KİRAZ *(Prunus avium),* ÇİLEK *(Fragaria vesca)* VE KIZILCIK *(Cornus mas* L.*)* MEYVELERİNDEKİ ANTOSİYANİN BİLEŞİKLERİNİN HPLC-ESI-MS İLE TAYİNİ VE KARAKTERİZASYONU

NAGİHAN MEHPARE KARAASLAN

Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Mehmet YAMAN

ŞUBAT-2012

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİRAZ *(Prunus avium)*, ÇİLEK *(Fragaria vesca)* VE KIZILCIK *(Cornus mas* L.*)* MEYVELERİNDEKİ ANTOSİYANİN BİLEŞİKLERİNİN HPLC-ESI-MS İLE TAYİNİ VE KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Nagihan Mehpare KARAASLAN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 11.01.2012
Tezin Savunulduğu Tarih: 16.02.2012

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Mehmet YAMAN**

Diğer Jüri Üyeleri: **Prof. Dr. Candan HAMAMCI**

Prof. Dr. Ali ÖLÇÜCÜ

Prof. Dr. Eyüp BAĞCI

Doç. Dr. Habibe ÖZMEN

ŞUBAT-2012

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışmada, antikanserojen ve antioksidan olan antosiyanin bileşiklerinden delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit türlerinin kiraz (*Prunus avium* L.), çilek (*Fragaria vesca* L.) ve kızılcık (*Cornus mas* L.) meyvelerindeki konsantrasyonları HPLC-MS yöntemiyle tayin edildi. Çalışmanın ilk aşamasında, her bir bileşik için ayrı ayrı olmak üzere HPLC-MS için akış hızı, fragmentasyon (parçalayıcı) voltajı, enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı gibi parametreler optimize edildi. Meyve örneklerinin ekstraksiyon basamağında, her bir meyve için çözücü taraması, ekstraksiyon süresi, çözücü/örnek oranı gibi parametreler optimize edildi. Böylece bulunan optimum şartlarda elde edilen örneklere ait ekstraktlar optimum HPLC-MS şartları kullanılarak analiz edildi. Ölçüm basamağında kimyasal girişim olup olmadığının belirlemek için standart ekleme metodu uygulandı.

Çalışmalarımda beni yönlendiren, büyük ilgi, anlayış ve tecrübelerini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet YAMAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Burhan ATEŞ ve Merve Gökşin KARAASLAN' a teşekkür ederim. Çalışmalarım süresince desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca göstermiş oldukları anlayış, özveri ve içtenlikten dolayı aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

NAGİHAN MEHPARE KARAASLAN

ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ……	II
İÇİNDEKİLER……..	III
ÖZET……..	V
SUMMARY……	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ……	VII
TABLOLAR LİSTESİ……..	XVI
KISALTMALAR……	XVII
1. GİRİŞ……..	1
2. GENEL BİLGİLER……..	3
2.1. Fenolik Bileşikler…….	3
2.1.1. Fenolik Asitler…….....	3
2.1.2. Flavonoidler……..	4
2.1.2.1. Antosiyaninler……..	9
2.1.2.1.1. Antosiyaninlerin Sağlık Üzerine Etkileri…….	14
2.2. Çalışılan Meyvelerin Özellikleri…….....	16
2.2.1. Kiraz *(Prunus avium* L.*)*…….....	16
2.2.2. Çilek *(Fragira vesca* L.*)*…….....	17
2.2.3. Kızılcık *(Cornus mas* L.*)*…….....	18
3.ANALİZ YÖNTEMLERİ……..	19
3.1. Ekstraksiyon……....	19
3.2. Kromatografik Teknikler……...	20
3.3. Spektroskopik Metodlarla Toplam Antosiyanin Tayini…….....	21
3.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)……..	22
3.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı……	23
3.4.2. Pompa Sistemleri…….	25
3.4.3. Örnek Enjeksiyon Sistemleri……..	26
3.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları……...	27
3.4.4.1. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri……..	27
3.4.5. Dedektörler……...	27
3.4.5.1. Absorbans Dedektörleri……	28
3.4.5.2. Filtreli Ultraviyole Absorbans Dedektörleri……..	29
3.1.5.3. Monokromatörlü Ultraviyole Absorbans Dedektörleri…….	29
3.4.5.4. Floresans Dedektörleri……..	29
3.5. Kütle Spektrometresi……..	29
3.5.1. Moleküler Kütle Spektrometresinde İyon Kaynakları…….	30
3.5.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları……	31
3.5.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı……..	31
3.5.1.1.2. Kimyasal İyonlaştırma Kaynakları……..	33
3.5.1.1.3. Alan İyonlaştırma Kaynakları……..	34
3.5.1.2. Desorpsiyon Kaynakları…….....	34
3.5.1.2.1. Alan Desorpsiyon Kaynakları……...	34
3.5.1.2.2. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma…….	35
3.5.1.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma…….	35

3.5.1.2.4. Hızlı Atom Bombardıman Kaynakları……. 35
3.5.2. Kütle Ayırıcıları……... 35
3.5.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi……... 39
3.5.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları……. 42
3.6. UV-Görünür Bölge Spektrometresi……... 43
3.6.1. Işık Kaynakları……..... 43
3.6.2. Monokromatör……. 44
3.6.3. Dedektörler……... 44
3.7. Bazı Analitik Terimler…… 45
3.8. Literatürde Antosiyaninler ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar……... 46
4. MATERYAL-METOT…….. 56
4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler……. 56
4.2. Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması……... 56
4.3. Örneklerin Temini…….. 57
4.4. Antosiyanin Bileşiklerinin HPLC-ESI-MS' de Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları……..... 58
4.4.1. Delfinidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS İle Tayini Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi……... 59
4.4.2. Siyanidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi…… 70
4.4.3. Pelargonidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi……. 84
4.4.4. Malvidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS İle Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi…… 100
4.4.5. Delfinidin-3-*o*-glikozit, Siyanidin-3-*o*-glikozit, Pelargonidin-3-*o*-glikozit ve Malvidin-3-*o*-glikozit Bileşiklerini Birlikte İçeren Kromatogramların Elde Edilmesi…… 110
4.5. Toplam Antosiyanin Tayini…… 115
4.6. Örneklerin Analize Hazırlanması…….. 116
4.6.1. Meyve Örneklerinin Ekstraksiyonu……... 116
4.6.1.1. Çözücü Taraması…….. 116
4.6.1.2. Ekstraksiyon Süresi Taraması……. 124
4.6.1.3. Çözücü/Katı Oranı Taraması…….. 131
5. BULGULAR…….. 135
5.1. Antosiyanin Bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile Tayini İçin Bulunan Optimum Çalışma Sonuçları…….. 135
5.2. Meyve Örneklerine Uygulanan Ekstraksiyon Şartlarının Değerlendirilmesi….. 136
5.3. Kiraz *(Prunus avium* L.) Meyvesinde Bulunan Antosiyanin Bileşiklerinin Konsantrasyonları…….. 142
5.4. Çilek *(Fragari vesca* L.*)* Meyvesinde Bulunan Antosiyanin Bileşiklerinin Konsantrasyonları…….. 162
5.5. Kızılcık *(Cornus mas* L.*)* Meyvesinde Bulunan Bileşiklerinin Konsantrasyonları…….. 177
6. SONUÇ VE TARTIŞMA…….. 199
7.ÖNERİLER…… 204
KAYNAKLAR…… 205
ÖZGEÇMİŞ…… 213

ÖZET

Polifenoller ve onların alt grubu olan flavonoidler, antioksidan ve antikanser özellikleri yönünden önemlidirler. Antosiyanin bileşikleri, sayıları 5.000' i geçen flavonoidlerden önemli bir grubu oluşturmaktadırlar. Bu alanda yapılan çalışmalarda, doğal meyvelerin içerdiği antosiyanin miktarları arasında farklılıklar bulunmaktadır.

Bu çalışmada, kiraz (*Prunus avium* L.), çilek (*Fragaria vesca* L.) ve kızılcık (*Cornus mas* L.) meyvelerinde antioksidan özelliği yüksek olan delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit gibi antosiyanin bileşiklerinin tayini ve karakterizasyon amaçlanmıştır. Bunun için, öncelikle hem ölçüm hem de örnek hazırlama aşamalarında şartlar optimize edildi. Bulunan sonuçlardan, akış hızının 0.5 mL/dk, fragmentasyon voltajının 110 V, enjeksiyon hacminin 5 µL ve kolon sıcaklığının 30 ºC olduğu değerler optimum olarak seçildi. Meyve örneklerinin ekstraksiyonu için üç farklı ekstraksiyon şartı uygulandı. Yapılan optimizasyon çalışmalarında, kiraz ve kızılcık için çözücü olarak % 0.1 HCl içeren asetonitril, ekstraksiyon süresi olarak 30 dk, çözücü/katı oranı olarak 2/1 (v/w) optimum şartlar olarak seçildi. Çilek için, çözücü olarak % 0.1 HCl içeren metanol, ekstraksiyon süresi olarak 30 dk, çözücü/katı oranı olarak 5/1 (v/w) optimum değer olarak bulundu. Sonuçların güvenilirliğinin tayini için standart ekleme metodu uygulandı. Elde edilen optimum şartlar kullanılarak bulunan sonuçlardan, kirazda siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu 3.5-9.0 ppm (mg/kg) aralığında, malvidin-3-*o*-glikozit <t.s.-2.8 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Çilekte siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu <t.s-5.0 ppm (mg/kg) aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit 26-64 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Kızılcıkta siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu 8.3-18 ppm (mg/kg) aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit 97-233 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Metodun tayin sınırı delfinidin-3-*o*-glikozit için 0.5 ppm ve diğer 3 bileşik için 0.1 ppm olarak gözlendi.

Anahtar Kelimeler: Antosiyanin, HPLC-MS, Ekstraksiyon, Metod Optimizasyonu, Kiraz, Çilek, Kızılcık.

SUMMARY

Determination and Characterization of Anthocyanin Compounds in Cherry (*Prunus avium*), Strawberry (*Fragaria vesca*) and Cranberry (*Cornus mas* L.) Fruits by HPLC-ESI-MS

Polyphenols and their subgroup, flavonoids, are important in term of antioxidants and anticancer properties. Antocyanin compounds constitute an important group of flavonoid compounds that their number are higher than 5.000. In the studies carried out in this area, there are differences in antocyanins concentrations of natural fruits.

In this study, determination and characterization of anthocyanin compounds such as delphinidin-3-*o*-glucoside, cyanidin-3-*o*-glucoside, pelargonidin-3-*o*-glucoside and malvidin-3-*o*-glucoside having high antioxidant property in cherry, strawberry and cranberry fruits were purposed. So, the condiditons in both measurement and sample preparation steps were optimised. From the obtained results, optimum parameters were choosen as 0.5 mL/dk for the flow rate, 110 V for fragmentor potential, 5 µL for injection volume and 30 ºC for column temperature. Three different extraction conditions were applied for extraction of fruit samples. From the optimization studies for extraction of the fruit samples, asetonitrile in 0.1% HCl as solvent, 30 min as optimum extraction time, the proportion 2/1 (v/w) as the rate of solvent/solid for both cherry and cranberry were determined. For strawberry, methanol in 0.1% HCl as solvent, 30 min as extraction time, the proportion 5/1 (v/w) as the rate of solvent/solid were found as optimum condiditons. To check the reliability of results, standard addition method was applied. From the obtained results by using optimum conditions, concentrations (as ppm, mg/kg) of cyanidin, malvidin, delphinidin and pelargonidin, 3-*o*-glucosides, in cherry were found to be in range of 3.5-9.0, <d.l.-2.8, <d.l. and <d.l., respectively. The concentrations (as ppm, mg/kg) of cyanidin, pelargonidin, delphinidin and malvidin, 3-*o*-glucosides, in strawberry were found to be in range of <dl-5.0, 26-64, <d.l. and <d.l., respectively. The concentrations (as ppm, mg/kg) of cyanidin, pelargonidin, delphinidin and malvidin, 3-*o*-glucosides, in cranberry were found to be in range of 8.3-18, 97-233, <d.l. and <d.l., respectively. Limits of quantitation were found to be 0.5 for delphinidin-3-*o*-glucoside and 0.1 ppm for other three compounds.

