). Meşhur Anzer balının içeriğinde olduğu bilinen Anzer çayının antioksidan aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda yüksek antioksidan aktivite bulunmuştur (Orhan ve ark., 2009; Boros ve ark., 2010). Üniversitemiz, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya anabilim dalında bitkinin çiçek, yaprak ve sap kısımlarının fenolik asitleri ve flavonoidleri HPLC-UV yöntemiyle çalışılmış ve aynı çalışmada spektrofotometrik antioksidan aktivite testleri de yapılmıştır (Çavuş 2011).

Bu tez çalışması, Rize'nin Anzer yaylasında yetişen Anzer çayının, antosiyanidin içeriğinin HPLC-UV yöntemi ile aydınlatılması üzerine yapılmıştır. HPLC-UV yöntemi ile antosiyanidinlerin analizleri için uygun koşullar sağlanmıştır. Bu koşullar altında iki farklı şekilde ekstrakte edilen antosiyanidinlerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sürecinde antosiyanidinlerin karasızlıklarının çalışmayı olumsuz yönde etkilemesi üzerine bu bileşiklerin kararlılık testleri de yapılmıştır.

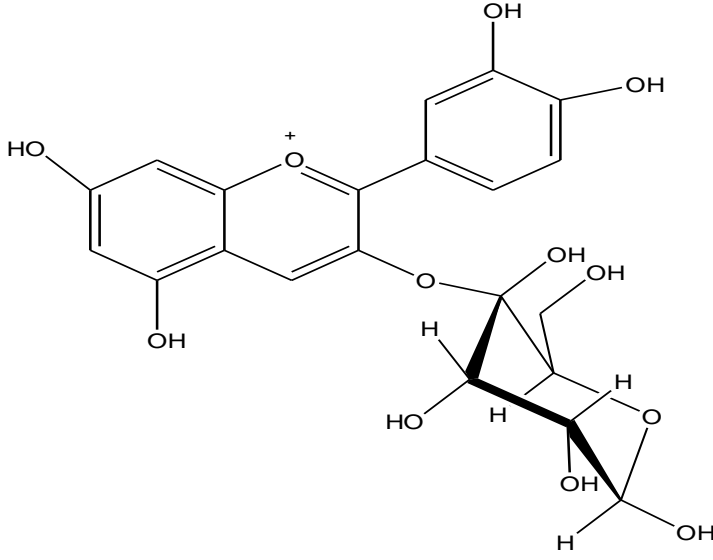
## **1.2. Antosiyanidinler**

Flavonoidlerin genel sınıfları içinde katyonik flavilyum yapısı ile karakterize edilen antosiyanidinler (Şekil 1), Yunanca 'anthos' (çiçek), 'kyanos' (mavi) anlamına gelen iki kelimenin birleşmesiyle adlandırılır (Pazmiño ve ark, 2001). Birçok meyve ve sebze çiçeklerine, kendilerine özgü olan pembe, kırmızı, mavi ve mor, renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki doğal renk maddeleridir (Giusti ve Wrolstad, 2003).



**Şekil 1.** Flavilyum Katyonu

Doğada yaklaşık 20 civarında antosiyanidin olduğu bilinmektedir. Bunlardan altı tanesi, meyve ve sebzelerle, bunların ürünlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlar pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvidindir (Clifford, 2000). Antosiyanidinlerin O-glikozillenmiş türevleri antosiyaninler olarak adlandırılır (Philpott ve ark., 2009). Antosiyaninler, glikozit formundaki benzopirilyum veya flavilyum tuzlarıdır. Kimyasal yapıları çok iyi bilindiği halde degradasyonları henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Antosiyaninler kısmi hidrolize uğratılır ve glikozit bağı ile bağlanmış bileşik ayrılırsa geriye antosiyanidin kalır. Bu kısma aglikon'da denmektedir. Diğer kısım, yani aglikona glikozit bağı ile bağlanmış kısım ise çeşitli şekerlerden birisidir. Antosiyanidinler ile glikozid bağı yaparak antosiyaninleri oluşturan başlıca şekerler ramnoz, glukoz, galaktoz, ksiloz ve arabinozdur. Buna göre, antosiyanidinlerin şekerle esterleşmiş formuna antosiyaninler denir. Antosiyanidinlere glukoz, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz gibi şekerlerden biri veya ikisi aynı anda bağlanabilmektedir. Şekerler genellikle üçüncü karbon atomundaki hidroksil grubuna bağlanmaktadır (Şekil 2).



**Şekil 2.** Siyanidin-3-O-glikozit

Her aglikonun farklı şekerlerle glikozit oluşturduğu çok sayıda kombinasyonun mümkün olması nedeniyle 600 civarında çok farklı renklere doğal olarak oluşan yapılarının var olduğu belirtilmiştir (Andersen, 2002; Giusti, 2002).

Antosiyaninlerde hidroksilasyon arttıkça renk mavime döner. Moleküldeki (-OH) sayısına göre mavimsi rengin sırasıyla pelargonidin, siyanidin ve delphinidin şeklinde artışı söz konusudur. Buna karşılık glikozillenme ve metillenme ise rengin kırmızıya dönmesine neden olmaktadır. Buna örnek olarak kırmızı rengin siyanidinden peonidine doğru artmasını verebiliriz. Birçok meyve, sebze, bitki ve çiçeklerin çok çeşitli renklere olmasının nedeni de budur.

Birçok antosiyanin rengi ortamın pH değerine bağlı olarak bir indikatör gibi değişim gösterir. Antosiyaninler asidik ortamlarda yüksek kararlılık gösterirken, normal proses ve depolama koşullarında renksiz bileşiklere dönüşmekte ve daha sonra kahverengi bileşikler oluşmaktadır. Asidik ortamlarda antosiyaninler pH değişimleri ile birlikte geri dönüşebilir yapısal değişimlere uğramakta ve farklı renk özelliği göstermektedirler. Kırmızımsı renklerin pH 1-3 aralığında baskın olduğunu, bu koşullarda tipik flavilyum formlarında bulduklarını ve 10°C'de 60 günden sonra bile oldukça kararlı oldukları belirlenmiştir. Renklerdeki belirginlik ve kararlılık pH 5-7 civarına yani nötral pH'ya gidildikçe azalmaktayken mavimsi renkler ortaya çıkmaktadır (Cabrita ve ark).

**Tablo 1.** Flavilyum katyonuna bağlanarak antosiyanidinleri oluşturan yan gruplar

Antosiyanidinler	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Ana Renk
Pelargonidin(Pg)	H	OH	H	OH	OH	H	OH	Turuncu
Siyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	K.Kırmızı
Delfinidin (Dp)	OH	OH	OH	OH	OH	H	OH	Pembe-mavi
Peonidin (Pn)	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	OH	H	OH	Mor-Kırmızı
Petunidin (Pt)	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH	H	OH	Pembe
Malvidin (Mv)	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	H	OH	Pembe
Apigeninidin(Ap)	H	OH	H	H	OH	H	OH	Turuncu
Luteolinidin (Lt)	OH	OH	H	H	OH	H	OH	Turuncu
Trisetinidin (Tr)	OH	OH	OH	H	OH	H	OH	Kırmızı

Suda iyi çözünebilen ve birçok meyveye, sebze ve çiçeğe etkileyici mavi, kırmızı ve mor renklerini veren pigmentler olan antosiyaninlerin günümüzde 200' ün üzerinde farklı kaynağı bulunmuştur. Böğürtlen, ahududu, nar, kırmızı lahana, siyah ve kırmızı kuş üzümü, ağaç çileği, Fransız fasulyesi, erik gibi birçok meyve ve sebzenin pembeden mora kadar değişen renklerini veren maddeler, antosiyanin grubu pigmentlerdir. Antosiyanin pigmentleri, hücre sitoplazmasında sudaki çözünürlüğü yüksek olan glikozit formlarında bulunmaktadır. Çeşitli bitkisel materyalin yaprak, çiçek veya meyvelerinde bulunurlar.

### 1.2.1. Antosiyaninlerin Kullanım Alanları

Antosiyaninlerin kullanımları için pH'nın düşük olması, bulanıklığın olmaması gerekir. Antosiyanin renk maddelerinin temel kullanım alanları alkolsüz içeceklerdir. Koruyucu olarak SO<sub>2</sub> içermeyen pH 3,4'ün altındaki berrak içecekler ideal uygulamalarıdır. Doğal renkleri ve antosiyanini hesaplarken, renk katkısı yapılacak gıdanın rengini belirlemeden önce, rengin sabitlenmesi için 24 saat beklemek akıllıca bir önlem olur (Cemeroğlu ve ark. 2001; Küçük ve ark. 2003).

Antosiyaninlerin sülfid türevlerinden serbest bırakılmaları periyodu boyunca renkteki artışı görmek mümkündür. İçime hazır içeceklerde koyu kırmızı rengi vermek için 30 ile 40 mg.L<sup>-1</sup> antosiyanin dozu yeterlidir. Antosiyaninlerin her zaman bulanık içeceklerde kullanımları uygun değildir. Ticari uygulamaları sınırlı olmasına rağmen, teknik olarak alkollü içecek ve sirke içeren ürünlerin de antosiyaninlerle renklendirilmesi mümkündür.

Antosiyaninler, meyve preparatlarında, marmelatlarda da kullanılır. Meyvenin kalitesi ve özelliği önemlidir. Taze veya donmuş meyve, sülfitlemiş ya da konserve meyveler tercih edilir. Konserve meyveler daha kahverengi olabilir. Antosiyaninler kahverengi alanda absorbe ettiklerinden (420-440 nm) kahverengiliğin antosiyanin kullanarak maskelenmesi zordur (Timberlake ve ark. 1976; Bridle ve ark. 1996).

Asit kullanılarak yüksek sıcaklıklarda kaynatılan şekerlemeler ve pektin jelleri, kırmızı rengin gözleendiği antosiyaninler için ideal uygulamalardır. Bazı antosiyanin ekstraktları, özellikle üzüm türevliler jelatin ile birbirine uymazlar, bu nedenle son üründe istenen rengi elde etmek için doğru uygulama biçimi seçimine dikkat edilmelidir. Üzümünden elde edilen konsantre antosiyaninler, jelatin çözeltisine eklendiğinde bulanıklık veya çökelti oluşabilir. Bunu engellemek için uygulanan jelatin durultmasında yardımcı madde olarak tanen kullanılır (Schobinger, 1988). Rengi kullanmadan önce seyreltmek ve üretim denemelerini başarmadan önce jelatin uygunluğunu kontrol etmek gerekir.

Asidik tatlı karışım çeşitlerinde ve püskürtmeli kurutucuyla kurutulmuş toz içeceklerin renklendirilmesinde de antosiyaninler kullanılır (Küçük ve Ballıkaya, 2003).

Antosiyanidin kullanımını sınırlayan başlıca etmenleri şöyle sıralayabiliriz; Antosiyaninlerin suda çok kolay çözünebilmesi kullanımını kısıtlayan en önemli faktördür. Ayrıca pH değışikliklerine karşı kararlı değillerdir (Cemereoğlu ve ark.2003). Asitlik değıştiğinde rengi değışir. Gıda endüstrisi açısından antosiyaninlerin katıldıkları reaksiyonlardan en önemlisi, teneke konserve kaplarında yol açtıkları korozyondur. Sıcaklık aynı zamanda, antosiyaninlerin içinde kalan şekerden dolayı Maillard reaksiyonlarına neden olur. Sıcaklık flavilyum iyonunu parçalayabilir ve rengin kaybolmasına neden olur. Işık da benzer etkiye sahiptir. Oksijen, antosiyaninleri parçalayabilir, bu gerçekleştiğinde, peroksitler ve vitamin C gibi diğer reaktifler okside olur (Rein 2005). Depolama sırasındaki bazı renk kayıpları; düşük sıcaklıkta, karanlık konteynerlerde depolayarak veya oksijensiz paketleme yapılarak önenebilir.

Doğal renk maddesi olmasının yanı sıra farmakolojik özelliklerinden dolayı antosiyanidinler ile ilgili çalışmalar son yıllarda giderek artmıştır. Özellikle karaciğer hastalıkları üzerine olumlu etkileri, kan basıncını dengelemesi, antimikrobiyal etki göstermesi, kanserli hücrelerin gelişimini engellemesi gibi insan sağlığına yararlı etkileri tespit edildikçe antosiyanin içerikli gıdalara olan ilgi de artmıştır (Konczak ve Zhang, 2005).

Antosiyanidinler, flavonoidlerin alt grubu olması sebebiyle flavonoidlerin gösterdiği bir çok önemli biyolojik özelliği de beraberinde göstermektedir. Oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, kalp damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların en önemli etkenleri olduğu bilinmekte, flavonoidlerin bir çoğunun lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavanoid radikallerinin kararlılıklarını ve böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği, flavonoidlerin bunların dışında metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El, 1997). Örneğin üzüm kabuğundan izole edilen antosiyanin ekstraktı çok iyi antioksidatif aktivite göstermiştir. Üzüm kabuğunun major bileşeni açillenmiş malvidin glikozit, linoleik asitin oksidasyonunda oldukça büyük aktivite göstermiştir (Tamura ve Yamagami 1994).

Bazı çalışmalar flavonoidlerin mutajen (Fieschi ve ark., 1989) ve kanserojen olduğu belirtilmekle birlikte bir çok çalışmada elde edilen bulgular flavonoidlerin antimutajen ve antikanserojen olduğunu desteklemektedir (Shahidi ve Naczki, 1995; Hertog ve ark., 1992; Cemeroglu ve Cemeroglu, 1998; Wanasundara ve Shahidi, 1998). Meyve ve sebzelerin antioksidan özellikleri içerdikleri C ve E vitaminleri ile  $\alpha$ -karotenden çok flavon, izoflavon, antosiyanin, kateşin ve izokateşin gibi flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Oksijen radikallerini tutma kapasiteleri (ORTK) bakımından 12 meyve ve 5 ticari meyve suyunun incelendiği bir çalışmada ORTK değeri en yüksek meyvelerin çilek ve erik olduğu bunları portakal ve siyah üzümün izlediği, meyve suların arasında üzüm suyunun ORTK değerinin maksimum olduğu saptanmıştır. İncelenen meyvelerin antioksidan özelliğinin yapılarında bulunan flavonoidlerden kaynaklandığı belirtilmiştir (Wang ve ark., 1996).

Foti ve ark. (1996), yaptıkları bir çalışmada flavonoidler, kumarinler ve sinamik asitleri antioksidatif etki bakımından karşılaştırmışlar ve en güçlü etkiye flavonoidlerin antosiyanidin türlerinin sahip olduğunu bunları sırasıyla kumarinler ve sinamik asitlerin takip ettiğini belirlemişlerdir.

Fenolik bileşiklerin troloks eşdeğeri antioksidan aktiviteye göre değerlendirildiği bir derleme çalışmasında, siyanidinin merkezindeki C halkasındaki çifte bağlar sayesinde konjugasyon yaparak kuersetine benzer şekilde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Rice-Evans ve ark., 1996).