Key Words: Anthocyanin, HPLC-MS, Extraction, Method optimization, cherry, strawberry, cranberry.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı…….	4
Şekil 2.2. Flavonoidlerin genel yapısı……	5
Şekil 2.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması…….……....	6
Şekil 2.4. Flavonol ve flavonların genel yapısı……..	7
Şekil 2.5. Flavanonların genel yapısı…….	7
Şekil 2.6. Kateşinler ve lökoantosiyaninlerin genel ve kimyasal yapıları…….	8
Şekil 2.7. Proantosiyaninlerin genel ve kimyasal yapıları…….	9
Şekil 2.8. Antosiyanin bileşiğinin genel yapısı……..	10
Şekil 2.9. Doğada yaygın olarak bulunan antosiyanin bileşiklerinin kimyasal yapısı……....	11
Şekil 2.10. Antosiyanidin bileğinin genel yapısı……...	11
Şekil 2.11. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları……	15
Şekil 2.12. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu ……...	16
Şekil 2.13. Kiraz meyvesi……..	17
Şekil 2.14. Çilek meyvesi……..	17
Şekil 2.15. Kızılcık meyvesi……..	18
Şekil 3.1. Bir HPLC cihazı şeması……..……....	24
Şekil 3.2. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması…….……..	25
Şekil 3.3. HPLC için bir pistonlu pompa……...	26
Şekil 3.4. Elektron-impakt kaynağının yapısı……	31
Şekil 3.5. Dekanol'ün (a) sert bir kaynakla ve (b) yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları……	32
Şekil 3.6. Glutamik asidin, a. Elektron impakt, b. Alan iyonlaştırma, c. Alan desorpsiyon yöntemi ile elde edilen spektrumları……	34
Şekil 3.7. Dört kutuplu bir kütle ayırıcısı……..	38
Şekil 3.8. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu…….…….....	39
Şekil 3.9. HPLC/MS hareketli bant ara faz sistemi……...	41
Şekil 3.10. UV-Görünür bölge spektrometresinin genel şekli……..	43
Şekil 4.1. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar……..	60
Şekil 4.2. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar…….	61

Şekil 4.3. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar……. 62
Şekil 4.4. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar…… 63
Şekil 4.5. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar…….. 64
Şekil 4.6. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar…….. 65
Şekil 4.7. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.5-7.5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…….. 66
Şekil 4.8. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu…… 66
Şekil 4.9. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 67
Şekil 4.10. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 67
Şekil 4.11. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 68
Şekil 4.12. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 68
Şekil 4.13. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-7.5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…… 69
Şekil 4.14. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar……. 71
Şekil 4.15. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar……... 72
Şekil 4.16. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar…… 73
Şekil 4.17. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar…… 74
Şekil 4.18. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar……... 75
Şekil 4.19. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar…… 76
Şekil 4.20. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar…… 77
Şekil 4.21. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……... 78
Şekil 4.22. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 7.5-50 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……. 78
Şekil 4.23. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 79
Şekil 4.24. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…… 79
Şekil 4.25. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 80
Şekil 4.26. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 80

Şekil 4.27. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 81
Şekil 4.28. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu……... 81
Şekil 4.29. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (25 ppm için) ait kütle spektrumu……... 82
Şekil 4.30. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (50 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 82
Şekil 4.31. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…….. 83
Şekil 4.32. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 7.5-50 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……. 83
Şekil 4.33. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar…….. 85
Şekil 4.34. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar…..... 86
Şekil 4.35. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar……... 87
Şekil 4.36. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar…… 88
Şekil 4.37. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar…… 89
Şekil 4.38. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar…… 90
Şekil 4.39. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar…… 91
Şekil 4.40. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ve 200 ppm için) ait kromatogramlar…….. 92
Şekil 4.41. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…….. 93
Şekil 4.42. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 7.5-200 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…….. 93
Şekil 4.43. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 94
Şekil 4.44. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……. 94
Şekil 4.45. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 95
Şekil 4.46. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 95
Şekil 4.47. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 96
Şekil 4.48. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 96
Şekil 4.49. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (25 ppm için) ait kütle spektrumu…… 97
Şekil 4.50. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (50 ppm için) ait kütle spektrumu…… 97

Şekil 4.51. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 98
Şekil 4.52. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (200 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 98
Şekil 4.53. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……... 99
Şekil 4.54. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 7.5-200 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği…….. 99
Şekil 4.55. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar……. 101
Şekil 4.56. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar…..... 102
Şekil 4.57. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar……... 103
Şekil 4.58. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar……..... 104
Şekil 4.59. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar…… 105
Şekil 4.60. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar…… 106
Şekil 4.61. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……... 107
Şekil 4.62. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 107
Şekil 4.63. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……..... 108
Şekil 4.64. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 108
Şekil 4.65. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……..... 109
Şekil 4.66. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği……... 109
Şekil 4.67. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar……. 111
Şekil 4.68. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar……. 112
Şekil 4.69. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar……. 113
Şekil 4.70. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ve 200 ppm için) ait kromatogramlar…….. 114
Şekil 4.71. Toplam antosiyanin tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği…… 115
Şekil 4.72. Çözücü optimizasyonu işleminin basamakları……..... 117

Şekil 4.73. Kiraz meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları……. 118
Şekil 4.74. Çözücü taraması sonucu kiraz meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…….. 119
Şekil 4.75. Çilek meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları……. 120
Şekil 4.76. Çözücü taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu……..…….. 121
Şekil 4.77. Çözücü taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…….. 121
Şekil 4.78. Kızılcık meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları……. 122
Şekil 4.79. Çözücü taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…….. 123
Şekil 4.80. Çözücü taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu……... 123
Şekil 4.81. Ekstraksiyon süresi optimizasyonu işleminin basamakları……..... 124
Şekil 4.82. Kiraz meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…….. 125
Şekil 4.83. Ekstraksiyon taraması sonucu kiraz meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu……... 126
Şekil 4.84. Çilek meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…….. 127
Şekil 4.85. Ekstraksiyon taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu……... 128
Şekil 4.86. Ekstraksiyon taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…….. 128
Şekil 4.87. Kızılcık meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları……. 129
Şekil 4.88. Ekstraksiyon taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…….. 130
Şekil 4.89. Ekstraksiyon taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu…… 130
Şekil 4.90. Çözücü/katı oranı optimizasyonu işleminin basamakları…… 131
Şekil 4.91. Kiraz meyvesine ilişkin çözücü/katı oranı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…….. 132
Şekil 4.92. Çilek meyvesine ilişkin çözücü/katı oranı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…….. 133

Şekil 4.93. Kızılcık meyvesine ilişkin çözücü miktarı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…….. 134
Şekil 5.1. Kiraz meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları……. 139
Şekil 5.2. Çilek meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları…… 140
Şekil 5.3. Kızılcık meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları…… 141
Şekil 5.4. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde kalibrasyon çözeltilerine (0.1,2.5, 5, 7.5 ve 10 ppm için) ait kromatogramlar…….. 143
Şekil 5.5. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde kalibrasyon çözeltilerine (0.1,2.5, 5, 7.5 ve 10 ppm için) ait kromatogramlar…….. 144
Şekil 5.6. Kiraz meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 145
Şekil 5.7. Kiraz meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 146
Şekil 5.8. Kiraz meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 147
Şekil 5.9. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları……. 148
Şekil 5.10. Kiraz meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri…..... 149
Şekil 5.11. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……. 149
Şekil 5.12. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 150
Şekil 5.13. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 150
Şekil 5.14. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu……... 151
Şekil 5.15. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……. 151
Şekil 5.16. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 152
Şekil 5.17. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 152
Şekil 5.18. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 153
Şekil 5.19. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……. 153
Şekil 5.20. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 154
Şekil 5.21. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 154
Şekil 5.22. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 155
Şekil 5.23. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu……... 155

Şekil 5.24. Kiraz meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu……..... 156
Şekil 5.25. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 156
Şekil 5.26. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 157
Şekil 5.27. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……..... 157
Şekil 5.28. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu…… 158
Şekil 5.29. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 158
Şekil 5.30. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu……..... 159
Şekil 5.31. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 159
Şekil 5.32. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 160
Şekil 5.33. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu…… 160
Şekil 5.34. Kiraz meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 161
Şekil 5.35. Kiraz meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 161
Şekil 5.36. Çilek meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 164
Şekil 5.37. Çilek meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 165
Şekil 5.38. Çilek meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 166
Şekil 5.39. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…… 167
Şekil 5.40. Çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri… 168
Şekil 5.41. Çilek meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri… 168
Şekil 5.42. Çilek meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu…… 169
Şekil 5.43. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu……. 169
Şekil 5.44. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 170
Şekil 5.45. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 170
Şekil 5.46. Çilek meyvesi için elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu……..... 171
Şekil 5.47. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…… 171

Şekil 5.48. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu…… 172
Şekil 5.49. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…… 172
Şekil 5.50. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……. 173
Şekil 5.51. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 173
Şekil 5.52. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 174
Şekil 5.53. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 174
Şekil 5.54. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 175
Şekil 5.55. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu…… 175
Şekil 5.56. Çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 176
Şekil 5.57. Çilek meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 176
Şekil 5.58. Çilek meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 177
Şekil 5.59 Kızılcık meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 179
Şekil 5.60. Kiraz meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 180
Şekil 5.61. Kızılcık meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)…… 181
Şekil 5.62. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları…… 182
Şekil 5.63. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri.. 183
Şekil 5.64. Kızılcık meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri... 183
Şekil 5.65. Kızılcık meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu……..... 184
Şekil 5.66. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)…… 184
Şekil 5.67. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)..... 185
Şekil 5.68. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)…… 185
Şekil 5.69. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)……. 186
Şekil 5.70. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)…. 186
Şekil 5.71. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)…. 187

Şekil 5.72. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)….. 187
Şekil 5.73. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)..... 188
Şekil 5.74. Kızılcık meyvesi için elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu…….. 188
Şekil 5.75. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)... 189
Şekil 5.76. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)... 189
Şekil 5.77. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik) 190
Şekil 5.78. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik) 190
Şekil 5.79. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)... 191
Şekil 5.80. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik).. 191
Şekil 5.81. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik) 192
Şekil 5.82. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik) 192
Şekil 5.83. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 193
Şekil 5.84. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 193
Şekil 5.85. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu…….. 194
Şekil 5.86. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu……... 194
Şekil 5.87. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu…… 195
Şekil 5.88. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 195
Şekil 5.89. Kızılcık meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri…… 196
Şekil 5.90. Kızılcık meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri……..... 196

TABLOLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları…….	4
Tablo 2.2. Flavonol ve flavonların kimyasal yapıları…….	7
Tablo 2.3. Flavanonların kimyasal yapıları……	7
Tablo 2.4. Antosiyanidin bileşiklerinin kimyasal yapıları……..	12
Tablo 3.1. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması…….	23
Tablo 3.2. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları…….	30
Tablo 3.3. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar…….	33
Tablo 3.4. Bazı HPLC/MS Ara Faz Sistemlerinin Karakteristikleri……	42
Tablo 3.5. Bazı meyve ve sebzeler için literatürde bulunan antosiyanin bileşiklerinin konsantrasyonları (ppm)……	54
Tablo 4.1. HPLC ile gradient çalışma şartları …….....	58
Tablo 4.2. MS parametreleri için uygulanan şartlar ……	58
Tablo 5.1. Antosiyanin bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile elde edilen optimum çalışma koşulları…….	136
Tablo 5.2. Çalışılan meyvelerde bulunan antosiyanin bileşiklerinin konsantrasyonları (ppm±s) (n=3)…….....	197
Tablo 5.3. Çalışılan meyvelerde bulunan toplam antosiyanin konsantrasyonları (ppm±s) (n=3)……...	198

KISALTMALAR

APCI : Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonlaştırma Sistemi
Cyd-3-*o*-glu : Siyanidin-3-*o*-glikozit
d.l. : Tayin Sınırı
Dlp-3-*o*-glu : Delfinidin-3-*o*-glikozit
ESI : Elektrosprey İyonlaştırma
FAB : Sürekli Akış Hızlı Atom Bombardımanı Sistemi
GC-MS : Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
HPLC-ESI-MS : Yüksek Performaslı Sıvı Kromatografisi-Elektrosprey İyonlaştırma-Kütle Spekrometresi
LC-MS : Sıvı Kromatofrafisi-Kütle Spektrometresi
LC-TOF-MS : Sıvı Kromatofrafisi-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi
LOD : Gözlenebilme Sınırı
LOQ : Tayin Sınırı
µg : Mikrogram
mg : Miligram
mL : Mililitre
Mlv-3-*o*-glu : Malvidin-3-*o*-glikozit
MS : Kütle Spektrometresi
ng : Nanogram
Plg-3-*o*-glu : Pelargonidin-3-*o*-glikozit
ppm : mg/kg, mg/L, µg/mL, µg/g
SCAN : Tam İyon Taraması
SIM : Seçilmiş İyon Taraması
t.s. : Tayin Sınırı
TLC : İnce Tabaka Kromatografisi
UV-VIS : Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkileri bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanmış fenolik bileşikler eklenmektedir [1]. Fenolik bileşikler, bir ya da daha fazla hidroksil grubunun aromatik halkaya bağlı olduğu yapılardır. Fenolik bileşikler, fenol gibi oldukça basit bileşiklerden proantosiyanidinler gibi yüksek derecede polimerleşmiş yapılara kadar çok geniş bir aralığı kapsar. Fenolik bileşiklerin bir kısmı meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında, özellikle de ağızda acılık ve burukluk gibi iki önemli tat unsurunun oluşmasında etkilidirler. Bir kısmı ise meyve ve sebzelerin sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi tonlardaki renklerinin oluşmasını sağlamaktadır. Meyveler, özellikle içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif ve antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmektedir. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler; hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler gibi alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoidler ise, antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler ve lökoantosiyanidinler (flavanol-3-ol) ve proantosiyanidinler olmak üzere değişik sınıflara ayrılırlar.

Antosiyanidinler, doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlerle glikozit bileşikleri şeklinde bulunurlar ve antosiyanin adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki çeşitli renklerini veren suda çözünebilir nitelikteki renk pigmentleridir. Antosiyaninler, bağlandıkları şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar. Şeker farklı yerden birleşebilir ve bitkide birçok farklı türde şeker bulunabilir. Antosiyaninlerin renkleri, yapıya bağlı olmakla birlikte meyve ve sebzelerin asitlik durumuyla da ilişkilidir. Çoğu antosiyanin asidik koşullarda kırmızıdır, asitlik azaldıkça maviye dönerler. Kimyasal olarak şekersiz antosiyanidin, aglikon ve antosiyanin glikozit şeklinde bölünürler. Antosiyaninler başta kanser olmak üzere özellikle göz hastalıkları (miyopluk, katarakt, göz tansiyonu) ilerlemesini yavaşlatıcı, kabızlık, bulantı, mide kramp ve ülserlerini önleyici, kan akımını düzenleyici, kalp krizi riskini azaltıcı ve antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, doğal ürünlerdeki fenolik bileşiklerin tayini ve karakterizasyonu için duyarlı ve güvenilir sonuçların elde edildiği metodlara ihtiyaç vardır. Bu amaçla, genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi

(HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve elektroforez teknikleri kullanılmaktadır [1-6]. Bitki ve meyvelerdeki antosiyanin bileşiklerinin moleküler düzeyde tayinleri için, kromatografik ayırma teknikleriyle spektrometrik metodların birleştirilmesiyle oluşan HPLC-MS cihazına son yıllarda büyük rağbet vardır [1]. Ancak gerek ekstraksiyon şartlarının farklı olmasından gerekse farklı yöntemlerdeki ve şartlardaki girişimlerin farklı oranda olması nedeniyle literatürde verilen sonuçlar aynı meyve türü için bile farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle bu bileşiklerin doğru ve güvenilir tayinine büyük gereksinim vardır. HPLC-MS, uçucu olmayan fenolik bileşiklerin yapısal analizleri için kullanılan hızlı ve güvenilir bir metottur. Özellikle büyük, kararsız ve oldukça polar olan bileşiklerin tayinlerinde HPLC-ESI-MS tercih edilmektedir [1].

Bu çalışmada, kiraz *(Prunus avium* L.*)*, çilek (*Fragaria vesca* L.) ve kızılcık *(Cornus mas* L.*)* meyvelerinin yenen kısımlarında bulunan ve diğerlerine göre daha fazla antioksidan özelliklere sahip olan antosiyanin bileşiklerinden delfinidin, siyanidin, pelargonidin ve malvidin' in 3-*o*-glikozit türlerinin tayini ve karakterizasyonu yapıldı. Bu amaçla HPLC-ESI-MS cihazı kullanıldı, bu yöntem ile meyvelerde bulunan bileşiklerin konsantrasyon ları ve MS spektrumları kullanılarak karakterizasyonu yapıldı. HPLC-ESI-MS cihazı ile analizde her bileşik için akış hızı, fragmentasyon (parçalayıcı) voltajı, enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı gibi parametreler optimize edildi. Ayrıca, örneklerin ekstraksiyon basamağında üç farklı ekstraksiyon şartı uygulandı. Her bir meyve için çözücü taraması, ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı gibi parametreler optimize edildi. Kiraz ve kızılcık meyveleri için elde edilen ekstraksiyon şartları; çözücü olarak asitlendirilmiş asetonitril, ekstraksiyon süresi 30 dk, çözücü/katı oranı 2/1 (v/w) olarak belirlendi. Çilek meyvesi için elde edilen ekstraksiyon şartları; çözücü olarak asitlendirilmiş metanol, ekstraksiyon süresi 30 dk, çözücü/katı oranı 5/1 (v/w) olarak belirlendi. Her ekstraksiyon çözeltisi HPLC-ESI-MS ile optimize edilen şartlar kullanılarak analiz edildi. Ayrıca meyve örnekleri için belirlenen ekstraksiyon şartları kullanılarak standart ekleme metodu uygulandı. Elde edilen optimum şartlar kullanırak bulunan sonuçlar hem kromatogram alanlarından hem de MS spektrum bollukları kullanılarak bulunan konsantrasyon değerleridir.

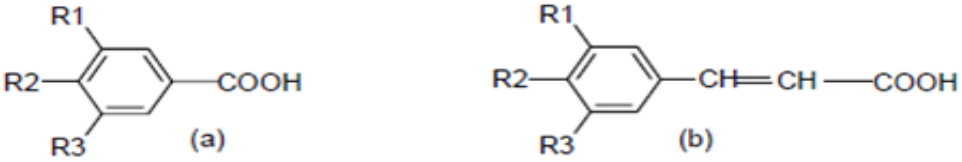
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bir ya da daha fazla hidroksil grubunun aromatik halkaya bağlı olduğu yapılardır. Bitkilerde binlerce fenolik bileşik yapısı tanımlanmıştır. Bunlara devamlı olarak bulunan yeni tanımlanan fenolikler eklenmektedir [1]. Fenolik bileşikler fenol gibi oldukça basit bileşiklerden proantosiyanidinler gibi yüksek derecede polimerleşmiş yapılara kadar çok geniş bir aralığı kapsar. Fenolik bileşiklerin glikozil içeren yapılarını temel olarak tek glikozilli yapılar oluşturur [2, 3]. Glikolizasyonda en yaygın olan şeker yapısı glikoz iken arabinoz, galaktoz, ramnoz ve ksiloz da çoğunlukla kullanılır [4, 5]. Fenolik bileşikler ayrıca alifatik organik asitlerle, aminlerle, lipidlerle, olisakkaritlerle ve diğer sübstitüentlerle de bağlanabilir [4]. Ayrıca, fenolik bileşiklerin aromatik halka/halkaları hidroksilasyon ve metoksilasyon içerir. Kompleks yapının çeşitliliği, konjugasyonu, hidroksillenmesi ve metoksillenmesi çok geniş aralıkta fenolik moleküllerin oluşumunu sağlar [6]. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde iki gruba ayrılırlar.

2.1.1. Fenolik Asitler

Hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olarak iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C_6-C_1 fenilmetan yapısında olup, bitkisel gıdalarda genelde iz miktarda bulunurlar. Bunlar salisilik asit, *m*-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asitler gibi fenolik asitlerdir. Hidroksisinamik asitler ise C_6-C_3 fenilpropan yapısındadırlar. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Çok yaygın olarak bulunan hidroksisinamik asitler; kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit ve *o*-kumarik asitlerdir. Bitkilerde büyük bir kısmı organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunan, fenolik asitlerin genel ve kimyasal yapıları Şekil 2.1 ve Tablo 2.1' de görülmektedir [7, 8].



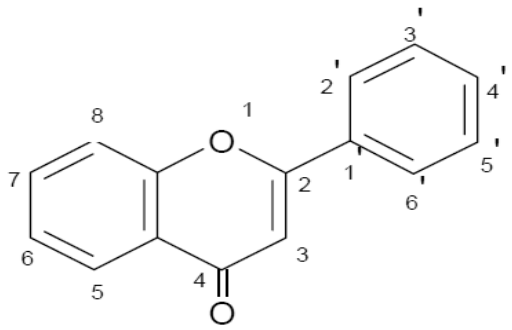
Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı: a) Benzoik asit türevleri b) Sinamik asit türevleri [3].

Tablo 2.1. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları

Asit	R1	R2	R3	Asit	R1	R2	R3
p-Hidroksibenzoik	H	OH	H	*p*-Kumarik	H	OH	H
Pirokate şuik	H	OH	OH	Kafeik	H	OH	OH
Vanilik	CH_3O	OH	H	Ferulik	CH_3O	OH	H
Siringik	CH_3O	OH	CH_3O	Sinapik	CH_3O	OH	CH_3O
Gallik	OH	OH	OH				

2.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan **(**C_6-C_3-C_6) yapısındadırlar. Flavonoidler gıdalarda en yaygın bulunan polifenollerdir. Yaklaşık 5000 farklı flavonoid bilinmektedir [1]. Flavan türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 2.2' de görülmektedir. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenirler [1]. Hidroksil gruplarının her biri çeşitli fenolik ve alifatik asitlerle açillenebilir ve bazı karbonlar bir ya da daha fazla farklı basit karbonhidratla yer değiştirebilir. Bitkilerde, flavonoidler hidroksilleme, metilleme ve en önemlisi glikolizleme gibi çeşitli yapılar da bulunabilirler [1]. Ayrıca flavonoid yapısındaki sübstitüentler benzil, sinamil, hidroksil, izofenil ve metoksil içerebilirler [6]. Flavonoidler bitkilerde en fazla glikozit türevleri olarak bulunmalarına rağmen aglikonlar olarak da bulunurlar.



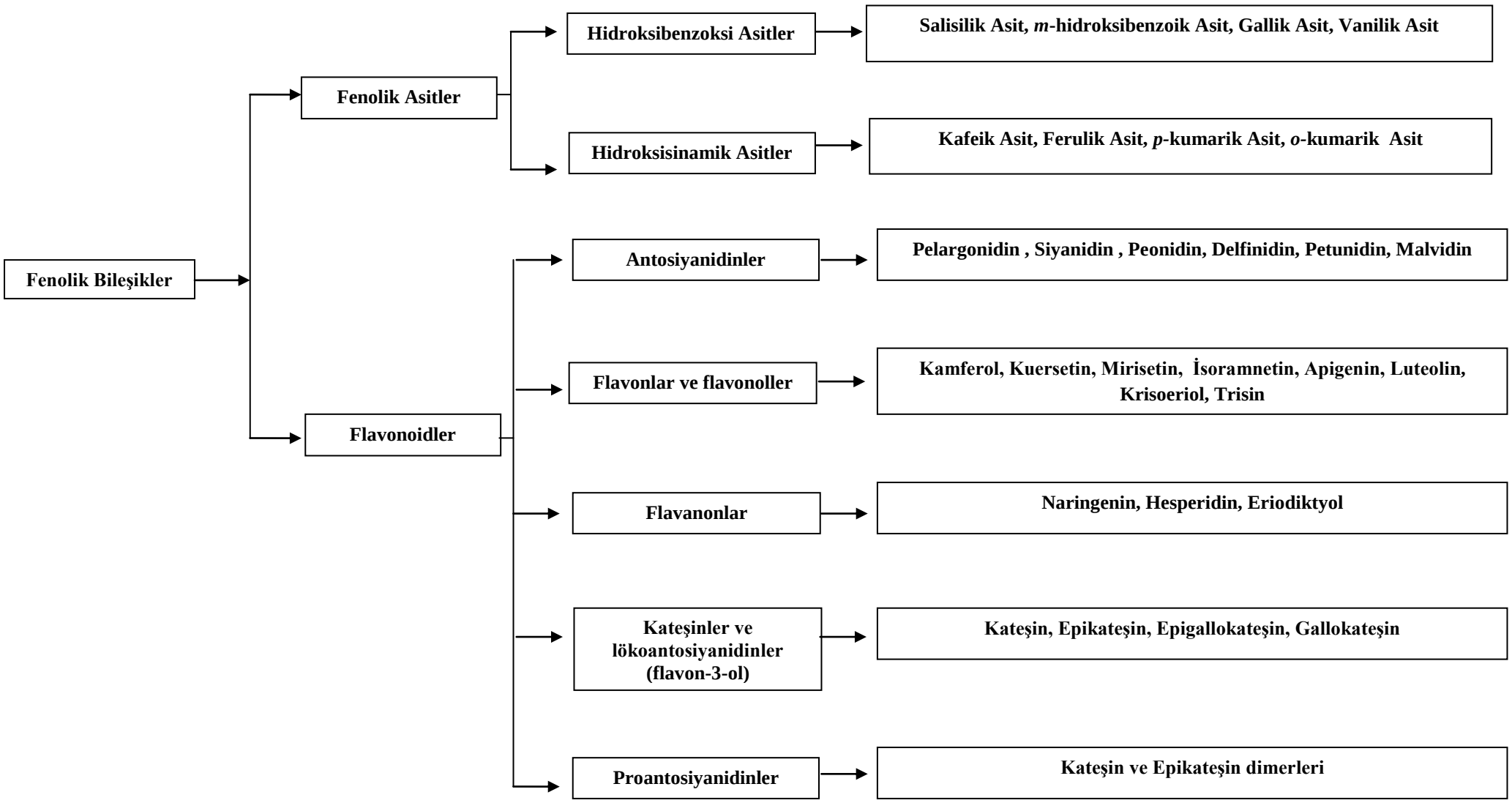
Şekil 2.2. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler yapısal olarak; antosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler ve lökoantosiyanidinler (flavon-3-ol) ve proantosiyanidinler olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar. Şekil 2.3' te fenolik bileşiklere ait genel bir şema görülmektedir.