### 1.2.2. Antosiyanidinlerin Bitkilerden Ekstraksiyonu

Antosiyaninlerin, çeşitli bitkisel kaynaklardan ekstraksiyonlarında kullanılacak yöntemler, çoğunlukla ekstraksiyonun amacına ve antosiyaninlerin yapısına bağlı olarak değişmektedir.

Ekstraksiyon işlemleri için antosiyaninlerin yapısını ve kararlılığını etkileyen faktörlerin bilinmesi gerekmektedir. Ekstrakte edilen pigmentler kalitatif veya kantitatif olarak hemen analiz edilecekse, yöntem pigmentleri mümkün olduğunca doğal durumlarına yakın tutacak şekilde seçilmelidir. Ekstrakte edilen pigmentlerin renklendirici veya gıda bileşeni olarak kullanılması durumunda maksimum pigment verimi, boyama kuvveti ve kararlılık gibi faktörler de önem kazanmaktadır (Fossen ve ark.1997). Ayrıca ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinin çok kompleks olmaması, zaman alıcı ve pahalı olmaması gerekmektedir.

Antosiyaninler nötral veya alkali çözeltilerde kararlı olmadığından genellikle asidik çözeltilerin kullanılması önerilmektedir. Ekstraksiyonda en yaygın yöntem; bitkisel materyalin az miktarda mineral asit içeren ve düşük kaynama noktasına sahip olan alkol ile ekstraksiyonudur.

HCl ile asitlendirme düşük pH'yı korumaya yardımcı olmakla birlikte, bu gibi mineral asitlerin kullanımı, kompleks yapıdaki pigmentlerin doğal formunu değiştirebilmekte ve daha sonraki konsantrasyon aşamasında dayanıklı olmayan açıl ve şeker kalıntılarında kayıplara neden olabilmektedir. Bu nedenle pek çok araştırmacı açillenmiş pigmentlerin bozunmasını en aza indirmek için çok düşük konsantrasyonlarda asit kullanımını önermişler, güçlü asit çözeltilerinin bazı bileşiklere zarar verdiğini bildirmişlerdir (Rodriguez ve ark. 1998).

Çözücü olarak çoğunlukla, yüksek ekstraksiyon gücü ve düşük kaynama noktasından dolayı kolay konsantre edilebildiği için metanol kullanılmaktadır. Ancak metanolün toksik etkisinden dolayı, ekstrakte etme gücü metanole göre daha düşük olmasına ve yüksek kaynama noktasından dolayı daha zor konsantre edilmesine rağmen asitlendirilmiş etanol de gıda esaslı preparatların hazırlanmasında tercih edilmektedir (Revilla ve ark.1998; Rodriguez ve ark.1998). Ayrıca %10 HCl' li metanolün, aynı asitli etanole göre %20, suya göre %73 oranında daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Metivier ve ark., 1980).

Antosiyaninleri doğal formlarına yakın elde etmek için pek çok araştırmacı tarafından, başlangıç pigment ekstraksiyonunda nötral çözenlerin kullanımı %60

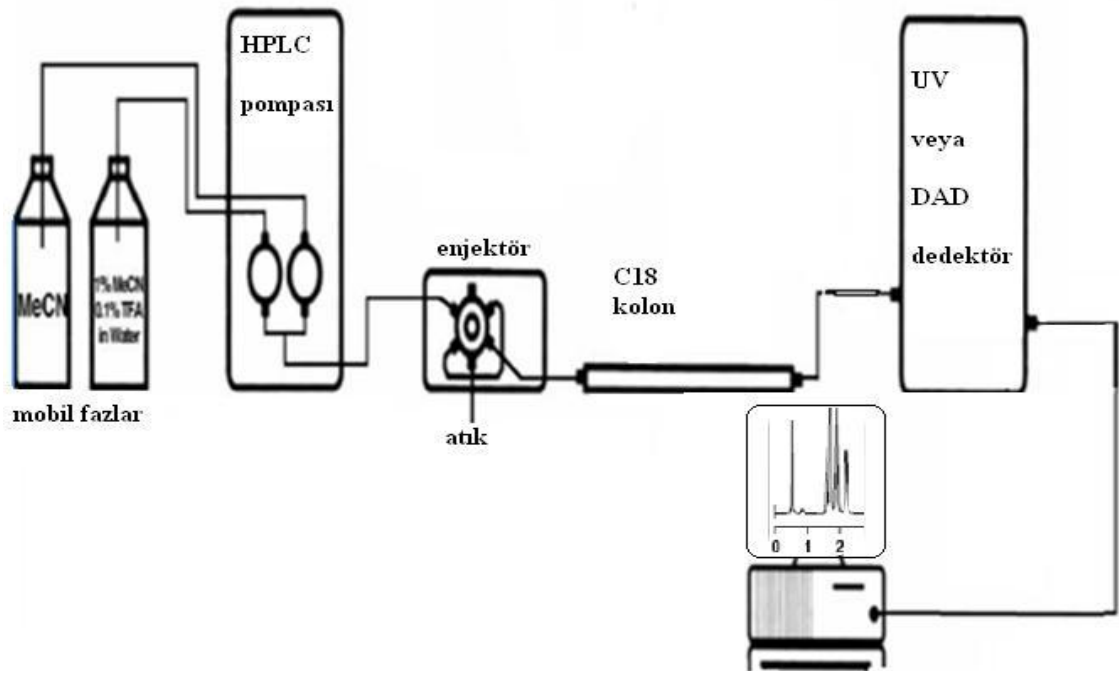
metanol, aseton/metanol/su karışımları, n-bütanol, soğuk aseton veya kaynamış su olarak önerilmiştir. Ayrıca zayıf organik asitler de (çoğunlukla formik asit, asetik asit, propiyonik asit, sitrik asit ve tartarik asit) ekstraksiyon çözümlerinde kullanılmıştır (Giusti ve ark.1996).

### **1.2.3. Bitki Ekstraktlarındaki Antosiyanidinlerin Analizi**

Bitki ekstraktlarındaki antosiyanidinler genel olarak spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilirler. Spektrofotometrik analizler sonucunda toplam antosiyanidin miktarı belirlenir. Bu yöntemde kullanılan standart bir antosiyanidin değişen konsantrasyonuna karşı absorbans değeri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilir ve mevcut antosiyanidinler bu standart antosiyanidin eşdeğeri olarak ifade edilirler. Kromatografik analizlerde ise ekstraktların içerdęi antosiyanidin bileşenleri hem tanımlanır hem de kantitatif olarak belirlenir. Günümüzde kromatografik yöntemlerden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) en yaygın ve etkin şekilde kullanılmaktadır. Antosiyanidinlerin HPLC ile analizlerinde ayrılan bileşenlerin tanımlanması için yaygın olarak ultraviyole dedektör (UV) ve kütle dedektörü kullanılmaktadır. Bu tez çalışması boyunca bitki ekstraktlarındaki antosiyanidinler HPLC-UV yöntemi kullanılarak analiz edildikleri için burada bu yöntemle daha detaylı olarak değinilecektir.

#### **1.2.3.1. Antosiyanidinlerin HPLC-UV Analizi**

HPLC yöntemi, parçacık boyutları önemli ölçüde küçük sabit fazın hareketli faz ile etkileşen yüzey alanı büyüklüğü sayesinde yüksek ayırma gücüne sahip bir kromatografik yöntemdir. Ayrıca düşük miktarda örnek hacimleri ile çalışılabildiği için, ekonomik bir yöntemdir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Bu mekanizmanın şematik olarak gösterimi şekil 3'te verilmiştir. Görünür bölgede absorpsiyon veren bileşikler olan antosiyanidinler için, kullanımı kolay, dedeksiyon limiti düşük ve seçici olmasından dolayı UV dedektör, HPLC ile kombine olarak ayrılan bileşenlerin tanımlanması ve saflaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır.



**Şekil 3.** HPLC-UV cihazının şematik gösterimi

Çeşitli kaynaklardan antosiyanidinlerin HPLC kullanılarak analiz edildiği çalışmalardan bazıları Tablo 2’de belirtilmiştir. Antosiyanidin çalışmalarının doğal olarak morumsu ve kırmızımsı meyveler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir.

**Tablo 2.** Antosiyaninlerin HPLC ile analizi için bazı kaynaklar

Kolon	Çözücü Sistemi	Dedektör	Antosiyanin Kaynağı	Kaynaklar
LiChrospher 100RP-18 250×10mm, 10µm	A:Su/Formikasit(90:10) B:Metanol/Su/Formik asit (50:40:10)	HPLC-DAD DAD:520nm	Üzüm örnekleri 22 bileşik	Favretto ve ark. (2000)
Capcell Pak C18 150×4,6mm, 5µm	A:Su/TFA(%1) B:Asetonitril/Su(50:50) %1 TFA	LC-PDA 250-600nm	Yaban mersini Frenk üzümü	Nakajima ve ark. (2004)
Novapack C18 150×3,9mm	A:Su/Formik asit(90:10) B:Su/Metanol/Formik asit (45:45:10)	HPLC-PDA 530nm	Üzüm kabuğu 21 bileşik	Munez ve ark. (2004)
Symmetry C18 75×4,6mm, 3,5µm	A:Su- %10 Formik asit B:Asetonitril	HPLC-PDA 200-600nm	Siyah ve kırmızı ahududu	Tian ve ark. (2005)
Novapack C18 150×3,9mm, 4 µm	A:Su/Formikasit(90:10) B:Su/Metanol/Formik asit (45:45:10)	HPLC-DAD 530nm	Üzüm ezmesi yapağı ve tohumu	Monagas ve ark. (2006)

Bunların yanı sıra yapılan bazı çalışmaları incelersek detaylı bir kaniya varmış oluruz. Antosiyanidin içeriği çok fazla olmasına rağmen moro kan portalı üzerinde yapılan çalışmalarda özellikle renkte görülen bozulmalardan dolayı hemen hemen hiçbir ürüne (meyve suyu, konsantre şarap gibi) işlenememektedir. Bu yüzden kan portakalının meyve suyuna işlenebilme olanaklarını ve ürünlerde antosiyanin kararlılığını sağlamak amacıyla ürün kalitesi üzerine olan etkiler Tokgöz ve ark.(2010) çalışmasında araştırılmıştır.

Meyve sıkılıp suyu çıkarılınca karakteristik rengini yani antosiyanin içeriğini sağlamak için 3 farklı konsantrasyonda sitrik asit ile ayarlanmıştır. Pastörizasyon işleminden sonra oda sıcaklığına kadar soğutulmuş meyve suyu örnekleri ambalajlanıp +6°C’de buzdolabında 10 ay, +24°C’de oda sıcaklığında 4 ay depolanmıştır.

Depolama sıcaklığına göre, meyve suyu örneklerinin toplam antosiyanin içeriği değişim göstermiştir. Buzdolabı koşullarında 6°C’de depolanan kan portakalı suyunun toplam antosiyanin içeriği 136 mg. L<sup>-1</sup> iken, oda sıcaklığında 91 mg. L<sup>-1</sup> düzeyinde kaldığı görülmüştür. Bu da depolama sıcaklığının antosiyaninlerin kararlı olmasında ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Örneklerin antosiyanin içeriği ambalaj tipine göre de istatistiksel olarak önemli farklılık göstermiştir. Ancak bu farklılık sayısal anlamda oldukça düşük düzeyde olmuştur. Işık geçirmez ambalajdaki örneklerin antosiyanin içeriği az da olsa saydam ambalajdaki örneklerin antosiyanin içeriğinden yüksek bulunmuştur.

Antosiyanin kararlılığı üzerine etkili olan bir diğer faktör de ortam pH’sı olup, artan ortam pH değeri ile birlikte antosiyanin miktarında azalmalar olmuştur. Ortam pH’sı sitrik asit ile 3.00’e ayarlanmış örneklerin toplam antosiyanin miktarı 125 mg. L<sup>-1</sup> iken, ortam pH’sı 3.50 olan örneklerin 89 mg. L<sup>-1</sup> düzeyinde kalmıştır.

Antosiyaninlerin kararlılığı üzerinde etkili olan bir diğer faktör de depolama süresidir. Örneklerin, depolama başlangıcında 165 mg L<sup>-1</sup> olan toplam antosiyanin miktarı 4 aylık depolama periyodu sonunda yaklaşık %60’lık bir azalma ile 66 mg L<sup>-1</sup> değerine düşmüştür. Bu azalma depolama sıcaklık değerlerine göre oldukça önemli farklılıklar göstermiştir. Bu kayıp oranı 6 °C’de dört aylık depolama sonunda yaklaşık %39 iken, oda sıcaklığında %81 düzeyine kadar çıktığı tespit edilmiştir (Tokgöz ve ark., 2010)

Başka bir çalışmada karadut meyvesinin zengin antosiyanin içeriği nedeniyle yetiştiriciliğinin yaygınlaştırılması ve antosiyaninlerin kullanım olanaklarının endüstriye uyarlanması ile gıda endüstrisi için iyi bir boyar hammadde ve katkı maddesi oluşturacağı düşünüülerek çalışma yapılmıştır. Bu çalışmanın çıkış noktası olan başka bir çalışmada karadut meyvesinin fazla miktarda antosiyanin içerdiği ve bu antosiyaninlerin siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin-3-glikozit olduğu ve miktarının ise  $231.26 \pm 21.75 \text{ mg L}^{-1}$  olduğu belirtilmiştir (Özen ve ark., 2008). Bu çalışmada dut pigmentlerinden antosiyaninlerin karakterizasyonu ve analizleri üzerinde odaklanılmıştır. Bu çalışma yapılırken daha önce antosiyanin analizleri, ekstraksiyon yöntemleri ve kararlılık üzerine yapılan çalışmalar incelenerek uyarlamalar gerçekleştirilmiştir.

Taze dut meyveleri %95 alkol / %0.1 HCl (1:1) oda sıcaklığında 4 saat bekletilerek ekstrakte edilmiştir. C-18 kolonla izolasyondan sonra UV spektroskopi, HPLC-PAD, LC-MS, ve H-NMR kullanılarak kimliklendirilmiştir. Sonuç olarak dut pigmentlerindeki en fazla bulunan antosiyaninler siyanidin-3-rutinozit (%60) ve siyanidin-3-glikozittir (%38). Ekstraktta bulunan diğer bileşenler toplamda % 2 olup bunlar pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit olarak belirlenmiştir (Qin C ve ark. 2010). Bunun gibi benzer nitelikte birçok çalışma olup çoğu çalışmada antosiyanin kararlılığı üzerinde durulurken farklı numunelerde ya da benzer örneklerde çalışmalar yapılmıştır. Benzer şekilde olan Aramwit ve ark. (2010), Withy ve ark. (1993) ve Tsai ve ark. (2005) çalışmalarını kısmen inceleyerek çeşitli yargılara varmış oluruz.

Aramwit ve ark. (2010), dut meyvesinden elde edilen ekstraktların  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 10 saat tutulması sonucunda ısı ve ışığın antosiyaninler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuçta ısı ve ışık etkisi sonucu antosiyaninlerin miktarında azalma olduğu belirlenmiş ve örneklerin  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 'nin altında bir sıcaklıkta ve ışığa kapalı bir ortamda tutulması gerektiği bildirilmiştir.

Withy ve ark. (1993), kırmızı ahududu suyu konsantrelerinde antosiyanin kaybının depolama sıcaklığına bağlı olduğunu göstermişlerdir.  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 3 ay süreyle depolanan konsantrelerin antosiyanin içeriğinde %80.4 kayıp olduğu saptanırken,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de depolamada kayıp oranı yalnızca %3.1 düzeyinde kaldığını tespit etmişler. Ayrıca başka bir çalışmada Gomez ve ark. (2004), Vitis vinifera L türü üzümlelerinden elde ettikleri antosiyanidin ekstraktlarını analiz edilinceye kadar  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklamışlardır.

Tsai ve ark. (2005), yüksek sıcaklıkta ısıtma sırasında dut meyvelerinin metanol ile ekstraktlarının antosiyanin ve antioksidan kapasitesi üzerinde şekerin etkisini incelemiş ve şeker konsantrasyonu ve pH'nın son derece etkili olduğunu göstermişlerdir. Şeker konsantrasyonu arttıkça ve pH düştükçe antosiyanin bozunması azalmış, antioksidan kapasitesinin daha iyi korunduğu belirlenmiştir.

### **1.3. *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus***

*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* bitkisi Lamiaceae familyasına ait bir kekik türüdür. Bitkinin familya adı olan Lamiaceae, Türkçe'de Ballıbabagiller olarak kullanılmakta olup genellikle güzel kokulu bir ya da çok yıllık çiçekli bitkiler familyasıdır. Fesleğen, kekik, ve adaçayını içeren Lamiaceae familyası uzun yıllardır farklı ve benzersiz fenolik bileşiklerce zengin bir kaynak olarak görülmektedir (Saito ve Harborne, 1992; Phippen ve Simon, 1998). Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı, farmakoloji ve parfüm sanayinde de kullanılırlar (Malingré ve ark., 1974; Orhan I. ve ark., 2009). Yöresel adı Anzer çayı olan bitki, 15-20 cm arasında boylanabilen, küçük yapraklı, kuvvetli kokulu, yaz aylarında dalların tepe kısmında başak formunda pembe-erguvani-beyaz çiçekler açan, otsu yapıda çok yıllık bir türdür (Şekil 4).

Doğu Karadeniz bölgesinin yüksek kesimlerinde, özellikle meyilli, kurak ve yamaç kısımlarda kümeler halinde yayılış gösteren bu bitki, Rize ili İkizdere ilçesi aşağı ve yukarı Anzer adı verilen ve denizden 2300-2500 m yükseklikteki yörede yoğun şekilde doğal olarak yetişmektedir. Haziran ayından itibaren yaklaşık iki ay boyunca farklı yüksekliklerde, çiçekli olarak bulunan Anzer çayı, arıların en çok ziyaret ettiği nektar bitkilerindedir. Yüzlerce yıldır yöre halkı tarafından bilinen ve doğadan toplanan Anzer çayı, kurutularak kış aylarında bitkisel çay şeklinde tüketilmektedir. Yörede Anzer çayının; soğuk algınlığı, gribal enfeksiyonlar, mide ve bağırsak rahatsızlıkları gibi birçok derde deva olduğuna inanılmaktadır (Yıldız, 2007). Ayrıca, timol ve karvakrolün düz kas spazmlarını çözerek, iç organlarda duyulan ağrıları yok ettiği hayvan deneyleri ile kanıtlanmıştır (Bal, 2001). Kekik, doğal temizleyici olarak ta kullanılır.

Artvin ilinde de yetişen bitki, Artvin ilinde nesli tehlike altında olan bitkiler arasında değerlendirilmiş ve tehlike boyutu olarak zarar görebilir olarak belirlenmiştir.

Bu durum bitkinin yetiştiği alanın koruma altına alınması gerektiğine işaret etmektedir (Eminağaoğlu ve ark., 2010).



**Şekil 4.** Anzer çayının görünümü

#### **1.4. Literatür Özeti**

Antosiyanidinler üzerine günümüzde saflaştırma ve onların tanınmasını sağlayacak analiz çalışmalarının yanında antosiyaninlerden elde edilen renk pigmentlerinin kararlılığı üzerinede yoğun olarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Antosiyaninlerin HPLC yöntemiyle analizi için şimdiye kadar bir çok yöntem geliştirildi ve bu yöntemlerin bazıları sadece spesifik olup ekstrakte edilen materyale uygun olarak geliştirilmiştir.

De Villiers ve ark. (2011) kırmızı şarabın antosiyaninlerinin HPLC ile analizi için yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada kromatografik koşullardaki değişikliklerin antosiyaninlerin analizleri üzerine etkisi incelenmiştir. Gradient programının seçiminde bu çalışmadan faydalanılmıştır.

Jamal Uddin ve ark. (2004) yaptığı çalışmada ise *Eustoma (Eustoma grandiflorum* Gries.) adlı çiçeğin 29 farklı kültürünün mevsimsel olarak taç yapraklarının pigmentlerindeki değişimler incelenmiştir. Pigmentler olarak özellikle antosiyanidinlerden delfinidin, pelargonidin ve siyanidin içeriklerinin mevsimsel değişiklikleri incelenmiştir. Çalışmada aynı zamanda çiçeklerin renkleri ile içerikleri değerlendirilmiş ve mor rengin başlıca delfinidinden, kırmızımsı rengin siyanidinden ve pembe rengin başlıca pelargonidinden ileri geldiği gözlenmiştir. Beyaz çiçeklerde ise hiçbir antosiyanidin gözlenmemiştir. Bu çalışma antosiyanidinlerin ekstraksiyonu

açısından da bir kaynak olarak değerlendirilmiştir. Antosiyanidinler, antosiyaninlerin şeker grubu içermeyen formları olduklarından özellikle antosiyanidinlerin incelendiği çalışmalarda hidroliz işlemi bağlı şeker gruplarının kırılması ve antosiyanidin çekirdeklerinin incelenmesini sağlamaktadır. Bu çalışmada da asidik hidroliz kullanılarak antosiyaninlerin antosiyanidinlere dönüşümü sayesinde analizleri gerçekleştirilmiştir.

Orhan I. ve ark. (2009) çalıştığımız bitkinin (*Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *Caucasicus*) kloroform, etil asetat, etanol ve sulu ekstraktlarında 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) radikali temizleme ve demir(III) iyonu indirgeme, antioksidan kuvvet (FRAP) yöntemlerini kullanarak antioksidan özelliklerini incelenmişlerdir. Bitkinin etil asetat ve etanol ekstraktları önemli derecede DPPH• radikali temizleme aktivitesi gösterirken, sulu ekstraktları yüksek demir iyon-şelat etkisi göstermiştir. Bu kapsamda bitkinin uçucu yağları da çalışılmış ve FRAP yöntemine göre yaprak ve çiçeklerinin uçucu yağları yüksek antioksidan kuvvet göstermiştir. Böylece bize antioksidan olarak kuvvetli olan bitkinin antosiyanidin analizlerini çalışmamız için olanak sağlamıştır.

Saito ve Harborne (2009) yaptığı çalışmada ise çiçek renkleriyle antosiyanidin türleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. 49 Türün araştırıldığı bu çalışmada çiçek renkleri antosiyanidinler ve tozlaşma vektörleri arasında iyi korelasyon olduğu bulunmuştur. 6 Çiçek türü pelargonidin, 4 türü siyanidin içermektedir. Bütün kırmızı-mor ve kırmızı çiçek türlerinde siyanidin içeriği gözlenmiştir. 26 mor-viyole, viyole ve mavi çiçeklerin delfinidin ve 8 tanesinin malvidin 13 tanesininde siyanidin içerdiği bulunmuştur.

Qin ve ark. (2010) dut pigmentlerinden antosiyaninlerin karakterizasyonu ve analizleri üzerine yaptıkları çalışmada, ekstrakte ettikleri antosiyaninlerin C18 kolonla izolasyonundan sonra UV, MS ve HNMR spektroskopisi kullanarak tanımlanması yapılmıştır. Sonuç olarak dut pigmentlerindeki en fazla bulunan antosiyaninler, siyanidin-3-rutinozit (%60) ve siyanidin-3-glikozittir (%38). Diğer bileşenler ise toplamda %2 iken bunlar pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-rutinozit olarak belirlenmiştir.

Gomez ve ark. (2004) antosiyaninlerin kararlılığı üzerine yaptığı çalışmada pH, sıcaklık, ışık etkisi incelenmiş farklı pH'larda (3,4,5) ve farklı sıcaklıklarda (10, 25, 38 °C) yapılan denemelerin bir kısmı gün ışığına maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda



sıcaklık artıkça antosiyaninlerde yapının bozulduğu ve rengin kahverengiye doğru döndüğü gözlenmiştir. Bu sıcaklıklardan 10 °C'nin uygun olduğu ve siyanidin-3-glukozidin 10 °C'de 60 gün sonunda %90 korunduğu gözlenmiştir. Gün ışığına maruz kalan numunelerde, gün ışığıyla etkileşmeyen numunelere göre %5-10 arası kayıp olduğu gözlenmiştir.

Cabrita ve ark. (2000) yaptığı çalışmalarda *Fragaria ananassa*, *Oriza sativa* ve *Abies koreana*' dan elde ettikleri pigmentleri (siyanidin-3-glikozit) inceleyerek renkleri ve kararlılıklarını belirlemişlerdir. Kırmızımsı renklerin pH 1-3 aralığında baskın olduğunu, bu koşullarda tipik flavilyum formlarında bulduklarını ve 10 °C' de 60 günden sonra bile oldukça kararlı olduklarını belirlemişlerdir. Renklerdeki belirginlik ve kararlılık pH 5-7 civarına yani nötral pH'ya gidildikçe azalmaktayken mavimsi renkler ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmalardan yararlanarak Anzer çayının antosiyanidin ekstraktlarının HPLC-UV analizleri yapıldı. Öncelikle antosiyanidin analizleri için uygun HPLC-UV yöntemi geliştirildi. Uygun ekstraksiyon yöntemleri seçilerek karşılaştırmalı olarak analiz edildi. HPLC-UV'de analiz edilen standart antosiyanidinlerin ve numune ekstraktlarının konsantrasyon kayıpları nedeniyle uygun pH, ışık, depolama sıcaklığı ve süresi üzerine kararlılık testi uygulanmıştır.

## **2.YAPILAN ÇALIŞMALAR**

### **2.1. Bitkilerin Toplanması**

Deneyleerde kullanılan Anzer çayı, Temmuz 2012'de Anzer yaylasından 2300 m'den toplanarak güneş almayacak şekilde ve açık havada (yaylada) kurutuldu. Bitkinin mor çiçekli kısmı ayrılarak ekstraksiyon verimini artırmak için yüzey alanının genişletilmesi amacıyla kahve öğütme makinesinden geçirilerek partikül boyutları küçültüldü. Kurutulan bitki örnekleri analizleri yapılana kadar uygun şartlarda (nem almayacak şekilde) muhafaza edildi. Bitki örnekleri etüvde 100 °C'de 3 saat bekletilerek ihtiva ettikleri nem miktarı çiçekte %9,86 olarak belirlendi.

### **2.2. Anzer Çayından Antosiyanidinlerin Ekstraksiyonu**

Anzer çayında, ekstraksiyonun optimize edilmesi için antosiyanidinlerin genel olarak bitkilerde en bol buldukları çiçek kısmı seçilmiş olup, çiçeğin mor kısımları ayrılarak bir seri farklı ekstraksiyon yöntemi paralel olarak uygulandı. Antosiyanidinlerin bitkiden ekstraksiyonu iki farklı yöntem ile denendi.

Bu yöntemler:

1) 1 g numuneye 20 mL (%80 metanol, %19 su, %1 HCl ) eklenerek 1 gece karanlıkta karıştırıcıda bekletildi. Ertesi gün katı kısım mavi bant süzgeç kâğıdından süzülerek ayrıldı. Çözelti kısmı iki eşit parçaya ayrılarak (A ve B) çözümleri uçuruldu . A kısmı 5 ml suda %3 formik asitli (FA) olacak şekilde çözülüp filtreden geçirilerek HPLC-UV analizi gerçekleştirildi. B kısmı ise 6 ml %1'lik HCl'li metanolde çözülüp HPLC-UV analizi gerçekleştirildi

2) 0,25 g numuneye 5 mL %1 HCl 'li metanol eklenip, karıştırıcıda 2 saat 40 °C de bekletildi. Elde edilen ekstraktın 300 µL'si, 900 µL metanol, 285 µL su ve 15 µL HCl eklenerek (%80 metanol, %19 su ve %1 HCl'li olacak şekilde) filtreden geçirilip HPLC-UV ile analiz edildi (C). Geri kalan ekstraktın 2 mL'si alınarak üzerine 4 mL 2N HCl eklenerek 2 saat yaklaşık 100 °C'de bekletildi. Elde edilen ekstraktın 300 µL' sine 900 µL metanol, 285 µL su ve 15 µL HCl eklenerek (%80 metanol, %19 su ve %1 HCl) filtreden geçirilip HPLC-UV ile analiz edildi (D).

## **2.3. Anzer ayı Ekstraktlarında Antosiyanidinlerin HPLC-UV Analizleri**

### **2.3.1. Kimyasal Malzeme ve Materyaller**

Analitik saflık derecesinde olan antosiyanidin standartlarından delfinidin klorür, siyanidin klorür, apigeninidin klorür, pelargonidin klorür ve malvidin klorür antosiyanidinleri Sigma-Aldrich'den, numune hazırlamada ve kromatografik analizde kullanılan HPLC saflıkta asetonitril, metanol, formik asit ve hidroklorik asit Merck'den satın alındı. HPLC şırınga filtreleri (RC-membrane, 0.2 µm) Filtre Sartorius Minisart RC 15, Sartorius'dan satın alındı.

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

### **2.3.2. HPLC-UV Koşulları**

HPLC-UV analizleri iki dalga boyunda aynı anda cevap alınabilen UV-Vis dedektör ile donanımlı ve otomatik örnekleyicili Thermo Finnigan Surveyor HPLC-UV sisteminde yapıldı. Enstrüman ChromQuest programı ile kontrol edildi. Tüm analizler için bir ters faz C18 kolon (150 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül; ACE) kullanıldı. HPLC-UV analizleri için gradient elüsyonu 5 antosiyanidin standardının uygun çözünürlükte ayrılmasını sağlayacak şekilde De Villiers ve arkadaşlarının (2011) kullandıkları yöntem modifiye edilerek uygulandı. Bu yöntemde kullanılan özücüler A: Suda %5 formik asit (FA) B: Asetonitrilde %5 FA içermektedir. Gradient sistemi %90 A mobil fazı ile başlayıp kademeli olarak B mobil fazı yüzdesi %30 lara çıkarılacak ve sonra başlangıç düzeyine geri dönülecek şekilde ayarlandı. Akış hızı 1 mL/dk olup enjeksiyon hacmi 25 µL olarak seçildi. Yöntem için standart olarak delfinidin klorür, siyanidin klorür, apigeninidin klorür, pelargonidin klorür ve malvidin klorür antosiyanidinleri kullanılarak sistemin dalga boyu 520nm'ye ve kolon sıcaklığı kolon fırınında 30°C'ye ayarlandı. Gradient sisteminin çözücü bileşenleri Tablo 3'de verildi.