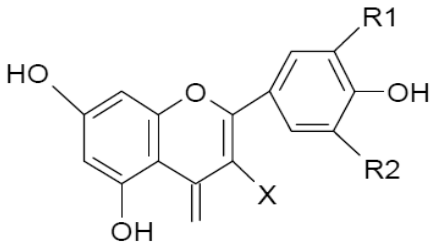
Flavonoller, meyvelerde en fazla bulunan flavonoidlerdir. Meyvelerde en yaygın bulunan flavonoller kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetindir. Flavonoller biosentezleri ışıkla uyarıldığı için, eser miktarda, bitkinin toprak yüzeyine yakın kısmında bulunurken genel olarak meyvelerin dışında, kabuk ve yaprakları gibi hava ile temas eden bölgelerinde birikirler [2].

Flavonlar, meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunmazlar. Flavonlar temel olarak luteolin ve apigenin glikozitlerden oluşur. Maydanoz ve kerevizin önemli flavon kaynağı olduğu belirlenmiştir [2]. Turunçgil meyvelerinin kabukları oldukça fazla miktarda polimetoksilat flavonları: tangeretin, nobiletin ve sinensetin içerir.

Flavonol ve flavonların genel ve kimyasal yapıları Şekil 2.4 ve Tablo 2.2' de görüldüğü gibi orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlanmıştır.



Şekil 2.3. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

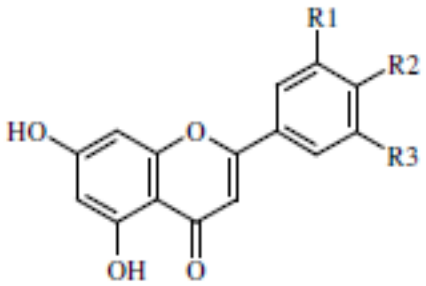


Şekil 2.4. Flavonol ve flavonların genel yapısı

Tablo 2.2. Flavonol ve flavonların kimyasal yapıları

Flavonollar (X=OH)	**R1**	**R2**	**Flavonlar (X=H)**	**R1**	**R2**
Kuersetin	OH	H	Apigenin	H	H
Mirisetin	OH	OH	Trisin	OCH_3	OCH_3
Kamferol	H	H	Luteolin	OH	H
İsoramnetin	OCH_3	H	Krisoeriol	OCH_3	H

Flavanonlar, bitkilerde diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında daha az miktarda bulunurlar. Flavanonlar hidroksilli glikozitler ve *o*-metilli türevleri olarak bulunurlar [9, 10, 11]. Bu glikozitler özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunur. En önemlileri naringenin, hesperidin ve eriodiktyoldur [1]. Flavanonlar, flavonlardan farklı olarak Şekil 2.5' te görüldüğü gibi ortadaki halkada çift bağ bulunmaz. Flavanonların genel ve kimyasal yapıları Şekil 2.5 ve Tablo 2.3' te görülmektedir.

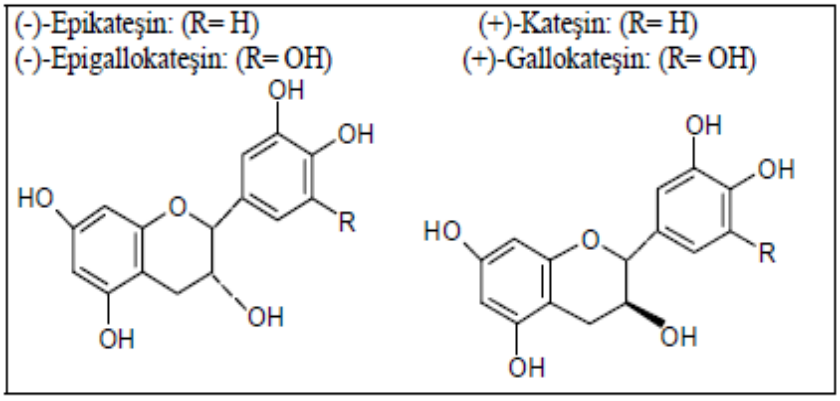


Şekil 2.5. Flavanonların genel yapısı

Tablo 2.3. Flavanonların kimyasal yapıları

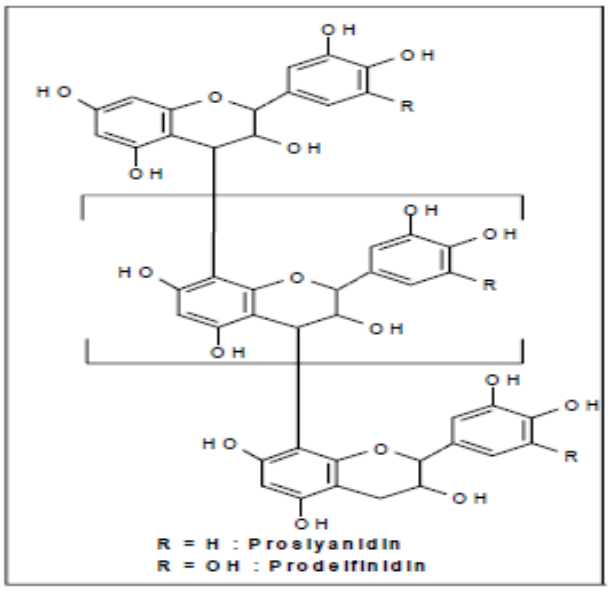
Flavanon	**R1**	**R2**	**R3**
Naringenin	H	OH	H
Hesperetin	OH	OCH3	H
Eriodiktyol	OH	OH	H

Kateşinler ve lökoantosiyanidinler, üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içerirler. Kimyasal yapıları, flavon-3-ol' dür. Şekil 2.6' da en yaygın bulunan kateşinlerin kimyasal yapıları görülmektedir [3]. Kateşinler gıdalarda yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak hava oksijeni ile kolaylıkla kondanse olarak proantosiyanidinleri oluştururlar [2]. Yeşil çay en zengin kateşin kaynağı olarak bilinir. Gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşin galatlar bazı baklagillerde, üzümlerde ve daha önemlisi çayda bulunuyorken kateşinler ve epikateşinler meyvelerin temel flavanolleridir [12, 13]. Kateşinler doğal polifenoloksidaz substratları olmaları olması sebebiyle önemlidir [2].



Şekil 2.6. Kateşinler ve lökoantosiyaninlerin genel ve kimyasal yapıları

Proantosiyanidinler, kateşinlerden veya lökoantosiyanidinlerden oluşan polimerik yapılara proantosiyanidinler denir. Şekil 2.7' de görüldüğü gibi sadece epikateşin/ kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin/gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin denir [3]. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyanidinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan dimerlerdir [3]. Yoğunlaşmış taninler, meyve (üzüm, şeftali, elma, armut ve üzümsü meyveler), meşrubat (şarap, elma şarabı, çay, bira) ve acı çikolatadaki acılık veren tattan sorumlu olduğu bilinmektedir [2].

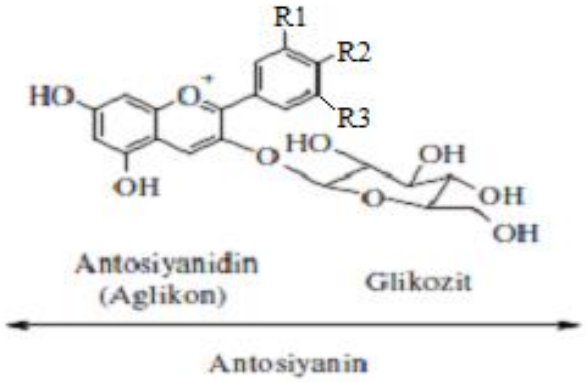


Şekil 2.7. Proantosiyaninlerin genel ve kimyasal yapıları

2.1.2.1. Antosiyaninler

Antosiyaninlerin temel yapıları antosiyanidinlerdir. Antosiyaninler, doğada serbest halde bulunmazlar, şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar, Şekil 2.8' de antosiyanin bileşiğinin genel yapısı görülmektedir. Flavonoidler arasında bulunan antosiyaninler suda çözünebilen doğal renk maddeleri olup, sebzeler, meyveler, meyve suları ve şarapların pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerini veren pigmentlerdir [1, 14, 15, 16]. Antosiyanin moleküllerinin sağladığı renkler ilk kez 1939 yılında Pauling tarafından açıklanmıştır. Pauling antosiyaninlerin renk şiddetine rezonans yapıdaki flavilyum iyonunun sebep olduğunu ileri sürmüştür [17]. Doğada bulunan farklı antosiyanidinlere farklı şekerlerin bağlanması ile çok farklı renkte antosiyaninler oluşabilmektedir. Birçok meyve ve sebze ile bitki ve çiçeklerin çok zengin renklerde olmasının nedeni de budur. Doğadaki çok sayıda antosiyanidin bileşiklerinden gıdalar açısından pelargonidin, peonidin, petunidin, delfinidin, siyanidin ve malvidin önem taşımaktadır [1, 18, 19]. Pelargonidin turuncu, siyanidin turuncu-kırmızı, delfinidin mavi, peonidin kırmızı, petunidin mavimsi kırmızı ve malvidin ise kırmızımsı mavi renkleri oluşturur. Glikolizasyon antosiyaninlere kararlılık sağlar [20, 21]. En yaygın olan glikozil gruplar monosakkaritlerdir özellikle de glikoz, galaktoz, ramnoz ve arabinozdur. Açilleme için ise en yaygın olan açil grupları antosiyaninlere bağlı bulunan hidroksisinamik asitler (özellikle kafeik, ferulik ve *p*-

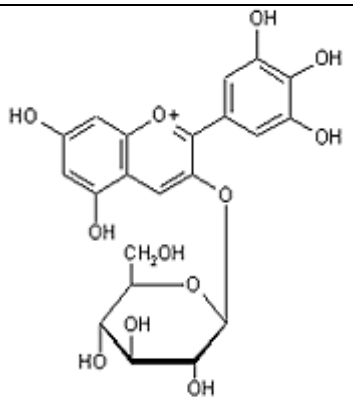
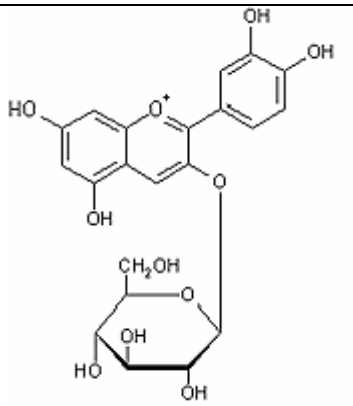
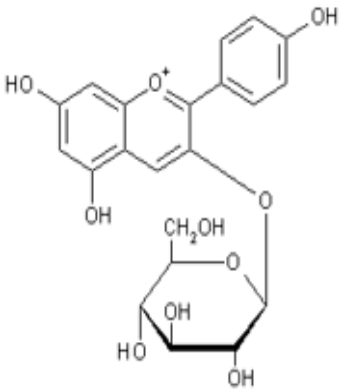
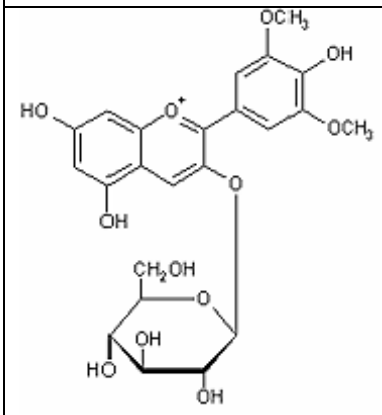
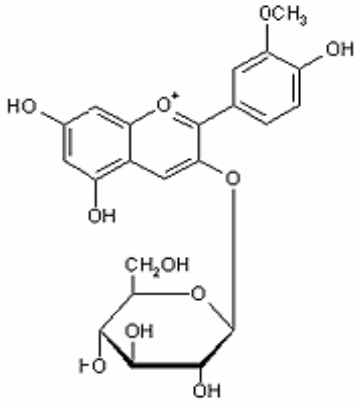
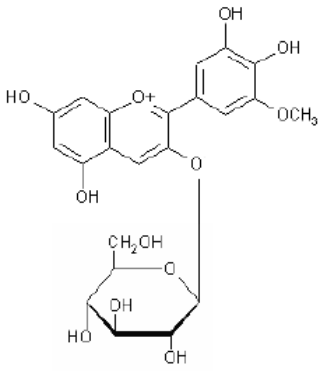
kumarik asitler), alifatik dihidrokarboksilat ve malonik asittir [22]. Açilleme suda çözülebilirliği arttırır ve enzim katalizli glikozidaz bozunmalarına karşı koruma sağlayabilir [21].