**Tablo 3.** Antosiyanidin standartlarının ayırımı için kullanılan gradient sistemi

Dakika	%5 FA Suda	% 5FA Asetonitrilde
0	90	10
3	90	10
8	84	16
12	80	20
15	75	25
20	70	30
30	90	10
40	90	10

FA: Formik asit

Standartlar, metanolde çözülerek kararlılıklarını sağlamak için %1 derişik HCl ile asitlendirilip ve %19 sulandırıldılar.

### 2.3.3. Standartlar, Kalibrasyon ve Validasyon

Kalibrasyon için delfinidin klorür, siyanidin klorür, apigeninidin klorür, pelargonidin klorür ve malvidin klorür antosiyanidinlerinin metanol içerisinde 100 mg.L<sup>-1</sup> stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltileri % 1:19:80; HCl, su ve metanollü çözeltiliyle seyreltilerek 1; 2; 5; 10; 20; 30 ve 50 mg.L<sup>-1</sup>'lik çözeltileri hazırlandı ve dış standart yöntemine göre kalibrasyon gerçekleştirildi. Doğrusal cevaplar elde edildi ( $R^2 \sim 1$ ) (Tablo 6).

Validasyon için tekrarlanabilirlik testleri yapıldı. 1 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonda karışımın 7 kez analizi sonucunda elde edilen bağıl standart sapmalar (%BSS) Tablo 6'da verildi. Dedeksiyon limitleri ise gürültünün 3 katını sağlayan gözlenebilme sınırı yani kalitatif tayin limiti (LOD) ve gürültünün 9 katını sağlayan kantitatif (nicel) tayin limiti (LOQ) hesaplandı (Tablo 6).

### 2.3.4. Optimize Edilen HPLC-UV Yönteminin Ayırma Parametreleri

Uygun HPLC koşulları kullanılarak optimize edilen yöntemin ayırma parametreleri, standart karışımına ait kromatogram verileri kullanılarak hesaplandı. Kolon verimliliğini ifade eden tabaka sayısı (N), alıkonma faktörleri (k'), seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) ve çözünürlük ( $R_s$ ) değerleri tablo 4'de verilen ilgili formüllerle hesaplandı

**Tablo 4.** HPLC’de kullanılan kolonun ayırma parametreleri ve formülleri

Parametre	Formül
Tabaka sayısı (N)	$N = 16 \cdot (tr / W_b)^2$
alıkonma faktörleri (k')	$k'_A = (tr - t_0) / t_0$
seçicilik faktörü ( $\alpha$ )	$\alpha = k'_B / k'_A$
çözünürlük ( $R_s$ )	$R_s = (tr_2 - tr_1) / W_b^2$

$W_b$ : piklerin taban genişlikleri

$t_0$ : çözücü pikinin alıkonma zamanı (ölü zaman)

tr: standart pikinin alıkonma zamanı

#### 2.4. Antosiyanidinlerin kararlılık testleri

Antosiyanidinlerle çalışırken renk ve konsantrasyon kaybı gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Literatürde bu kayıpları önlemek için belli çalışmalar yapılmıştır. Bu tez çalışmasında da Anzer çayı ekstraktlarındaki antosiyanidinlerin konsantrasyon kayıplarının neyle ilgili olduğunun bulunması için literatürden yararlanıldı.

Antosiyanidinler asidik ortamlarda yüksek kararlılık gösterdikleri bilinmektedir. Kırmızımsı renklerin pH 1-3 aralığında baskın olduğunu, bu koşullarda tipik flavilyum formlarında bulduklarını ve 10 °C’ de 60 günden sonra bile oldukça kararlı oldukları belirlenmiştir (Cabrita ve ark., 2000). Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, kararlılık testi için uygun pH 1 olarak seçildi.

Antosiyanidinlerin kararlılığının depolama sıcaklığına bağlı olduğu ve en az kayıpların -20 °C civarında olduğu rapor edilmiştir (Withy ve ark., 1993; Gomez ve ark., 2004). Bu çalışmada -18 °C depolama sıcaklığı olarak seçildi.

Böylece kararlılık testi çalışması; %1 HCl’ in metanoldeki çözeltisi ile pH 1’de ve -18 °C’de iki ayrı konsantrasyonda (1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup>) hazırlanan standart siyanidin farklı günlerde yürütülmesi sonucu yapıldı. Çalışmada siyanidin standardının zamana bağlı olarak miktarındaki değişimin belirlenmesi için 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50. günlerde HPLC-UV analizleri yapıldı. Bu test için analiz edilecek standartların her bir konsantrasyonu için tek bir stok çözelti hazırlandı. Bu stoktan farklı günlerde yürütülmek üzere ayrı ayrı HPLC viallerine çözelti alındı. Zamana bağlı değişim iki farklı şekilde incelendi. Tasarlanan günlerde analizi yapılacak standart çözeltiler -18 °C’deki dondurucudan alınarak tüm analiz süreleri boyunca (yaklaşık 11 saat) 0 °C’ye ayarlanmış HPLC oto örnekleyicisine bırakıldı. Analizler ardışık olarak

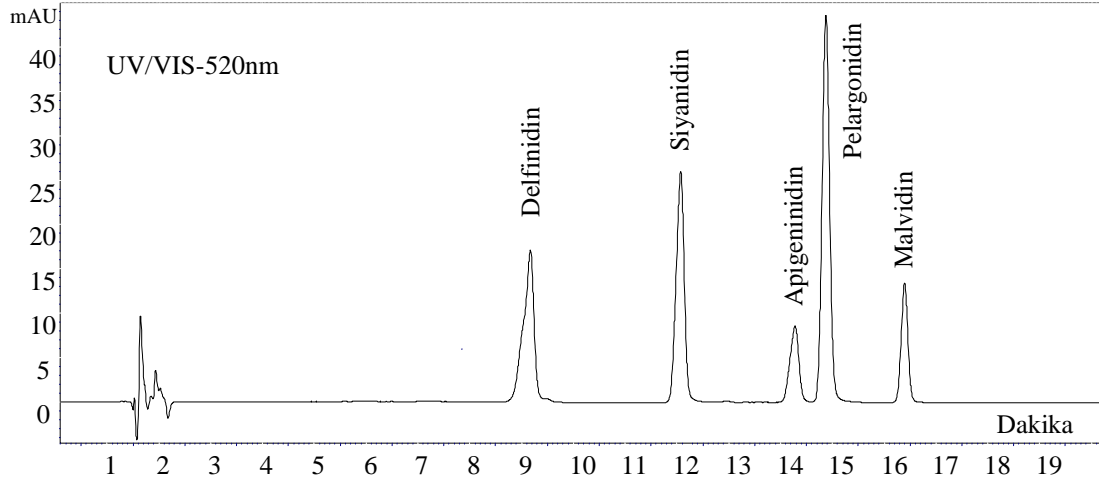
otomatik sekans programı kullanılarak yapıldı. Bu durumda her analiz sürecinde standart yaklaşık 11 saat boyunca 0 °C’de kalmakta ve bununda kararlılığına etkisi olmaktadır. Bu etkiyi net bir şekilde görebilmek için bir seri siyanidin standart çözeltisi içeren vial tek bir gün analiz edilmek üzere 3 tekrarlı hazırlandı. Bu vialler o güne özgü vialler olduğu için yalnızca bir analize tabi tutuldu ve T harfi ile kodlandı. Bu viallerin 1 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda olanlar T1, 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonda olanlar T2 olarak kodlandı. Böylece her analiz günü geldiğinde o günün standart çözeltisinin viali ilk kez dolaptan çıkarılarak HPLC tepsisine yerleştirildi ve analiz edildi. Öte yandan her analiz günü ardışık olarak -18 °C’deki dondurucudan alınarak tüm analiz süreleri boyunca 0 °C’ye ayarlanmış HPLC oto örnekleyicisinde tutulan standart çözeltileri ise S harfi ile kodlandı ve 1 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonunda olanlar S1, 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonda olanlar S10 olarak kodlandı. Tüm analizler için eşdeğer 3 ayrı vial hazırlandı ve çözeltileri analiz edildi.

Antosiyanidinlerin kararlılık testleri Anzer çayının siyanidin içeriği yüksek olarak gözlenen C ve D ekstraksiyon numunelerine de uygulandı. Bunun için C ve D ekstraksiyonu tekrarlandı. Elde edilen ekstraktların 300 µL’ sine 900 µL metanol, 285 µL su ve 15 µL HCl eklenerek (%80 metanol, %19 su ve %1 HCl’li olacak şekilde) ayarlanıp filtreden geçirildi. Bu numuneler ardışık olarak her gün geldiğinde dondurucudan alınarak 0 °C’ye ayarlanmış HPLC oto örnekleyicisine yerleştirildi ve HPLC-UV ile analiz edildi.

### 3.BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. Antosiyanidinlerin analizi için HPLC-UV Metot Optimizasyonu

Optimize edilen HPLC-UV metodu kullanılarak 5 standart antosiyanidin bileşiminin analizine örnek Şekil 5’de verildi. Bu standart antosiyanidinlerden ekstraktta gözlenen siyanidin ve pelargonidin kalibrasyon eğrileri Şekil 6 ve Şekil 7’de verildi.



Şekil 5. Standart antosiyanidin karışımının HPLC-UV kromatogramı ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ )

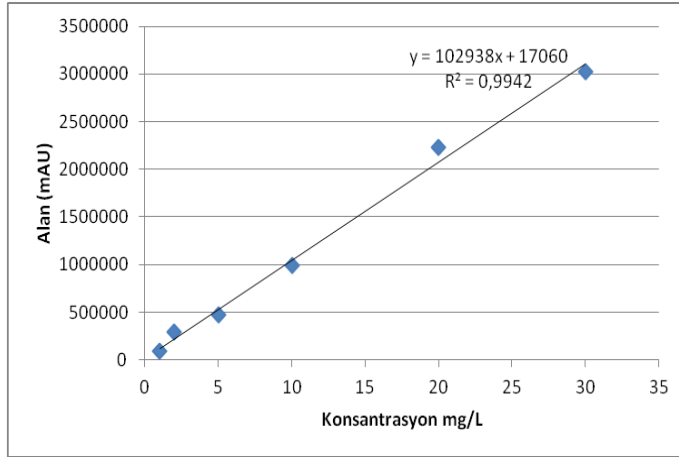
5 Antosiyanidin standardının optimize edilen koşullar altında 17 dakika içerisinde uygun ayırımı sağlanmıştır. Şekil 5’deki kromatogram verileri kullanılarak alıkonma faktörü ( $k'$ ), seçicilik faktörü ( $\alpha$ ), tabaka sayısı ( $N$ ) ve çözünürlük ( $R_s$ ) değerleri hesaplanarak Tablo 5’ de verildi.

Tablo 5. HPLC-UV de optimize edilen ayırma parametreleri

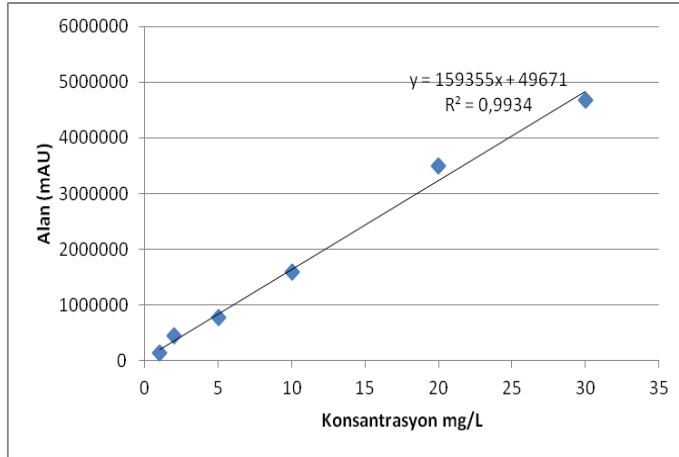
Standartlar	$t_R$ (dk)	W (dk)	$k'$	$\alpha$	N	$R_s$
Delfinidin	9,15	0,40	3,57	1,39	9277,60	5,27
Siyanidin	12,05	0,33	5,05	1,22	21350,90	5,63
Apigeninidin	14,27	0,24	6,13	1,04	44710,99	1,74
Pelargonidin	14,86	0,50	6,43	1,11	14128,11	2,54
Malvidin	16,38	0,29	7,19	1,11	44701,26	4,59
Ortalama teorik tabaka sayısı					26833,77	

Çözünürlük değerinin 1 olması ayırımın %95,4 oranında tamamlandığını gösterir. En az  $R_s=1,5$  olmalıdır ki bu noktada ayırım %99,73 olsun (YBSK Çalıştayı, 2006; Sandra, 2004). Çalışmadaki çözünürlük değerlerimiz 1,74'ten büyük olup ayırım güçlüdür.

Teorik tabaka sayısı (N) 100 ile 100.000 arasında değişebilir. Kolon verimi tabaka sayısının artmasıyla artar. Tabaka sayısı en yüksek olan apigenininin en küçük taban genişliğine sahiptir. Taban genişliği büyüdükçe teorik tabaka sayısı azalmaktadır.



Şekil 6. Siyanidin kalibrasyon eğrisi



Şekil 7. Pelargonidin kalibrasyon eğrisi

HPLC-UV ile 5 antosiyanidin standardının analiz edildiği metot, hassasiyet ve güçlülük açısından değerlendirildi. Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği, kalitatif analiz için dedeksiyon limiti (LOD) hazırlanan standart karışımının 7 kez enjeksiyonu ile belirlendi. LOD, kantitatif analiz tayin limiti (LOQ)



ve optimize edilen HPLC-UV yönteminin kalibrasyon parametreleri Tablo 6’da verilmiştir.

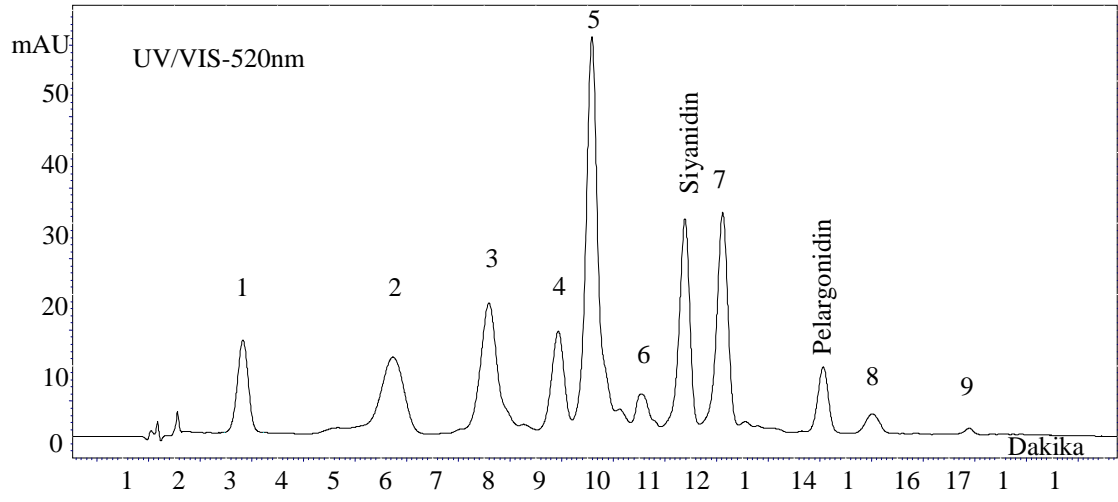
**Tablo 6.** Antosiyanidinlerin HPLC-UV yöntemine göre kalibrasyon ve validasyon parametreleri

RT	Bileşikler	R <sup>2</sup>	%BSS (RT)	%BSS (alan)	LOD (mg.L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg.L <sup>-1</sup> )
9,15	Delfinidin	0,992	0,111	1,653	0,104	0,347
12,05	Siyanidin	0,994	0,065	3,394	0,099	0,331
14,27	Apigeninidin	0,996	0,080	3,307	0,077	0,255
14,86	Pelargonidin	0,993	0,078	3,420	0,051	0,169
16,39	Malvidin	0,992	0,099	3,294	0,103	0,342

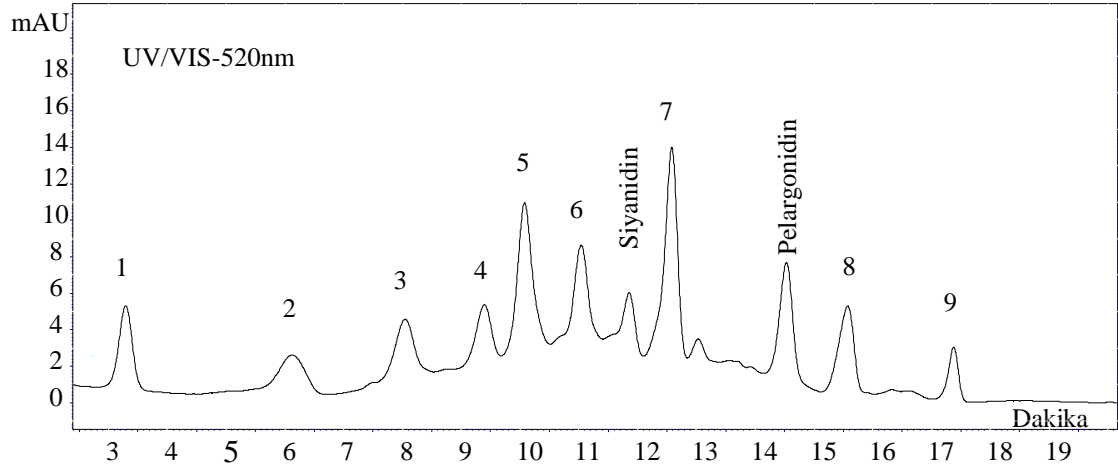
Doğrusal kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir (>0,99). Alıkonma zamanı ve alanların tekrarlanabilirlik seviyeleri, bağıl standart sapmaları %5’in altında bulunmuş olup kabul edilebilir değerdedir. LOD 0,1’in, LOQ ise 0,35’in altındadır.

### 3.2. Anzer çayının HPLC-UV Analizleri

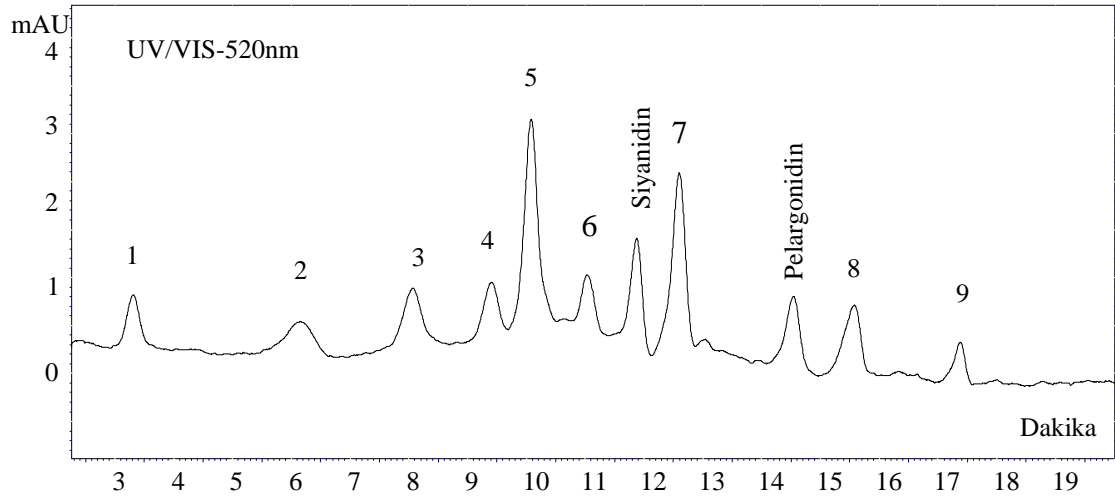
Anzer çayının çiçek kısımları iki farklı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak bölüm 2.2’de anlatıldığı şekilde analize hazırlandı. Optimize edilen HPLC-UV koşulları altında analizi yapılan Anzer çayının A, B, C, D ekstraktlarının kromatogramları Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, ve Şekil 11’de verildi. B, C ve D ekstraktlarının kromatogramlarında çözücü piki diğer bileşiklere karşı baskın olduğundan kromatogramlarda çözücü piki alınmadı.



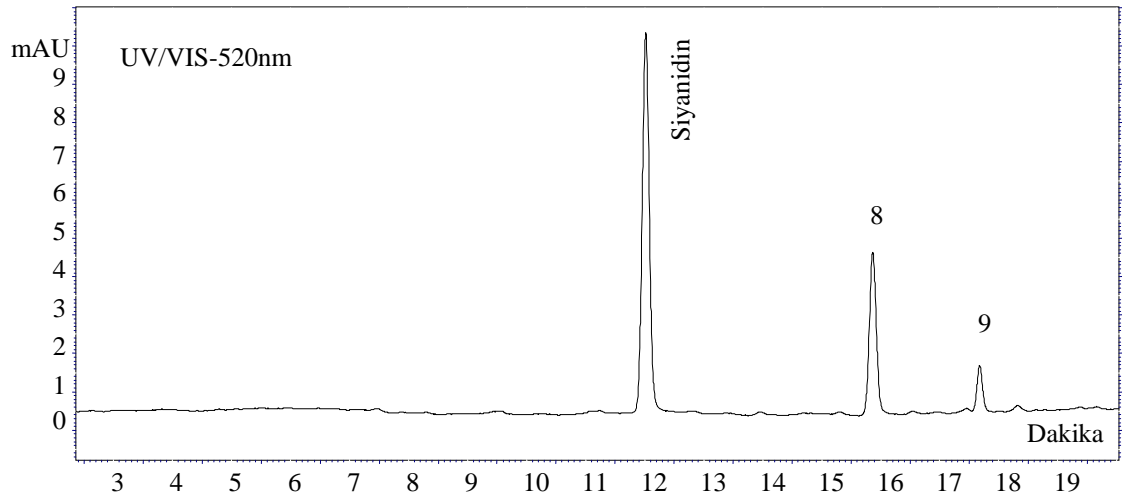
Şekil 8. A ekstraktının HPLC-UV kromatogramı



Şekil 9. B ekstraktının HPLC-UV kromatogramı



**Şekil 10.** C ekstraktının HPLC-UV kromatogramı



**Şekil 11.** D ekstraktının HPLC-UV kromatogramı

Anzer çayının optimize edilen HPLC-UV koşulları altında A, B, C, D ekstraktlarında bulunan antosiyanidin içeriği mg antosiyanidin/g ekstrakt cinsinden Tablo 7’de verildi.

**Tablo 7.** Anzer çayı numunelerinin A, B, C, D ekstraksiyon yöntemlerine göre antosiyanidin içerikleri

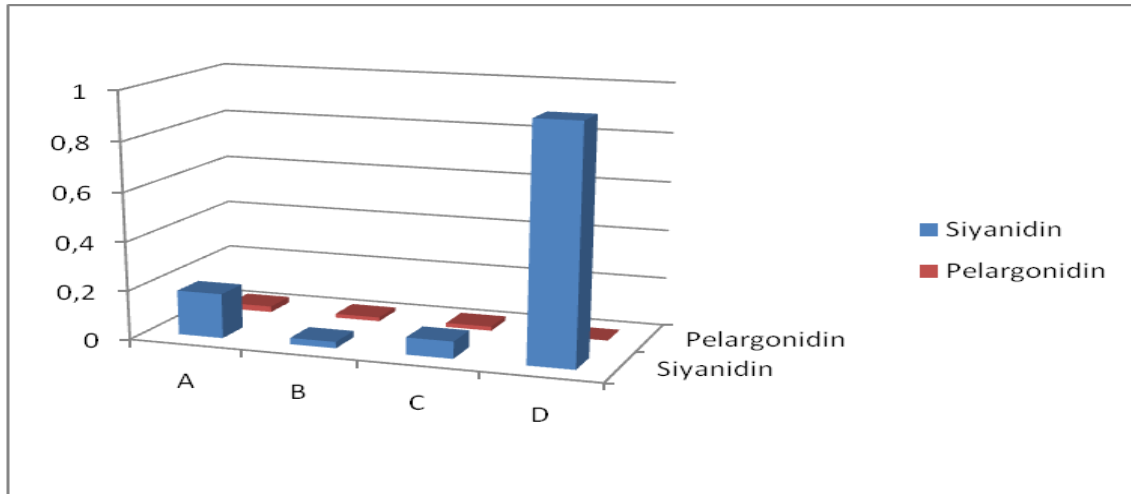
RT	Bileşikler	A <sup>*,#</sup>	B <sup>*,#</sup>	C <sup>*,#</sup>	D <sup>*,#</sup>
11,90	Siyanidin	0,183	0,026	0,070	0,950
14,57	Pelargonidin	0,024	0,016	0,017	G

\*: Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemi

#: Eşdeğer mg antosiyanidin/g ekstrakt

G: Gözlenmedi

Ekstraktlarda, farklı miktarlarda siyanidin ve pelargonidin olduğu gözlenmiştir. Tablo 7 deki verilerin karşılaştırılması açısından daha net anlaşılması için Şekil 12’de bar grafiği halinde incelenmiştir.



**Şekil 12.** Anzer çayı numunelerinin A, B, C, D ekstraksiyon yöntemlerine göre antosiyanidin içeriklerinin bar grafiği halinde gösterimi

Ekstraksiyon yöntemleri kendi aralarında kıyaslandığında A ekstraksiyon yöntemi B ve C ekstraksiyon yöntemlerine göre daha verimlidir (Tablo 7 ve Şekil 12). C yöntemi siyanidin açısından B yöntemine göre daha verimli iken pelargonidin miktarları yaklaşık aynıdır. Siyanidin miktarı D ekstraksiyon yönteminde en yüksek bulunurken bu yöntemde pelargonidin gözlenmemiştir. D ekstraktı, diğer üç ekstraktın farklı olarak hidrolize tabi tutuldu. Bu ekstraktın diğer ekstraktlardan kendisine en yakın A ekstraktına göre bile 5,3 kat daha yüksek miktarda siyanidin içermesi bitkinin siyanidin şeker bağlı glikozitlerince zengin olduğunu göstermektedir. Pelargonidin ise hidroliz ile parçalandığı ve bu sebeple diğer ekstraktlarda belirlenirken, hidrolize

tabi tutulan D ekstraktlarında belirlenemediği görülmektedir. Anzer çayı ekstraktlarının HPLC-UV kromatogramlarında gözlenen, standartlarla örtüşmeyen antosiyanidinlerinin miktarları siyanidin eşdeğeri olarak Tablo 8’de ve alan grafiği olarak Şekil 13’de verildi.

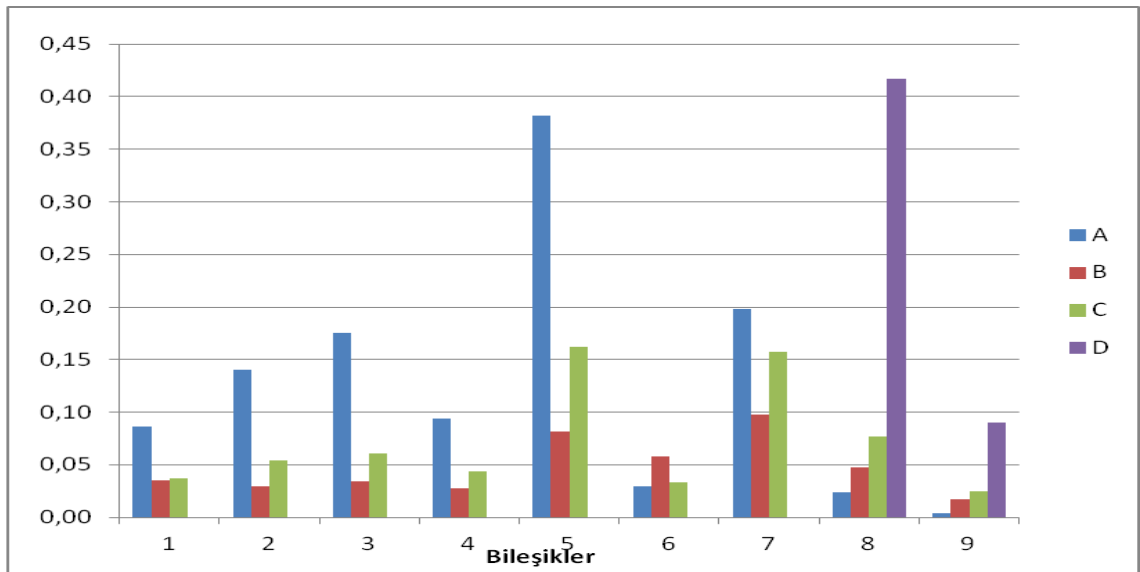
**Tablo 8.** A, B, C ve D ekstraktlarına ait HPLC-UV kromatogramlarında tanımlanamayan piklerin siyanidin eşdeğeri cinsinden konsantrasyonları

Bileşikler	RT	A <sup>*,#</sup>	B <sup>*,#</sup>	C <sup>*,#</sup>	D <sup>*,#</sup>
1	3,33	0,086	0,035	0,037	G
2	6,23	0,140	0,029	0,054	G
3	8,10	0,175	0,034	0,061	G
4	9,43	0,094	0,028	0,044	G
5	10,09	0,382	0,082	0,162	G
6	11,05	0,029	0,058	0,033	G
7	12,60	0,198	0,098	0,157	G
8	15,52	0,024	0,047	0,077	0,417
9	17,67	0,004	0,017	0,025	0,090

\*: Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemi

#: Eşdeğer mg siyanidin/g ekstrakt

G: Gözlenmedi



**Şekil 13.** A, B, C ve D ekstraktlarına ait HPLC-UV kromatogramlarında tanımlanamayan piklerin siyanidin eşdeğeri cinsinden konsantrasyonlarının alan grafiğinde gösterimi

Tablo 8 ve Şekil 13’de 1-7 arası bileşiklerin A ekstraktına en fazla miktarda alınabildiği ve bunu C ekstraktının takip ettiği gözlenmektedir. Şekil 13’te bar grafiğinde pikler alıkonma zamanlarına göre sıralandı ve en çok alıkonan piklerin belirgin olarak D ekstraktında olduğu gözlemlendi. Antosiyaninlerin şeker grubu içermelerinden dolayı polariteleri yüksektir ve bu da kromatogramda erken gelen piklerin daha çok antosiyanin olabileceği ipucunu vermektedir. Bu durumda D ekstraksiyon yönteminde uygulanan hidroliz işlemi hedefine ulaşmış ve antosiyaninlerin şeker gruplarını kırdığı için D ekstraktının kromatogramı daha çok alıkonan (8, 9) bileşenler içermektedir. D ekstraktına ait kromatogramda toplamda üç pik gözlemlendi ve bunlardan birinin siyanidin olduğu tespit edildi. Ayrıca D ekstraktında siyanidin miktarı, siyanidin eşdeğeri olarak ifade edilen piklerden 8 nolu pike göre yaklaşık 2,28 kat ve 9 nolu pike göre ise yaklaşık 10,55 kat daha fazladır. Böylece Anzer çayında hidroliz ile şeker grupları kırılan antosiyaninlerin yüksek oranda siyanidin türevi antosiyaninler olduğu sonucuna varıldı.