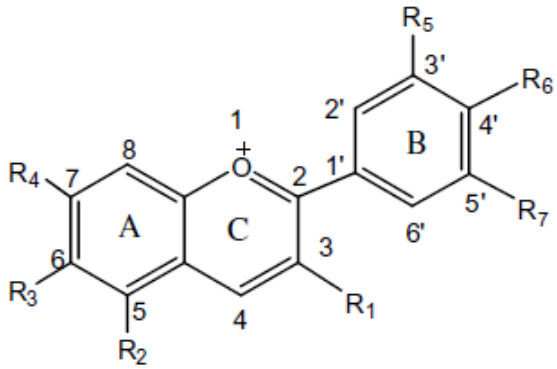
Sekil 2.8. Antosiyanin bileşiğinin genel yapısı

Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunduğu bilinen altı antosiyanin bileşiğinin kimyasal yapıları Şekil 2.9' da verilmiştir. Antosiyaninler bağlanan şekerlere ve bağlanma pozisyonuna göre adlandırılırlar.

Doğada bulunan diğer antosiyanidin bileşiklerinin genel ve kimyasal yapıları Şekil 2.10 ve Tablo 2.4' te verilmiştir.

 **Delfinidin-3-*o*-glikozit**	 **Siyanidin-3-*o*-glikozit**	 **Pelargonidin-3-*o*-glikozit**
 **Malvidin-3-*o*-glikozit**	 **Peonidin-3-*o*-glikozit**	 **Petunidin-3-*o*-glikozit**

Şekil 2.9. Doğada yaygın olarak bulunan antosiyanin bileşiklerinin kimyasal yapısı



Şekil 2.10. Antosiyanidin bileşiğinin genel yapısı [16].

Tablo 2.4. Antosiyanidin bileşiklerinin kimyasal yapıları [16].

Antosiyanidin	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	**R7**
Apigeninidin	H	OH	H	H	OH	H	OH
Aurantinidin	H	OH	H	OH	OH	OH	OH
Capensinidin	OCH_3	OH	OCH_3	OH	OCH_3	H	OH
Siyanidin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH
Delfinidin	OH	OH	OH	OH	OH	H	OH
Europinidin	OCH_3	OH	OH	OH	OCH_3	H	OH
Hirsutidin	OCH_3	OH	OCH_3	OH	OH	H	OCH_3
Luteolinidin	OH	OH	H	H	OH	H	OH
Pelargonidin	H	OH	H	OH	OH	H	OH
Malvidin	OCH_3	OH	OCH_3	OH	OH	H	OH
Peonidin	OCH_3	OH	H	OH	OH	H	OH
Petunidin	OH	OH	OCH_3	OH	OH	H	OH
Pulchellidin	OH	OH	OH	OH	OCH_3	H	OH
Rosinidin	OCH_3	OH	H	OH	OH	H	OCH_3
Triacetidin	OH	OH	OH	H	OH	H	OH

Antosiyaninlerin kararlılığı pH, ortam sıcaklığı, kimyasal yapı, miktar, ışık, oksijen, çözücüler ve enzimlerin, flavonoidlerin, proteinlerin ve metalik iyonların bulunması gibi faktörlerden etkilenir [23]. Farklı çözeltiler (asetonitril:su, etanol, metanol, propilenglikol, dioksan ve 2-bütanon) içindeki sentetik flavilyum tuzlarının hem konsantrasyonlarına hem de çözücüye bağlı olarak renk değiştirdiği belirtilmektedir [24]. Antosiyanin pigmentlerinin flavilyum çekirdeğinde bir elektron eksik olduğundan çok reaktifdir. Reaksiyonlar genellikle pigment renginin açılması şeklindedir. Antosiyaninler çözeltinin pH değerine bağlı olarak farklı kimyasal yapılarda bulunabilir [25, 26]. pH 1' de flavilyum katyonu (kırmızı renkli) baskın olan türlerdir, kırmızı ve mor renklere katkıda bulunur. pH değeri 2 ile 4 arasında olduğunda kuinoidal mavi türler baskındır. pH 5 ile 6 arasında olduğunda renksiz iki tür sırasıyla karbinol pseudobaz ve kalkon incelenebilir. pH değeri 7' den fazla olduğunda antosiyaninler sübstitüent gruplarına bağlı olarak bozunurlar (Şekil 2.11). pH değeri 4 ile 6 arasında olduğunda antosiyaninin dört yapısı; flavilyum katyonu, susuz kuinodial baz, renksiz karbinol baz ve açık sarı renkli kalkon aynı anda bulunurlar. Kuinodial bazlar ve karbinol arasındaki denge flavilyum katyonu aracılığıyla meydana gelir (Şekil 2.11 D, A ve E yapıları). pH arttırıldığında, susuz bazın miktarı arttığında ve daha asidik koşullarda baskın türler kırmızı flavilyum iyonudur [27]. Nötr ortamda aglikon kararlılığı düşer. Aglikonların tersine, monoglikozitler ve çoğunlukla diglikozitlerin

türevleri nötr pH ortamında daha kararlıdır. Bu davranış, şeker moleküllerinin kararsız ara ürünler olan fenolik asit ve aldehit bileşiklerine bozunmasıyla açıklanır [26] (Şekil 2.12).

Çok fazla sayıda ve çeşitte doğada antosiyanin vardır. Antosiyaninler arasındaki temel farklar; hidroksillenmiş grupların sayısı, yapıya bağlı olan şekerlerin sayısı, moleküldeki şeker bağlanan aromatik ve alifatik karboksilatlar ve bu bağların pozisyonudur [28]. Antosiyaninlerde hidroksilasyon arttıkça renk maviye döner. Moleküldeki OH sayısına göre mavimsi rengin sırasıyla pelargonidin, siyanidin ve delfıdin antosiyanidinlerinde artısı söz konusudur. Buna karşılık glikozillenme ve metillenme ise rengin kırmızıya dönmesine neden olmaktadır. Buna örnek olarak kırmızı rengin siyanidinden peonidine dogru artmasını verebiliriz. Bitkilerde en yaygın bilinen antosiyanidinler ise pelargonidin, peonidin, siyanidin, malvidin, petunidin ve delfinidindir [29]. Antosiyanidinin metillenmemiş üç glikozit türevi (siyanidin, delfinidin ve pelargonidin) yaprakların pigmentinde % 80, meyvelerde % 69 ve çiçeklerde % 50 bulunma değerleriyle doğadaki en yaygın antosiyanidinlerdir [30]. Daha yaygın olan altı antosiyanidinin meyvelerde ve bitkilerdeki dağılımının % 50 siyanidin, % 12 delfinidin, % 12 pelargonidin, % 12 peonidin, % 7 petunidin ve % 7 malvidin olduğu belirtilmiştir [28]. Doğada 3-monositler, 3-biositler, 3,5 ve 3,7-diglikozitler olan glikozit türevleri daha yaygındır ancak en yaygın olan antosiyanin bileşiği "siyanidin-3-glikozit" olduğu belirtilmektedir [28]. Ahududu meyvesi, siyanidin ve pelargonidin gibi iki karakteristik aglikon, yabanmersini meyvesi ise önemli miktarda delfinidin, siyanidin, petunidin, peonidin ve malvidin olmak üzere beş aglikon içermektedir. Antosiyanidin glikozitleri meyveler için karakteristiktir. Meyveler çoğunlukla siyanidin, delfinidin, peonidin, pelargonidin ve petunidin 3-monoglikozitleri, siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-arabinosit içermektedir. Kırmızı ahududularda siyanidin-3-sophorosit, siyanidin-3-glikorutinosit, siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinosit, pelargonidin-3-sophorosit ve pelargonidin-3-glikozilrutinosit tayin edilmiştir [31, 32].

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. Vişne gibi meyvelerde hem meyve etinde, hem de meyve kabuğunda bulunduğu halde, siyah üzüm ve bazı erik çeşitlerinde yalnızca meyve kabuğunda bulunurlar. Siyah üzümlerin meyve suyuna işlenmesinde mayşenin ısıtılması yoluyla kabuktaki renk maddeleri erir hale getirilerek,

üzüm suyuna geçirilebilmektedir. Aksi halde siyah üzümlerden sadece pembe renkli bir üzüm suyu elde edilebilir. Şarap işlemede fermantasyonla oluşan alkolle, kabuktaki antosiyaninler eriyerek şaraba geçmektedir. Genellikle meyve ve sebzelerde birkaç antosiyanidin çeşidi bulunabilir.

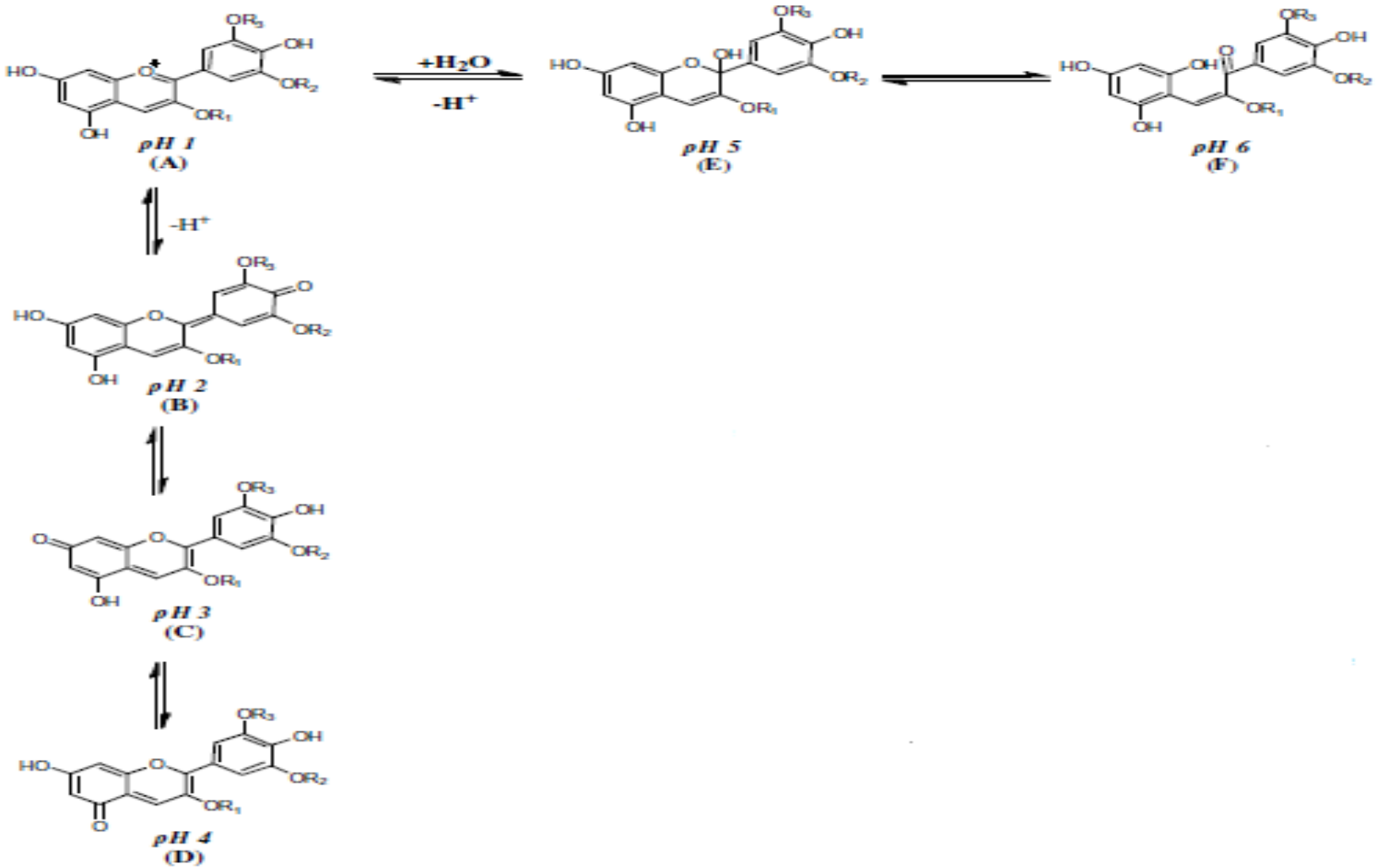
Meyve ve sebzelere esas rengi veren başlıca antosiyaninler [33];

- ✓ Siyanidin (çilek, şeftali, kiraz, incir, erik, ahududu, frenküzümü, kırmızı lahana)
- ✓ Malvidin (bazı üzümlerde)
- ✓ Pelargonidin (çilek, kırmızı turp, kızılcık, dut)
- ✓ Peonidin (bataklık kızılcığı)
- ✓ Petunidin (Amerikan üzümleri) bulunur.