### **3.3. Antosiyanidinlerin kararlılık testleri**

Antosiyanidinlerin kararlılığı üzerine yapılan çalışmalar pH, depolama sıcaklığı, kimyasal yapısı, konsantrasyon, ışık, oksijen, çözücü, enzim ve flavonoid etkileri dikkate alınarak yapılmıştır (Rein, 2005).

Böylece kararlılık testi çalışması; pH 1’de, -18 °C’de iki ayrı konsantrasyonda (1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup>) hazırlanan standart siyanidin farklı günlerde yürütülmesi sonucu yapıldı. Ayrıca Anzer çayının kararlılık testleri de siyanidin içeriği yüksek olarak gözlenen C ve D ekstraktlarına uygulanarak numune ekstraktlarındaki siyanidin konsantrasyon kayıpları % olarak verildi. Kararlılık testi için HPLC-UV’de yürütülen standart siyanidin ve anzer çayının konsantrasyonları ve standart sapması ile birlikte sırasıyla Tablo 9 ve Tablo 10’da verildi.

**Tablo 9.** S ve T çözeltilerinin iki farklı konsantrasyondaki (1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup>) kararlılık testi sonuçları

Gün	S1*	S10*	T1*	T10*
1	1,000±0,006	10,000±0,078	1,000±0,006	10,000±0,078
2	0,993±0,009	9,736±0,113	0,981±0,007	9,646±0,024
3	0,956±0,010	9,131±0,093	0,946±0,011	9,148±0,052
5	0,964±0,017	8,906±0,057	0,949±0,003	9,250±0,020
10	0,818±0,031	7,074±0,112	0,845±0,002	8,272±0,112
15	0,775±0,050	5,587±0,231	0,843±0,001	8,046±0,029
20	0,702±0,050	4,270±0,231	0,813±0,092	7,850±0,036
30	0,567±0,033	2,894±0,264	0,821±0,004	8,001±0,058
40	0,470±0,039	1,787±2,014	0,796±0,005	7,863±0,025
50	0,405±0,048	1,003±0,173	0,877±0,005	8,037±0,008

\*: Eşdeğer mg siyanidin.L<sup>-1</sup>

S: Her analiz gününde sürekli dondurucudan çıkarılan standartlar (S1: 1 mg.L<sup>-1</sup> , S10: 10 mg.L<sup>-1</sup>)

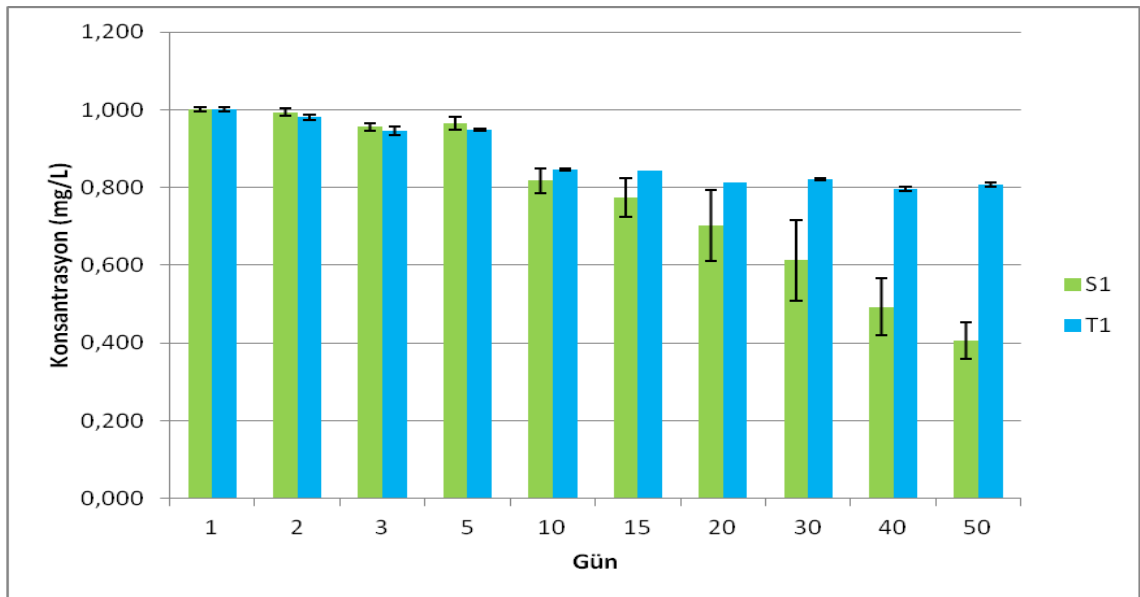
T: Yalnızca belirlenen analiz günü dondurucudan çıkarılan standartlar (T1: 1 mg. L<sup>-1</sup> , T10: 10 mg.L<sup>-1</sup>)

Konsantrasyonda zamana bağlı olarak azalmalar meydana geldi. Bu azalmalar, dondurucuda bekletilerek tek bir analiz gününde 0 °C'ye ayarlanmış HPLC oto örnekleyicisine alınan T örneklerinde ve dondurucuda bekletilen fakat takip eden her analiz gününde 0 °C' deki HPLC oto örnekleyicisine alınan S örneklerinde ayrı ayrı incelendi. Tablo 9'da S1, 1,000±0,006 mg.L<sup>-1</sup> başlangıç konsantrasyonundan 50 günün ardından 0,405±0,048 mg.L<sup>-1</sup>' ye düşmekte T1 ise 1,000±0,006 mg.L<sup>-1</sup> başlangıç konsantrasyonundan 0,821±0,004 mg.L<sup>-1</sup>'ye düşmektedir. S1 standardı ardışık olarak dondurucudan çıkarıldığı ve analiz süresince 0 °C'de tutulduğu için T1'e göre sıcaklıktan daha fazla etkilenmiş ve konsantrasyon kaybı 4,83 kat daha artmıştır. S10 çözeltisi 10,000±0,078 mg.L<sup>-1</sup> başlangıç konsantrasyonundan 50 günün ardından 1,003±0,173 mg.L<sup>-1</sup> ye, T10 ise 10,000±0,078 mg.L<sup>-1</sup> başlangıç konsantrasyonundan 8,037±0,008 mg.L<sup>-1</sup>' e düşmektedir. Burada da S10'daki azalış T10'a göre 4,5 kat daha fazladır.

Sonuçlar, sıcaklık değişimi ve zamana bağlı olarak siyanidin standardının bozulmasının belirlenmesi için istatistiksel olarak %95 güven seviyesinde T testi uygulanarak değerlendirildi. T testi için 1. Gün denemeleri diğer günlerle karşılaştırıldı. Elde edilen T testi sonuçlarına göre; 1 mg.L<sup>-1</sup> standardın 2. günü ile 1. gün arasındaki fark haricinde 50. güne kadar olan tüm günlerdeki T1 ve T10 standartlarında değişimler

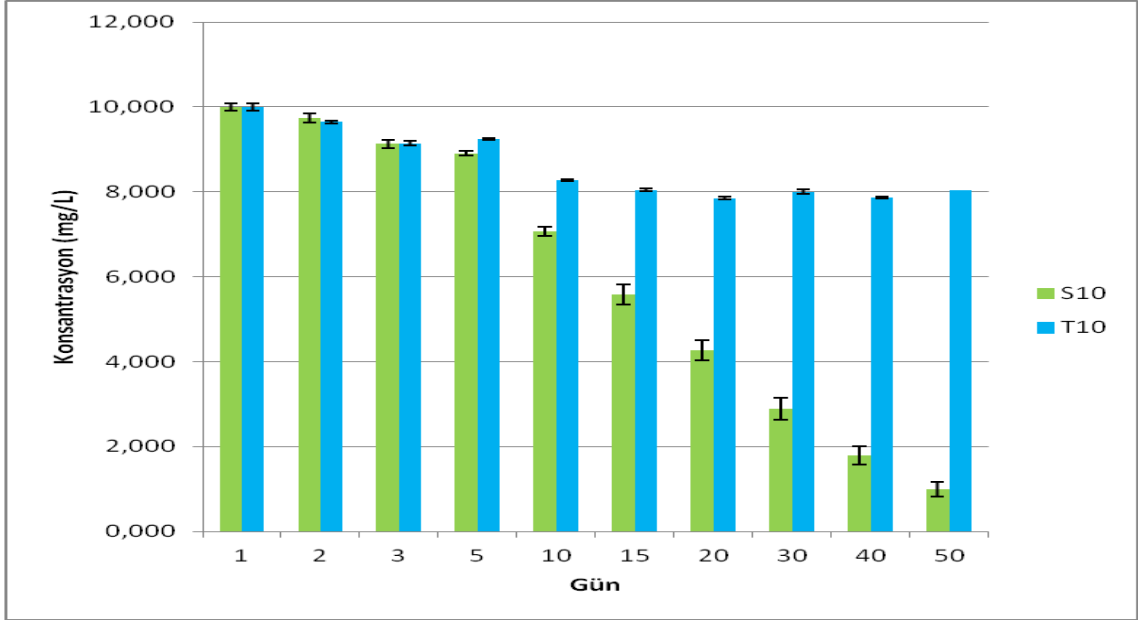
önemli bulundu ( $p < 0,05$ ). Hem S hem de T analizleri sonucunda zamana bağlı olarak önemli bulunan miktar azalması, örneklerin  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki depolanma koşullarında bile siyanidin bileşiğinde bozunmanın olduğunu gösterdi. Literatürde yapılan çalışmalar arasında, bu çalışma süresince de değerlendirilen Cabrita ve ark. (2000) tarafından antosiyanidinlerin şeker bağlı (antosiyanidin-3-glikozit) bazı bileşikleri üzerine yapılan çalışmada pH 1-12 aralığı seçilmiş olup, iki ayrı sıcaklık değeri 10 ve  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  çalışılarak kararlılık testi yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda uygun pH aralığının 1-3 olduğu belirlenmiş olup, pH 1'de  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 60 gün sonunda pelargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvidin antosiyanidinlerinin 3-glikozit formları için ortalama %10 konsantrasyon kaybı gözlenmiştir. pH 1'in  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki örneklerinde ise 60 gün sonunda %8-25 arası kayıplar olduğu gözlenmiştir. pH 1'deki siyanidin-3-glikozitin  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki analizlerinde 60 gün sonundaki konsantrasyon kaybı yaklaşık %4 civarında iken  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki analizlerinde ise bu kayıp yaklaşık %8 civarında gözlenmiştir. Fenolik bileşiklerin şeker grubu bağlı yapılarının kararlılıkları, fenolik bileşik çekirdeklerine göre daha yüksektir. Şeker grupları antosiyanidinlerin sudaki çözünürlüklerini artırdığı gibi kararlılık da sağladığı belirtilmiştir. (Cuyckens ve Claeys, 2004).

Tablo 9'daki değişimleri daha net görebilmek için,  $1\text{ mg.L}^{-1}$  ve  $10\text{ mg.L}^{-1}$  konsantrasyonlarındaki zamana bağlı değişim Şekil 14 ve 15'te bar grafiği olarak verildi.



**Şekil 14.** Siyanidin standardının S1 ve T1 çözeltilerinin ( $1\text{ mg.L}^{-1}$ ) günlere göre değişen konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi





**Şekil 15.** Siyanidinin standardının S10 ve T10 çözeltilerinin ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) günlere göre değişen konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi

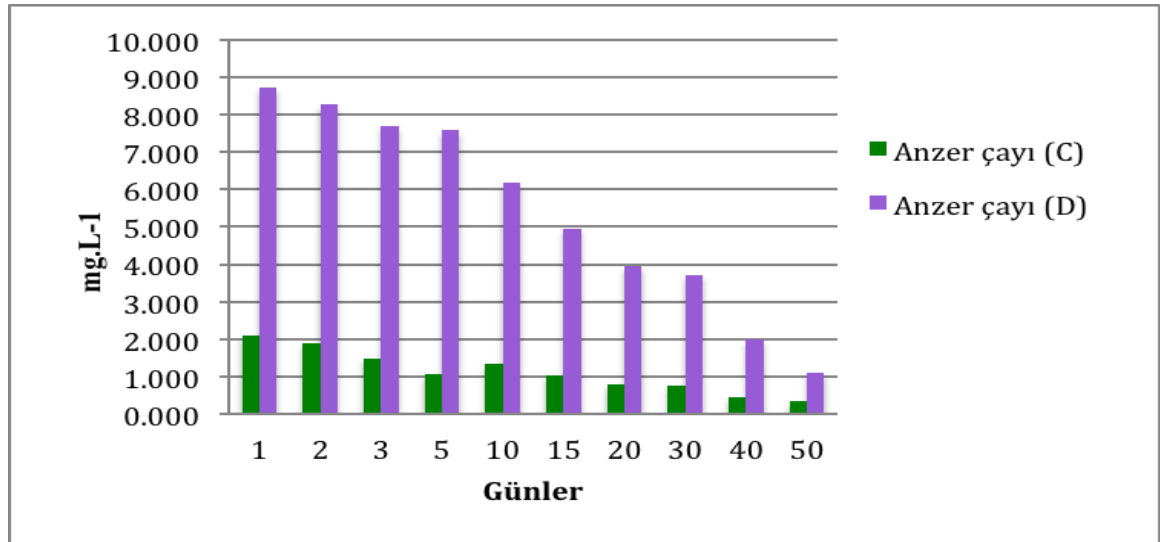
Şekil 14 ve 15' teki grafiklerden S barlarının her iki konsantrasyonda da günlere göre özellikle 5. günün ardından sabit bir eğimde sürekli azaldığı görülmektedir. T barlarının ise her iki konsantrasyon için de 5. gün ile 10. gün arasında belirgin bir düşüşün ardından konsantrasyonlardaki değişimin azaldığı görülmektedir. T1 için 10. gün ile 15. gün arasındaki değişim, yapılan T testine göre %99 güven seviyesinde önemsiz bulundu ( $p>0,05$ ). 10. gün ile takip eden 20, 30, 40 ve 50. günler arasındaki fark ise önemli bulundu ( $p<0,01$ ). T10 için ise 20. güne kadar konsantrasyon düşüşü T testine göre önemli iken ( $p<0,01$ ), 20. gün ile 40. gün arasında konsantrasyon değişimi önemsiz bulundu ( $p>0,05$ ). Ancak 40. gün ile 50. gün arasında değişim önemli bulundu ( $p<0,01$ ). Dolayısıyla T standart çözeltilerinin konsantrasyon değişimleri 10. günden sonra oldukça azalmakta neredeyse sabit kalmaktadır. Bu azalış az da olsa küçük miktardaki T1 çözeltileri için istatistiki olarak %95 güven seviyesinde değişimin devam ettiği ( $p<0,05$ ) ancak büyük miktardaki T10 çözeltileri için istatistiki olarak değişimin devam etmediği sonucu çıkarılmaktadır.