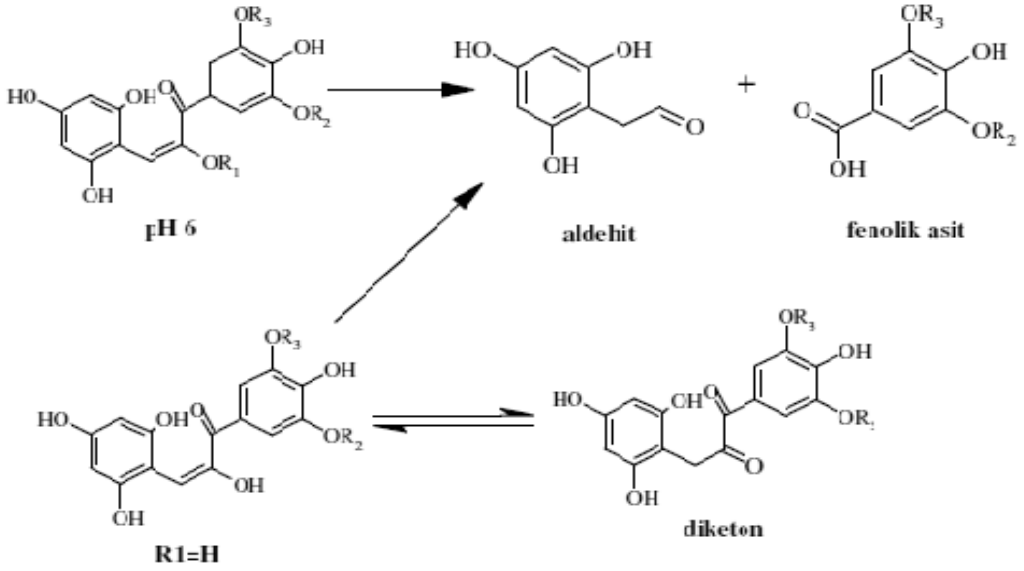
2.1.2.1.1. Antosiyaninlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Serbest radikallerin; lipid, protein ve nükleik asitlere karşı oksidatif hasar yaptığı, hücre içindeki yapıları bozarak ve DNA yapısındaki biyokimyasal bileşiklerde bozulmalara yol açarak birçok farklı hastalığa yol açabileceği ifade edilmektedir. Serbest radikaller, kanser, kalp hastalıkları, akciğer hastalıkları, katarakt gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır. Antioksidan maddeler, serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, oksijeni ve metalleri bağlayarak, oksidasyonu arttıran faktörleri engellemektedirler. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler. Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkileri, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) ve lipoprotein oksidasyonunu önleyerek sağlık üzerinde olumlu etkiler yapmaktadır.

Antosiyanin ekstraktlarının gıdalara yalnızca çekici renk özellikleri kazandırmadığı, aynı zamanda sağlık açısından yararlı bileşikler olduğu ve farmakolojik özellikleri nedeniyle çeşitli hastalıklarda tedavi etme amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Antosiyaninlerin kanser riskini azaltma, kan dolaşımı bozukluklarında ve bazı göz hastalıklarında tedavi edici niteliği bulunduğu ortaya konulmuştur [19]. Üzümsü meyvelerde bulunan fenolik bileşiklerden antosiyanin, kuersetin, kamferol, mirisetin ve ellagik asit antikanserojenik, antibakteriyal, antiviral ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Genel olarak dut, çilek, böğürtlen, ahududu, frenk üzümü, bektaşi üzümü, yaban mersini, mürver gibi meyvelerin antioksidan kapasiteleri oldukça yüksektir [34].



Şekil 2.11. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları R1=H ya da sakkarit, R2 ve R3= H ya da metil [16].



Şekil 2.12. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu R1=H ya da sakkarit, R2 ve R3=H ya da metil [16].

2.2. Çalışılan Meyvelerin Özellikleri

2.2.1. Kiraz *(Prunus avium* L.*)*

Kiraz meyvesinin Latince ismi *Prunus avium* L. olup gülgiller (Rosaceae*)* familyasında yer alır. Giresun, Güney Kafkasya, Hazar Denizi ve Kuzey Anadolu' da doğal olarak bulunan bir meyve ağacıdır. Nisan-Mayıs aylarında, demet halinde pembemsi beyaz renkli çiçekler açan, kırmızı, etli ve sulu meyveleri olan bir ağaçtır. Meyveler, dallarda iki veya üçü bir arada demetler halinde bulunur ve iyice kızarıp olgunlaşınca meyvesi tek çekirdekli tohumunu taşır. Serin yerleri ve süzek toprakları seven kiraz ağaçları, tohumuyla çoğalır. Kiraz ağacının meyvesi, bulunduğu bölgeye göre Nisan sonu ile Temmuz ayı arasında olgunlaştığında, siyaha yakın kırmızı ya da sarı renkte olur. 1-3 cm çapında yuvarlak biçimli, etli, sulu, az lifli, aromalı ve lezzetli olan meyveyi, dallara ince uzun bir sap bağlar (Şekil 2.13). Fosfor, B3 ve C vitamini ile meyve şekeri yönünden zengin olan kiraz sevilerek yenen bir meyvedir. Ayrıca pastacılık ve şekerlemecilikte kullanılır. Fenolik asit ve flavonoid türlerinin bileşikleri gibi birçok maddeyi de içerir. Kiraz meyvesinde bulunan antosiyanin bileşikleri yüksek antioksidan kapasiteye sahip

olup aktif oksijen formlarının neden olduğu kanser, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedir (http://tr.wikipedia.org/wiki/Kiraz).



Şekil 2.13. Kiraz meyvesi

2.2.2. Çilek *(Fragaria vesca* L.*)*

Üzümsü meyveler grubuna giren çilek (*Fragira vesca* L.), gülgiller (Rosacae) familyası içerisinde yer alan bir bitki cinsi ve bu cins içinde yer alan türlerin meyvelerinin ortak adıdır (Şekil 2.14). Dünyada, adlandırılmış 20' den fazla çilek türü vardır, ayrıca çeşitli melezler ve kültivarlar da bulunur. Çilek, hem taze olarak tüketilebilen, hem de sanayiye elverişli çok lezzetli ve hoş kokulu bir meyve türüdür. Taze olarak sofrada yararlanılmasının yanında pasta, reçel, marmelat, komposto, dondurma, şıra, şampanya ve likör yapımında da kullanılmaktadır. Bol miktarda A, B, C vitaminleri, kalsiyum, demir ve fosfor, fenolik asit ve flavonoid türlerinin bileşikleri gibi birçok maddeyi içerirler. Çilek meyvesinde bulunan antosiyanin bileşikleri yüksek antioksidan kapasiteye sahip olup aktif oksijen formlarının neden oldugu kanser, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedir (http://tr.wikipedia.org/wiki/cilek).



Şekil 2.14. Çilek meyvesi

2.2.3. Kızılcık *(Cornus mas* L.*)*

Kızılcık (*Cornus mas* L.), Apiaceae takımının ait çok yıllık odunsu bir bitkidir. Kızılcık sert çekirdekli bir meyvedir. Anavatanı, Anadolu, Kafkasya ve Avrupa olup ülkemizin sahil bölgelerinde, genelde tarla ve bahçe kenarlarında tek veya birkaç ağaç halinde veya ormanlık alanlarda doğal olarak yetişmektedir. Yaz sonu ile sonbahar başlarında olgunlaşan kızılcık meyveleri, oval, kırmızı renkli, tatlı, iyi aromalı ve yaklaşık olarak zeytin iriliğindedir. Meyve rengi türlere bağlı olarak koyu kırmızı, kiraz kırmızısı, pembe, sarı ve yeşildir [35] (Şekil 2.15). Kızılcık meyvesinde kolay hazm olabilir şekerler, glikoz, fruktoz, organik asitler, glikozit, fruktozit, aromatik bileşikler, tanen, salisilik asit, pektin ve mineral maddeler, askorbik asit, kateşin, antosiyanin, flavanol gibi biyolojik aktif maddeler bulunur. Kızılcığa rengini veren antosiyanin grubu maddelerdir. Fenolik bileşiklerden olan antosiyaninler, yüksek antioksidan kapasiteye sahip olup aktif oksijen formlarının neden oldugu kanser, kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın oluşum ve gelişimini önlemektedir [36, 37].



Şekil 2.15. Kızılcık meyvesi

3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

Meyve, bitki ve gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin analizi ekstraksiyon işlemi ile başlar. Ekstraksiyon işlemi gıdanın çeşidine, tayin edilmek istenen fenolik bileşiklere ve kullanılan analitik metoda bağlıdır [38]. Ekstraksiyon işleminde ilk basamak olan gıdanın ezilmesi, preslenmesi ya da öğütülmesi gıdanın yüzey alanını arttırır ve böylece gıdanın ekstraksiyon çözeltisiyle daha iyi etkileşmesini sağlar [39]. Fenolik bileşiklerin çoğu glikozitleri ya da esterleri olarak bulunduğu için, örnek hazırlama işlemi asidik, bazik ya da enzimatik hidroliz içererek fenolik bileşikleri serbest hale getirir. Eğer fenolik bileşikler türevleri olarak tayin edilmek istenirse hidroliz basamağı uygulanmaz [40].

3.1. Ekstraksiyon

Bitki ve meyvelerdeki fenolik bileşikler çeşitli çözücü/çözücü karışımları kullanılarak katı-sıvı ekstraksiyonu ile ekstre edilmektedir. Bitki ve meyvelerdeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu kimyasal yapılarından, muhafaza süresi ve koşullarından, uygulanan ekstraksiyon metodundan ve girişim yapan maddelerin bulunmasına kadar pek çok faktörden etkilenir [40]. Ancak fenolik bileşikler, gıdalarda basit fenollerden yüksek polimerizasyon derecesine sahip bileşiklere kadar çok değişik kimyasal yapıda bulunmaktadır. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler basit fenoller, fenolik asitler (hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler ve ligninler olmak üzere oldukça geniş bir aralık içermektedir [41]. Bu fenolik bileşikler karbonhidratlarla, proteinlerle ya da diğer bitki bileşenleriyle kompleksleşmiş olarak; yüksek molekül ağırlıklı fenolikler ve çözünebilir kompleksleri olarak bulunabilirler. Dolayısıyla bitkilerin fenolik ekstraktları kullanılan çözücü sitemi içerisinde çözünebilen farklı fenolik sınıflar içermektedir. Aside dayalı katı faz ekstraksiyon tekniği ve fraksiyonlama işlemi istenmeyen bu maddelerin uzaklaştırılması için yaygın olarak kullanılır [42]. Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü çözücünün polaritesine, fenoliklerin polimerizasyon derecesine ve diğer bileşiklerle olan etkileşimine göre değişir. Dolayısıyla bitkideki bütün fenoliklerin ya da belirli sınıf fenolik maddelerin ekstraksiyonu için tek bir metottan söz edilemez. Metanol, etanol, aseton, su, etil asetat, az miktarda kullanılan propanol, dimetilformamid ve bunların birleşimleri fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için

sıklıkla kullanılır [43]. Ekstraksiyon süresinin 1 dakikadan [44] 24 saate [45, 46] kadar değiştiği ve daha uzun ekstraksiyon süresinin çözücü sistemine indirgeyici reaktifler eklenmediğinde fenoliklerin oksidasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [47].