Anzer çayı ekstraktlarındaki siyanidinin pH' sı 1 olan metanolde ve  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de belli günlerde ölçülen konsantrasyonları Tablo 10'da verildi.

**Tablo 10.** Anzer çayında mevcut olan siyanidinin kararlılık testi sonuçları

Gün	Anzer çayı (C, mg.L <sup>-1</sup> )	Anzer çayı (D, mg.L <sup>-1</sup> )
1	2,087	8,729
2	1,878	8,279
3	1,488	7,714
5	1,060	7,582
10	1,349	6,169
15	1,023	4,964
20	0,787	3,950
30	0,763	3,726
40	0,441	1,982
50	0,332	1,100

Tablo 10’da C ekstraktının siyanidin miktarı başlangıçta 2,087 mg.L<sup>-1</sup> iken 50 gün sonunda 0,332 mg.L<sup>-1</sup>, D ekstraktında ise başlangıçta 8,729 mg.L<sup>-1</sup> iken 50 gün sonunda 1,100 mg.L<sup>-1</sup>’ye düştüğü tespit edilmiştir. Tablo 10’daki Anzer çayının C ve D ekstraktına ait konsantrasyon değişimleri Şekil 16’da bar grafiği olarak verildi.



**Şekil 16.** Anzer çayı ekstraktlarının (C ve D) günlere göre değişen siyanidin konsantrasyonlarının grafiksel gösterimi

Anzer çayının hidroliz edilmeyen C ve hidroliz edilen D ekstraktlarında ikinci günden itibaren her geçen günde sürekli konsantrasyon azalmaları gözlenmektedir (Şekil 16).

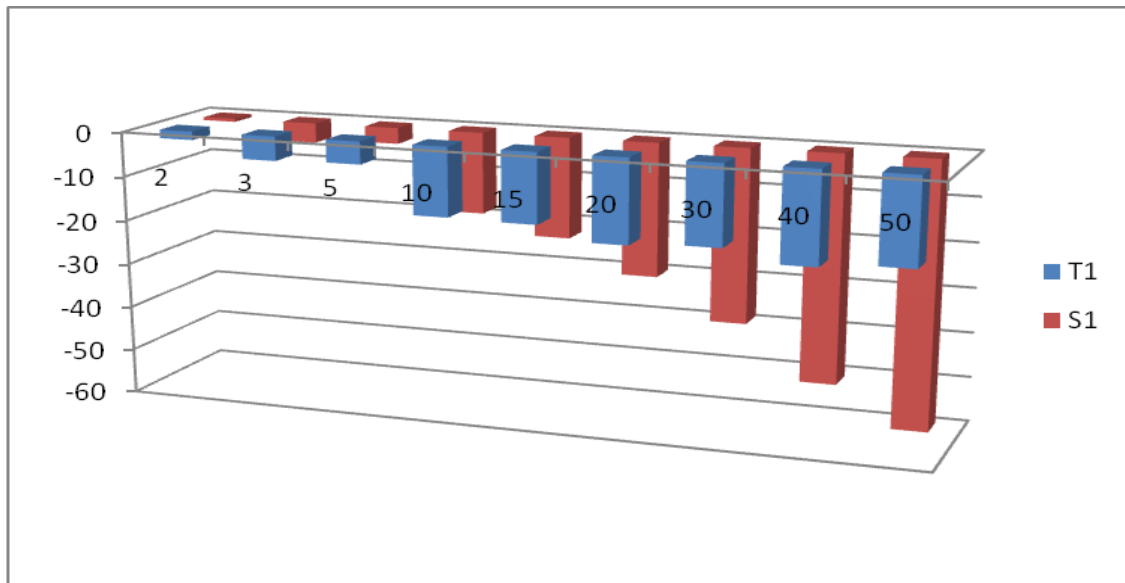
Siyanidinin hazırlanan standart çözeltilerinde (S ve T) ve Anzer çayındaki konsantrasyon kayıpları % olarak Tablo 11’de verildi.

**Tablo 11.** Siyanidin standartı ve Anzer çayında zamana bağlı % konsantrasyon değişimleri

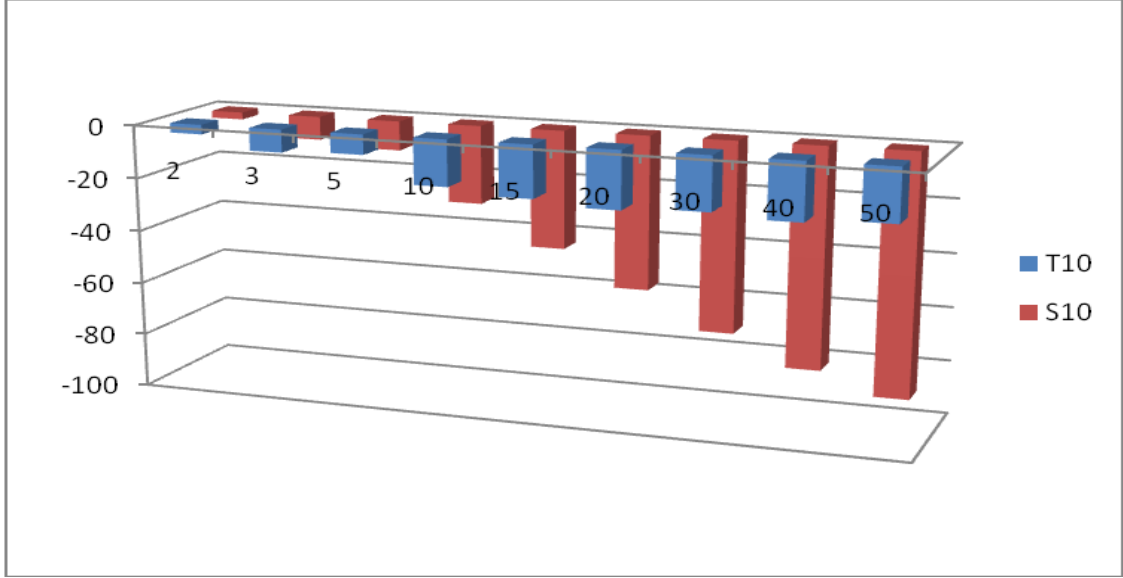
Gün	S1	S10	T1	T10	Anzer çayı (C)	Anzer çayı (D)
2	-0,676	-2,641	-1,893	-3,536	-9,996	-5,158
3	-4,384	-8,694	-5,434	-8,520	-28,693	-11,628
5	-3,560	-10,945	-5,061	-7,502	-37,703	-13,139
10	-18,220	-29,259	-15,458	-17,279	-42,495	-29,330
15	-22,489	-44,131	-15,677	-19,536	-50,953	-43,133
20	-29,771	-57,303	-18,742	-21,499	-62,273	-54,744
30	-38,752	-71,061	-17,866	-19,993	-63,421	-57,317
40	-50,676	-82,129	-20,448	-21,370	-78,887	-77,291
50	-59,451	-89,971	-19,300	-19,630	-84,080	-87,387

Siyanidinin 50 gün sonunda S çözeltilerindeki % kayıpları,  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  konsantrasyonda %60 iken,  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  konsantrasyonda %90 civarında olduğu gözlemlendi. Bununla beraber  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  ve  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  konsantrasyonlu T çözeltilerinde 50 gün sonunda konsantrasyon kaybının benzer bir şekilde %20 civarında olduğu gözlemlendi. Anzer çayının C ve D ekstraktlarının 50 gün sonundaki konsantrasyon kayıplarının %85 civarında birbirine yakın olduğu gözlemlendi.

Her analiz gününde sürekli dondurucudan çıkarılan standartlar (S) ile yalnızca analiz günü çıkarılan standartlar (T) arasında konsantrasyon kaybının daha net anlaşılması için iki ayrı grafik gösterim Şekil 17 ve Şekil 18’ de verildi.



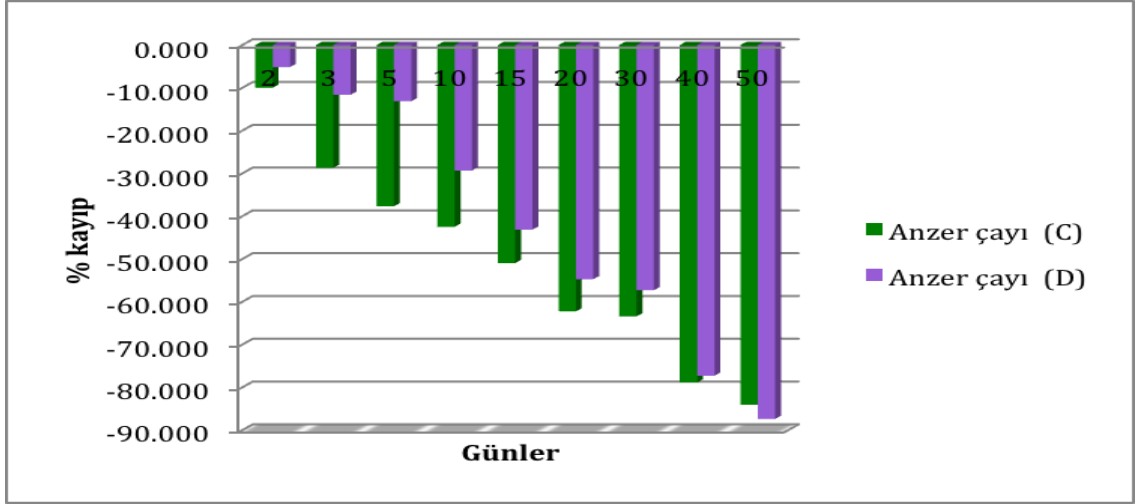
**Şekil 17.** Siyanidinin standardının S1 ve T1 çözeltilerinin % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi



**Şekil 18.** Siyanidinin standardının S10 ve T10 çözeltilerinin % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı olarak grafiksel gösterimi

Şekil 17 ve 18'den de anlaşılacağı gibi siyanidin standardı  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den analiz amacıyla  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki HPLC oto örnekleycisinde beklediği esnada bozunmaya uğramıştır. Her analiz gününde bozunma miktarı artmış ve 50. günde en yüksek azalış gözlemlendi. Doğrusal azalmanın S çözeltilerinde ve anzer çayı numunelerinde ilerleyen günlerde de devam edeceği tahmin edilmektedir. Zira 50 günlük çalışma boyunca değerlerde sürekli azalma gözlenip, kaybın durması ve sabitleme gibi bir meyil bu örneklerde gözlenmemiştir. Ancak sadece analiz gününde  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye alınan T çözeltilerinde kayıplar, T1 örneğinde 20, T10 örneğinde ise 15. günden itibaren %20 civarında sabit kalmaktadır.

Anzer çayının günlere göre % konsantrasyon kayıpları Şekil 19'da bar grafiği şeklinde verildi.



**Şekil 19.** Anzer çayının günlere göre % konsantrasyon kayıplarının karşılaştırmalı grafiği

Hidroliz edilmeyen C ekstraktında, hidroliz edilen D ekstraktına göre konsantrasyon kaybı ilk 10 gün boyunca yaklaşık iki kat daha fazladır. 50 gün sonunda ise konsantrasyon kayıpları benzer düzeyde %85 civarındadır. Oysa ki hidrolize tabi tutulmayan ekstraktların kararlılığı hidroliz edilen ekstraktlara göre daha fazla olması beklenirken, 50 gün sonunda konsantrasyon kayıpları her ikisinde de %85 civarında eşitlenmektedir. Bu durum matriks etkisi ile açıklanabilir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anzer çayı, adını aldığı Anzer yaylasının florasını oluşturan ve dünyaca meşhur Anzer balının içeriğinde önemli yeri olan bitkilerden biridir. Anzer balının şifa kaynağı olması bu yaylada yetişen çiçeklere ilgiyi artırmıştır. Morumsu renkli çiçekleri olan bitkinin fenolik asitleri ve flavonoidleri üniversitemiz bünyesinde tez çalışması olarak incelenmiş ve oldukça zengin içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Fenolik asitlerden kafeik asit ve flavonoidlerden kuersetin bitkide başlıca gözlenen fenolik bileşenlerdir (Çavuş, 2011). Renkli çiçeklerinin antosiyanidin içeriğinin belirlenmesi bu tez çalışmasında hedeflendi. Bu çalışmada kurutulmuş Anzer çayının çiçek kısımları kullanıldı. Bunun için uygun HPLC-UV yöntemi literatürden de faydalanılarak optimize edildi. Bitkiden antosiyanidinler bir kaç yöntemle ekstrakte edildi ve karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Antosiyanidinlerin şeker grubu içeren formu olan antosiyaninler, doğal kaynaklarda çok daha yaygın bulunmaktadır. Şeker grupları onların gıdalarda daha kararlı olmalarını sağlar ve suda çözünürlüklerini artırır. Ancak antosiyanin standartları antosiyanidin standartlarının yanında oldukça pahalı olduklarından çalışmalarda daha çok antosiyanidin standartları kullanıldı. Antosiyanidinlerin bitkilerde belirlenebilmesi için ekstraksiyon aşamasına hidroliz işlemi de katılır ve antosiyaninlerin şeker grupları kırılarak antosiyanidin çekirdeklerinin belirlenmesi sağlanır. Bu çalışmada hidrolize maruz bırakılan ve bırakılmayan şekilde farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulandı. Ekstraktlarda genel olarak siyanidin ve pelargonidin tesbit edildi. Siyanidin miktarı hidroliz edilen ekstraktta, diğer ekstraktlardan kendisine en yakın olana göre 5,3 kat daha yüksek miktarda bulunmuş olması bitkinin siyanidinin şeker bağlı glikozitlerince zengin olduğunu göstermektedir. Pelargonidin ise hidrolizli ekstraktta gözlenmediği için hidrolize dayanıklı olmadığı sonucuna varıldı. Ancak siyanidin ve pelargonidin haricinde 2 tanesi hidrolizli ekstraktta da gözlenen 9 bileşen daha gözlemlendi. Mevcut standartlar ile aydınlatılmayan bu bileşenlerin sadece hidroliz edilmeyen örneklerde bulunan 7 tanesinin şeker bağlı antosiyaninler olduğu sonucuna varıldı. Bu maddelere şeker gruplarının kattığı polarite özelliğinden dolayı alıkonma zamanları daha kısadır. Öte yandan kromatogramın sonunda beliren ve tüm ekstraktlarda ortak olan 2 pikin antosiyanidin oldukları ve hidroliz sayesinde miktarlarının daha da arttığı tespit edildi. Antosiyanidinlerin ışıktan etkilendikleri ve miktarlarının azaldığı bilinmektedir. Bundan dolayı yaş örneklerle çalışmak daha uygun

olacaktır. Ancak Anzer çayının yaş örnekleri çalışma süresince temin edilemediğinden dolayı gölgede kurutulmuş taze örnekler ile çalışma yapıldı. Bu çalışmanın devamı olarak bu bitkinin yaş örnekleri temin edilebilir ve antosiyanidin analizleri bu çalışma ile karşılaştırılabilir.

Tez çalışması boyunca antosiyanidin standartlarının zamanla miktarlarındaki azalmanın ciddi boyutlarda olduğunun farkedilmesi üzerine bu bileşiklerin kararlı oldukları koşullar araştırıldı. Literatürde antosiyaninler ile ilgili olan kararlılık çalışmaları incelendiğinde, antosiyanidinler için kararlılığın bu çalışmalarda verilen pH değerlerinde ve daha düşük sıcaklıklarda nasıl olacağını araştırılmasına karar verildi. Bunun için metanol içinde %1 HCl ile pH 1'e ayarlanan, 1 ve 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda hazırlanan ve -18 °C'de saklanan standart siyanidin çözeltilerinin 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 ve 50. günlerde konsantrasyon değişimleri HPLC-UV yöntemi kullanılarak ölçüldü. Konsantrasyonda zamana bağlı olarak azalmalar meydana geldi. Bu azalmalar, hem dondurucuda bekletilerek tek bir analiz gününde 0 °C'ye ayarlanmış HPLC oto örnekleyicisine alınan örnekler, hem de dondurucuda bekletilen fakat takip eden her analiz gününde 0 °C'deki HPLC oto örnekleyicisine alınan örneklerde ayrı ayrı incelendi. Siyanidinin 0 °C'ye alınan çözeltilerinde 50 gün sonunda 1 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyondaki çözeltide %60'a kadar azalma olurken, 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonda ise %90'a varan azalma gözlemlendi. Bununla beraber 1 mg.L<sup>-1</sup> ve 10 mg.L<sup>-1</sup> konsantrasyonlu sadece belirlenen günde analizi yapılan siyanidin çözeltilerinde ise 50 gün sonunda %20 civarında konsantrasyon kaybı olduğu gözlemlendi. Anzer çayı ekstraktlarında kararlılık testine tabi tutulup hidrolizli ve hidrolizsiz olmak üzere yeni hazırlanan iki ayrı ekstrakt -18 °C'de saklanarak takip eden her analiz gününde 0 °C'ye alınarak HPLC-UV analizi yapıldı. Anzer çayının her iki ekstraktında da 50 gün sonundaki konsantrasyon kayıplarının benzer bir şekilde %85 civarında olduğu gözlemlendi. Oysaki hidroliz edilmeyen ekstraktın şeker gruplarının verdiği kararlılık ile daha az konsantrasyon kaybına uğrayacağı tahmin edilmekteydi. Artık bu durumun çiçek ekstraktlarının içerisinde gerçekleşebilecek kompleks matriksi reaksiyonlardan kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir.

Genel olarak bitkinin antosiyanidinlerinden iki tanesi bu tez kapsamında aydınlatıldı. Daha detaylı bir çalışma olarak tanımlanamayan piklerinde tanımlanmasını sağlayacak olan HPLC-MS kullanılarak yapılabilir ve böylece diğer antosiyaninler karakterize edilebilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Andersen, O. M., 2002.** Anthocyanin Occurances and Analyses, Proceedings of the Int. Workshop on Anthocyanins: Research and Development of Anthocyanins, 17-19 April, Adelaide, South Australia.
- Amr, A. & Al-Tamimi, 2007.** Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 985–991.
- Aramwit, P., Bang, N., Srichana, 2010.** The Properties and Stability of Anthocyanins in Mulberry Fruits. *Food Research International*, 43, 1093- 1097.
- Awika, J.M., Rooney, L. W., Waniska, R. D. 2005.** Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1–2), 293–301
- Bal, Y., 2001.** Bitkilerden Etken Madde İzolasyonu ve Özelliklerinin Belirlenmesi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir
- Bridle, P., ve Timberlake, C.F., 1996.** Anthocyanins as Natural Food Colours- Selected Aspects. *Food Chemistry*, 58, 103-109
- Cabrita, L., Froystein, N.A., Andersen, O., 2000.** Anthocyanin Trisaccharides in Blubberies of *Vaccinium padifolium*, *Food Chemistry*, 69: 33-36p.
- Cabrita, L., Fossen T. ve Andersen E. M., 2000.** Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions, *Food Chemistry*, 68, 101-107,
- Camire, M.E., Dougherty M. P., Jack L 2007.** Briggs Functionality of fruit powders in extruded corn breakfast cereals *Food Chemistry* 101; 765–770
- Cuyckens, F., Claeys M., 2004.** Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids, *J. Mass Spectrom.*, 39 1-15.
- Çavuş, D. 2011.** *Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus* var. *caucasicus* Ekstraktlarındaki Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Ve Spektrofotometrik Yöntemler İle Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü.
- Cemeroğlu, B., Acar, J., 1986.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:6, Ankara.
- Cemeroğlu, A.P., Cemeroğlu, B.S., 1998.** Sağlık açısından gıda fenolikleri. *Gıda Teknolojisi* 3(9); 52-55.
- Cemeroğlu, B., Karadeniz, F., Özkan, M. 2003.** Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları no: 24 Ankara.



- Clifford, M. N. 2000.** Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7); 1063–1072
- De Villiers, A., Cabooter D., Lynen F., Desmet G., Sandra P., 2011.** High-efficiency high performance liquid chromatographic analysis of red wine anthocyanins, *Journal of Chromatography A*, 1218; 4660–4670.
- Donata Favretto ve Riccardo Flamini 2000.** Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Study of Grape Anthocyanins *Am. J. Enol. Vitic.* 51; 55-64
- Eminağaoğlu, Ö., Manvelidze Z., Memiadze N., 2010.** Artvin İlinde Nesli Tehlike Altında Olan Bitki Türleri I 2. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi 20-22 Mayıs 2010 Cilt: III Sayfa: 1075-1090
- Espin, J.C., Soler-Rivas C, Wichers HJ, Garcia Viguera C. 2000.** Anthocyanin Based Natural Colorants; a New Source of Antiradical Activity for Foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48; 1588-1592
- Fieschi, M., Codignola, A., Mosca, A.M.L., 1989.** Mutagenic flavonol aglycones in infusions and fresh and pickled vegetables. *J. Food Sci.* 54(6); 1492-1495.
- Fossen, T. and Andersen, Q. M., 1997.** Malonated Anthocyanins of Garlic *Allium Sativum* L., *Food Chemistry*, 58, 215-217.
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.T., Ruberto, G., 1996.** Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a miscellar system. Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* 44, 497-501.
- Garcia-Beneytez, E., Cabello, F., Revilla, E., Agric, J. 2003.** *Food Chem* 51-5622
- Giusti, M.M., 2002.** Applications of acylated Anthocyanins as Natural Food Colorants, *Bussiness Briefing: Innovative Food Ingredients*, 1-5p
- Giusti, M.M, Wrolstad R.E. 2003.** Acylated Anthocyanins From Edible Sources and Their Applications in Food Systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225  
Broillard R. 1982. *Anthocyanins as Food Colors*. Academic Press, New York.,
- Giusti, M.M., and Wrolstad, R.E., 1996.** Characterization of Red Radish Anthocyanins, *Jornal of Food Science*, 61, 322-326.
- Go´mez E. Plaza, A. Min˜ano, J. Mari´a Lo´pez-Roca, 2004.** Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods
- Özen, G., Akbulut, M., 2008.** Dut Suyu Antosiyanin İçeriğinin Belirlenmesi. *Türkiye 10.Gıda Kongresi Erzurum*. 279-282.

- Henden, E., Gökçel İ. , Ertas N., 2001.** Eser Analiz Yaz Okulu, 25-29 Haziran 2001, İzmir.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P., 1992.** Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1591-1598.
- Jamal Uddin, A.F.M., Hashimoto F., Miwa T., Ohbo K., Sakata Y., 2004.** Seasonal variation in pigmentation and anthocyanidin phenetics in commercial Eustoma flowers, *Scientia Horticulturae* 100, 103–115.
- Nakajima, J. i., I. Tamaka, S. Sco., M. Yamazaki, K. Saito, J. 2004.** *Biomed Biotechnol* 5 241
- Karakaya, S., El, S.N., 1997.** Flavonoidler ve sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 26(2), 54-60.
- Katsube, T., Imawaka, N., Kawano, Y., Yamazaki, Y. 2006.** Antioxidant Flavonol Glycosides in Mulberry (*Morus Alba L.*) Leaves Isolated Based on LDL Antioxidant Activity. *Food Chemistry*, 97, 25–31.
- Konczak, I., Zhang, W. 2004.** Anthocyanins-More than Nature’s Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 239–240.
- Küçük, V., Ballıkaya, S., 2003,** Meyve sebzelerden elde edilen doğal renk maddelerinin üretimi ve gıda sanayiinde kullanım alanları, E.Ü. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü Bitirme ödevi, Bornova-İzmir
- Malingre, T., Hendriks H., Batterman S., Bos R., Visser J., 1975.** The essential oil of *Cannabis sativa*. *Planta Med.* Aug; 28(1): 56-61.
- Metivier, R. P., Francis, F. J., & Clydesdale, F. M. 1980.** Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of Food Science*, 45(4), 1099–1100.
- Monagas, M., Garrido, I., Bartolomé, B. e Gómez-Cordovés, C., 2006.** Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera L.* *Analytica Chimica Acta*, Volume 563, 1-2, 401-410.
- Orhan, I., Şenol F.S., Gülpınar A.R., Kartal M., Şekeroğlu N., Deveci M., Kan Y., Şener B., 2009** Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. Pallida*, *Food Chem Toxicol.* 47,6, 1304-1310.
- Pazmino-Duran, A.E., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., & Gloria, B. A. 2001.** Anthocyanins from *oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75(2), 211–216.

- Philpott, M., Ferguson L.R., Gould K.S., Harris P.J. 2009.** Anthocyanidin-containing compounds occur in the periderm cell walls of the storage roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*) *Journal of Plant Physiology* 166 1112-1117.
- Phippen, W.B. and J.E. Simon., 1998.** Anthocyanins in basil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5); 1734-1738.
- Qin, C., Li Y., Niu W., Ding Y., Zhang R., Shang X. 2010.** Analysis and Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 117-126.
- Rein, M. 2005.** Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.
- Revilla, E., Ryan, J.-M., and Martin-Ortega, G., 1998.** Comparison of Several Procedures Used for The Extraction of Anthocyanins From Red Grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4592-4597.
- Rodriguez- Sanona, L.E., Gusti, M. M., and Wrolstad, R.E., 1998.** Anthocyanin Pigment Composition of Red-Fleshed Potatoes, *Journal of Food Science*, 63, 458-465.
- Rice-Evans, C.A., Miller N. J. ve Paganga G., 1996.** Structure-Antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
- Saito, N., ve Harborne J.B., 1992.** Correlation Between Anthocyanin Type, Pollinator and Flower Colour in the Labiate, 31, 3009,
- Sandra, P., 2004.** *Advanced Separation Science*, Ghent University, Belgium.
- Schobinger, U., 1988.** *Meyve ve Sebze Suyu Üretim Teknolojisi*. Çeviren J. Acar, Eugen Ulmer GmbH and Co. Stuttgart. Germany
- Shahidi, F., Naczki, M., 1995.** *Food Phenolics, Chemistry, Effects, Applications*. Technomic, USA.
- Skoog, D.A., James Holler, F., Nieman T.A., 1998.** *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth Edition, Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Saunders College Publishing, US, Bilim Yayıncılık, Ankara
- Tamura, H., Yamagami, A., 1994.** *J. Agric. Food Chem.* 42, 1612.
- Timberlake, C.F., Bridle, P., 1976.** Interactions Between Anthocyanins, Phenolic Compounds and Acetaldehyde and Their Significance in Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 97-105.

- Tokgöz, H., Gölükcü, M., Toker, R., 2010.** Determination Of Convenient Moro Blood Orange For Juice Production And The Effect Of Light, Storage Temperature And Ph On The Anthocyanin Stability Of The Product
- Tsai, P.T., Delva, L., Yu, T.Y., and Dufosse, L., 2005.** Effect of Sucrose on The Anthocyanin and Antioxidant Capacity of Mulberry Extract During High Temperature Heating. Food Research International, 38, 1059-1060.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Chon, S.W., Kawakishi, S. ve Osowa, T. 1994.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 2407.
- Munez, V., Monogas, M., Gomez-Cordoves, M.C., Bartolome, B., 2004.** Postharvest Biol. Technol 31 69
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., 1998.** Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. Food Chemistry 63(3), 335-342.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1996.** Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 44,701-705.
- Withy, L.M., Nguyen, T.T., Wrolstad, R.E. ve Heatherbell, D.A. 1993.** Storage Changes in Anthocyanin Content of Red Raspberry Juice Concentrate. Journal of Food Science, 58, 190-192.
- Yıldız, L., 2007.** Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ve Kapiler Elektroferez Uygulamaları (YBSK) Çalıştayı, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Eskişehir, Türkiye. 4-8 Aralık 2006.

## **ÖZGEÇMİŞ**

17.05.1986 tarihinde İstanbul`da doğdu. İlköğrenimini Zeytinburnu Reşat Tardu ilk öğretim okulunda tamamladı. Orta öğrenimi Bahçelievler Kemal Hasođlu lisesinde tamamladı. Yüksek öğrenimine 2006 yılında Diyarbakır Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde başladı ve 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılı itibariyle Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesinde Kimya Bölümünde lisansüstü eğitime başlamış olup halen devam etmektedir.