Bitki ve gıda örneklerinin flavonoid analizinde çözücü ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyon, sokslet ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu teknikleri kullanılmaktadır. Flavonoidler bitkilerden genellikle metanol, etanol, su, aseton, dimetilformamit ya da bunların birleşimleri kullanılarak ekstrakte edilirler [1]. Flavonoidlerin analizinde bazı durumlarda çözücülerin asitlendirilmesi gerekebilir [1, 48]. Flavonol glikozitlerin çoğunun referans maddeleri olmadığı için kantitatif analizlerini yapmak zordur. Yapılan çalışmalarda meyvelerde 30' dan fazla farklı flavonol glikozitin tayin edildiği belirtilmektedir [49]. Gıdalarda bulunan flavonolların miktar tayininde flavonol glikozitlerin aglikonlarına dönüştürülmesi pratik olarak önerilen bir metottur [1, 48]. Flavonoid aglikonların HCl ile asitlendirilmiş sulu metanol ekstraksiyon ve hidroliz yöntemi meyvelerin ve sebzelerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [50, 51]. Glikozitlerin asit/alkali hidroliz hızları kullanılan asit/baz gücüne, şekerin yapısına ve şekerde bulunan flavonoid çekirdeğinin pozisyonuna bağlıdır. Gıdalarda yapılan antosiyanin analizlerinde ise molekülün polar özellikte olması sebebiyle en yaygın kullanılan çözücülerin sulu etanol, metanol, aseton [52] ya da bunların asitli çözeltileri olduğu belirtilmektedir [53].

3.2. Kromatografik Teknikler

Bitki ve meyvelerdeki fenolik bileşiklerin toplam miktarının tayini spekrofotometrik teknik yöntemleri kullanılarak UV-VIS spektrometresi ile yapılmaktadır. Her bir fenolik bileşiğin ayrı ayrı tayininde kromatografik yöntemlerden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve elektroforez teknikleri kullanılmaktadır [1].

Bitki ve meyvelerde fenolik bileşiklerin tayininde en fazla kullanılan teknik yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)' dir. Bu tekniğin tercih edilmesinin başlıca nedenleri, duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur.

HPLC' nin yaygın uygulamaları ise;

- Fizyolojik örneklerdeki bazı aminoasit, nükleik asit ve protein miktarlarının tayini,
- İlaç aktif maddelerinin, sentetik biyoürünlerin yada farmasötik ilaçlardaki bozunma ürünlerinin tayini,
- Pestisit ve insektisit ve diğer çevresel örneklerin tayini,
- Karışımlardaki bileşenlerin ayrılması,
- Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşiklerin tayini,
- Bir karışımdaki polimerlerin moleküler ağırlık dağılımının belirlenmesidir.

Uçucu olmayan fenolik bileşiklerin yapısal analizleri için kullanılan HPLC-MS hızlı ve güvenilir bir metottur. Yapılan pek çok çalışmada standart ve referans maddelerin yardımıyla örnekte bulunan flavonoidlerin tayini için MS ve UV dedektörlerin birlikte kullanıldığı görülmektedir. Standartı olmayan bilinmeyen maddelerin analizi için ikili kütle spektrometreleri (MS/MS veya MS) kullanılmaktadır. Flavonoidlerin sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS) analizlerinde yaygın olarak kullanılan iyonlaştırma teknikleri atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaştırma (APCI) ve elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). Her iki teknik için de pozitif ve negatif iyonlaşma uygulanabilmektedir. ESI flavonoid analizlerinde daha sıklıkla kullanılır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonlaşma-kütle spektrometresi (HPLC-ESI-MS), büyük, sıcaklığa karşı kararsız ve oldukça polar olan bileşiklerin tayinlerinde oldukça kolaylık sağlar [1, 54].

3.3. Spektroskopik Metodlarla Toplam Antosiyanin Tayini

Bitki, meyve ve gıdalarda bulunan toplam antosiyanin pH farkı metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak yapılır [55]. Uygulanan metotta potasyum klorür çözeltisi ve sodyum asetat tamponu kullanılarak antosiyanin pigmentlerinin pH değeriyle değişen renk ve şiddetlerine göre absorbans değerlerinin değişimi esas alınarak miktar tayini yapılır. Antosiyaninler pH 1.0' de renkli oksonyum ya da flavilyum, pH 4.5' da ise renksiz karbinol yapısında bulunurlar.

3.4.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisinde kolon verimi dolgu maddesinde kullanılan tanecik boyutunun küçültülmesi (normalde 100–250 μm' den 1–15 μm' ye) ile önemli derecede artmaktadır. Ancak tanecik çapı 3–10 μm' ye kadar küçük olan dolgu maddeleri 1960' lı yılların son dönemlerinde kullanılmaya başlanmıştır. Tanecik çapının, kolon çapının küçüldüğü ve yüksek basıncın uygulandığı sıvı kromatografisine yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi günümüzde en çok kullanım alanı bulan kromatografik metotlardandır [56].

Bunun nedenleri arasında;

- ✓ Duyarlılığının yüksek olması,
- ✓ Kantitatif tayinlerde kullanılabilmesi,
- ✓ Uçucu olmayan türlerin ve sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması,
- ✓ Sanayi ve benzeri birçok alanda uygulanabilirliği sayılabilir.

Özellikle, yaşamın birinci dereceden temel taşı olan maddelerden; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar ve antibiyotikler bu metodla tayin edilirler.

Kromatografi çok gelişme gösteren analitik yöntemlerdendir. Onlarca yönteme yenileri eklenmektedir. Her yöntemin diğerine bazı üstünlükleri vardır. Bu nedenle kromatografik yöntemlerin genel bir karşılaştırmasını yapmak zorundadır. Tablo 3.1' de gaz ve sıvı kromatografi yöntemlerinin genel bir karşılaştırması yapılmıştır.

Sıvı kromatografideki büyük gelişme her şeyden önce çok küçük tanecik çaplı dolgu maddelerinin (sabit faz) hazırlanabilmesi ve bu taneciklerin üzerinden sıvı fazın yürütülmesini sağlayacak yüksek basınç pompalarının teknik olarak yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır. Uygun dedektörlerin de geliştirilmesi, çeşitli sabit fazların kullanılabilir olması, sıvı kromatografiyi, özellikle yüksek basınç sıvı kromatografiyi (HPLC), gaz kromatografi ile yarışabilir hale getirdi. O kadar ki zaman zaman HPLC' nin

daha avantajlı olduğu iddia edildi. Ancak genellikle gaz ve sıvı kromatografilerinin birbirlerinin rakibi değil, birbirlerinin tamamlayıcısı olduğu kabul edilmektedir [57].

Tablo 3.1. Gaz ve Sıvı Kromatografilerinin Karşılaştırılması [57].

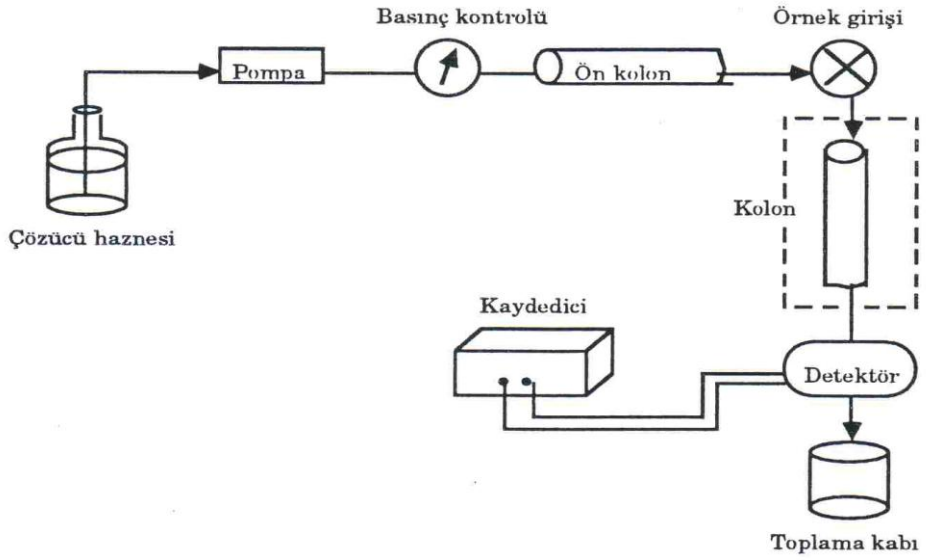
Faktör	**Gaz Kromatografisi**	**Sıvı Kromatografisi**
Prensip	Örnek sıvıya dayanıklı	Örnek uygun bir sıvıda buharlaşabilir
Örnek türü molekül ağırlık<500	Gazlar, sıvılar, katılar	Sıvı ve katılar, iyonlar
Hareketli faz	H_2, He, N_2 ile sınırlı	Tüm organik ve inorg. sıvılar
Sabit faz	Sınırlı sayıda	Bağlı faz şeklinde çok sayıda
En düşük tayin sınırı	10^{9}-10^{12} g	10^{6}-10^{9} g
Analiz süresi	Dakika	Dakikalardan saatlere
Teorik tepki sayısı	2000-100000	500-10000
Prepara. amaç için	Uygun değil	Uygun
Sıcaklık programı	Yapılabilir	Güç ve yapılamaz
Gradient yürütme	Yapılamaz	Yapılabilir

3.4.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Cihazı

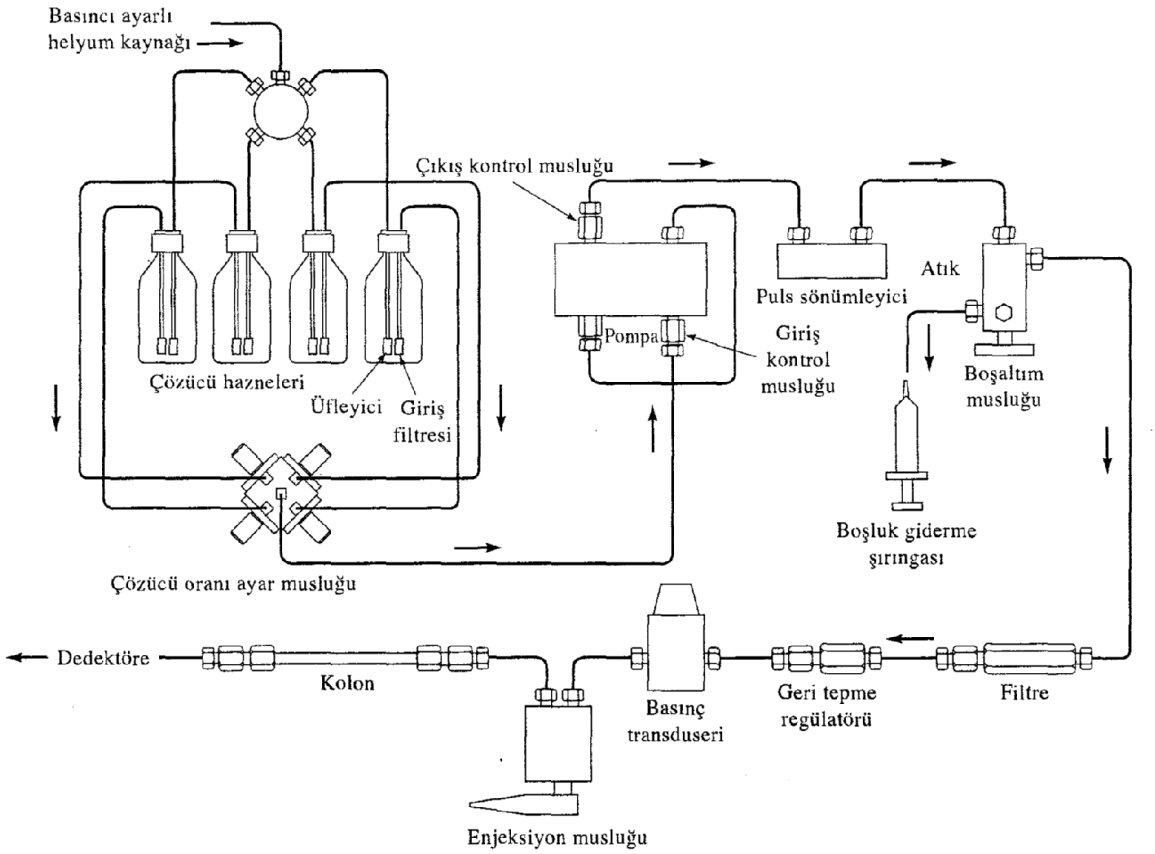
Bir HPLC cihazı her biri 200–1000 mL çözücü içerebilen camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bazı cihazlarda bu hazneler kolonda ve dedektör sisteminde gaz oluşturarak bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Bu gaz kabarcıkları bant genişlemesine ve çoğu zaman da dedektörün performansında bozucu etkilere sahip olabilir. Cihazda bulunan ön kolon çözücü içinde bulunabilecek toz ve partikül halindeki maddelerin pompaya veya enjeksiyon sistemine zarar vermemesi veya kolonu tıkamaması için toz ve partikül halindeki maddeleri tutar. Böylece çözücü kaybı en aza indirilmiş olur.

Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan ayırma ***izokratik elüsyon*** olarak adlandırılır. Genellikle ayırma etkililiği ***gradient elüsyonu*** ile artırılır. Bunun için polariteleri birbirinden çok farklı, iki ya da üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre bazen sürekli olarak, bazen de seri basamaklar

halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. Genellikle HPLC cihazları, çözücülerin hacimleri oranı zamanla doğrusal olarak veya üstel olarak değiştirilebilecek nitelikte, iki veya daha fazla hazneden aldığı çözücüleri bir karıştırma odasında sürekli olarak değişen hızlarda bir araya getiren sistemlerle donatılmıştır. Şekil 3.1' de bir HPLC cihazının şemasını, Şekil 3.2' de gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması verilmiştir.



Şekil 3.1. Bir HPLC cihazı şeması [57].



Şekil 3.2. Gradient elüsyon uyumlu bir HPLC cihazının şeması [58].

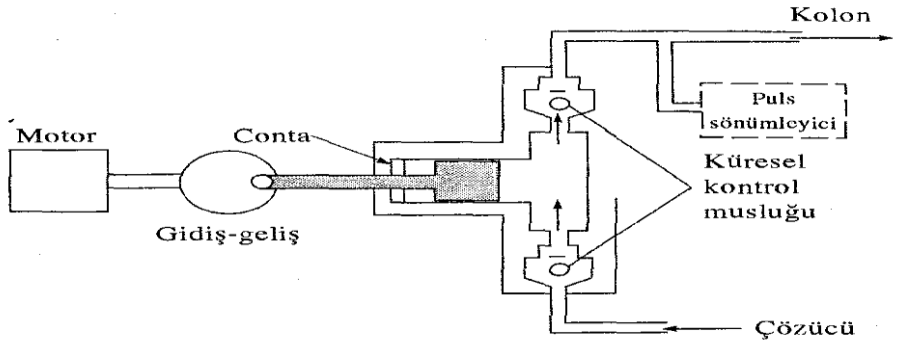
3.4.2. Pompa Sistemleri

Bir HPLC pompalama sistemi için gerekli şartlar şunlardır:

- ✓ 400 atm' ye kadar basıç üretimi,
- ✓ 0,1–1 ml/dk aralığında akış hızları,
- ✓ % 0.5 veya daha iyi bir bağıl tekrarlanabilirlikle akış kontrolü,
- ✓ Korozyona dayanıklı parçaları içermelidir.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından dolayı HPLC pompaları tarafından üretilen basınç bir patlama tehlikesi oluşturmaz. Böylece sistemin parçalarından herhangi birinde meydana gelecek bir çatlak, sadece çözücünün dışarı sızmasına neden olur. Ama sızıntılar bir yangın tehlikesi oluşturabilir.

HPLC sistemlerinde kullanılan pompalar, pistonlu, sürgülü ve pnömatik şeklinde sınıflandırılırlar. Bunlardan pistonlu pompalar HPLC sistemlerinin % 90' ında kullanılmaktadır. Pistonlu pompalar, genellikle motor kontrollü bir pistonun ileri ve geri hareketiyle çözücünün pompalandığı küçük bir silindirden meydana gelmiştir (Şekil 3.3). Sırasıyla açılıp kapanan iki tane küresel kontrol musluğu, çözücünün silindir içine giriş ve çıkış akışını kontrol eder. Piston çözücü ile doğrudan temas etmektedir.



Şekil 3.3. HPLC için bir pistonlu pompa [58].

Pistonlu pompaların üstünlükleri;

- ✓ Küçük iç hacimleri (35–400 μL),
- ✓ Yüksek çıkış basıncı (700 atm' ye kadar),
- ✓ Gradiyent elüsyona uygun oluşları,
- ✓ Kolon geri basıncından ve çözücü viskozitesinden büyük ölçüde bağımsız olan sabit akış hızlarıdır.

3.4.3. Örnek Enjeksiyon Sistemleri

Genellikle sıvı kromatografik ölçümlerinin kesinliğini, numunenin kolon dolgu maddesine taşınmasının tekrarlanabilirliği belirler. Aşırı numune yüklenmiş kolonlarda görülen bant genişlemesi de kesinliği etkiler. Bu yüzden kullanılan hacim oldukça küçük olmalıdır. Ayrıca, sistemin basıncı düşürülmeden numunenin sisteme girişi sağlanmalıdır.

3.4.4. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonları

Sıvı kromatografisi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Fakat bazen de kalın cidarlı cam borular da kullanılır. Sıvı kromatografisinde kullanılan kolonlar analitik ve emniyet kolonları şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan, kolon olarak ta adlandırılan analitik kolonunun boyu 10–30 cm, iç çapı 4-10 mm ve kolon dolgu maddesinin büyüklüğü 5–10 μm arasındadır. Normalde kolonlar düzgündür ve gerektiği yerlerde kolonların birbirine eklenmesiyle kolonun boyu artırılabilir. Son yıllarda, iç çapı 1–4.6 mm, tanecik büyüklüğü 3–5 μm ve boyu 3–7.5 cm arasında olan daha küçük boyutlarda, daha hızlı ve yüksek performanslı kolonlar üretilmektedir.

3.4.4.1. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

Sıvı kromatografisinde iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar;

i. Film Dolgular
ii. Gözenekli Dolgular

i. Film Dolgular: Bunlar, küresel, gözeneksiz, çapları 30–40 μm olan cam veya polimer taneciklerden oluşur. Bu taneciklerin yüzeyine silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli film kaplanmıştır.

ii. Gözenekli dolgular: Çapları 3–10 μm arasındadır. Partiküller silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir.

3.4.5. Dedektörler

Hareketli fazdaki analit bileşeni/bileşenlerinin türü ve/veya konsantrasyonlarında meydana gelen değişikliklerle orantılı sinyal üreterek kalitatif ve/veya kantitatif analiz

yapılmasına imkan sağlayan elektronik araçlar **dedektör** olarak adlandırılmaktadır. Dedektör özelliklerini belirlemede kullanılan çeşitli analitik performans parametreleri vardır. Bunların başlıcaları;

- ✓ Seçicilik,
- ✓ Duyarlılık (LOD),
- ✓ En küçük tayin sınırı (LOQ),
- ✓ Doğrusal çalışma bölgesi (dinamik aralık),
- ✓ Tekrarlanabilirlik (kesinlik),
- ✓ Doğruluk,
- ✓ Diğerleri (dedektör hacmi, bilgi saklama, diğer dedektörlere bağlanabilme, vb.)

Sıvı kromatografisinde kullanılan dedektörleri şöyle sıralayabiliriz:

- ✓ Absorbans dedektörleri,
- ✓ Filtreli ultraviyole absorbans dedektörleri,
- ✓ Monokromatörlü ultraviyole absorbans dedektörleri,
- ✓ Floresans dedektörleri,
- ✓ Kırma indisi dedektörleri,
- ✓ Buharlaştırmalı ışık saçma dedektörleri,
- ✓ Elektrokimyasal dedektörleri,
- ✓ Kütle spektrometresidir.

3.4.5.1. Absorbans Dedektörleri

Kromatografik kolondan çıkan eluentlerin absorbans ölçümü için içinden çıktığı çıkış hücresinin hacimleri, kolon dışı bant genişlemesini en aza indirmek için mümkün olduğunca düşük tutulmalıdır.

Absorbans dedektörlerinin büyük bir kısmı çift ışın yolludur ve bu ışınlardan birisi eluent hücresinden geçerken, diğeri şiddetinin azaltılması amacıyla bir filtreden geçirilir. Daha sonra bu iki ışının şiddetinin karşılaştırılması amacıyla birbirleriyle uyumlu fotoelektrik dedektörler bulunur.

3.4.5.2. Filtreli Ultraviyole Absorbans Dedektörleri

Işın kaynağı olarak civa lambasının kullanıldığı filtreli fotometreler, en basit UV absorbsiyon dedektörleridir. En yaygın olarak kullanılan 254 nm dalga boyundaki şiddetli ışın filtrelerle izole edilmiştir. Bazı cihazlarda 250, 313, 334 ve 365 nm dalga boyundaki ışınlar da filtre değiştirmek suretiyle kullanılmaktadır.

3.4.5.3. Monokromatörlü Ultraviyole Absorbans Dedektörleri

Optik ağlı spektrofotometreden oluşan dedektörlerden bazıları ultraviyole ışınları ile sınırlıdır. Diğerlerinde hem UV hem de görünür bölge ışınlarını kullanmaktadır.

En güçlü ultraviyole spektrofotometrik dedektörler diyot serili cihazlardır. Bu cihazların avantajı aynı zamanda birçok dalgaboyunda çok hızlı ölçümlerin yapılabilmesidir.

3.4.5.4. Floresans Dedektörleri

Işık kaynağı olarak ksenon lambasının ve floresans ışımasını izole etmek için de optik ağın monokromatör olarak kullanıldığı dedektörlerdir. Floresans dedektörleri diğerlerine oranla 10 kat daha fazla duyarlılığa sahiptir. Bu dedektörle 10^{-2} ppb duyarlılığa ulaşılabilmektedir. İlaçlar, doğal ürünler ve petrol ürünleri gibi floresans özelliği olan maddelerin tayininde kullanılır. Bazen de örnekte bulunan floresans yapan maddelerin sayısı, floresans özellik oluşturucu maddelerle reaksiyona sokularak arttırılmaktadır. Bunlara örnek olarak; primer ve sekonder aminlerle, amino asitlerle ve fenollerle floresans özellik gösteren dansilklorür verilebilir.

3.5. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi, organik ve anorganik moleküllerinin yapılarının aydınlatılmasında, karışımların nicel ve nitel analizinde, katı-sıvı-gaz maddelerinin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılmasında, bir örnekteki atomların izotoplarının belirlenmesinde en çok kullanılan analitik yöntemdir. Bir kütle spektroskopisinde

spektrumu alınacak örneğin ilk olarak gaz halinde iyonlarını elde etmek gereklidir. Kütle spektrumlarının görünüşü kullanılan iyonlaştırma yöntemlerine önemli ölçüde bağlıdır [58].

3.5.1. Moleküler Kütle Spektrometresinde İyon Kaynakları

Moleküler kütle spektrometride iyon kaynakları iki bölüme ayrılır (Tablo 3.2):

1. Gaz fazı iyon kaynakları
2. Dispersiyon kaynakları

- ✓ Gaz fazı kaynaklarında örnek önce buharlaştırılır sonra iyonlaştırılır.
- ✓ Gaz fazı kaynakları kaynama noktaları 500 °C' den küçük olan termal olarak kararlı maddelere uygulanır.
- ✓ Desorpsiyon yönteminde ise katı ve sıvı haldeki madde doğrudan gaz iyonu haline dönüştürülür.
- ✓ Desorpsiyon kaynaklı kütle spektrometreleri uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddelere uygulanabilir.

Tablo 3.2. Moleküler kütle spektroskopide kullanılan iyon kaynakları [58].

Temel Tip	**Adı ve Kısaltılması**	**İyonlaştırıcı**
Gaz fazı	Elektron impakt (EI)*	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırmalı (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek-potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks yardımlı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	252Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometri (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termospray iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

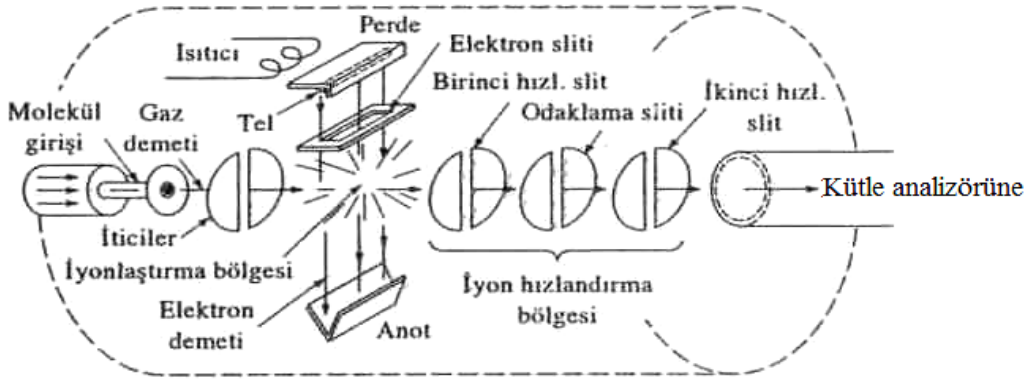
3.5.1.1. Gaz Fazı İyon Kaynakları

3.5.1.1.1. Elektron İmpakt Kaynağı

Bu yöntemde, örnek yeterince buharlaşabilecek bir sıcaklığa getirilir ve enerjik elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Şekil 3.4' te bir elektron impakt kaynağının yapısı görülmektedir.

Bu yöntemde;

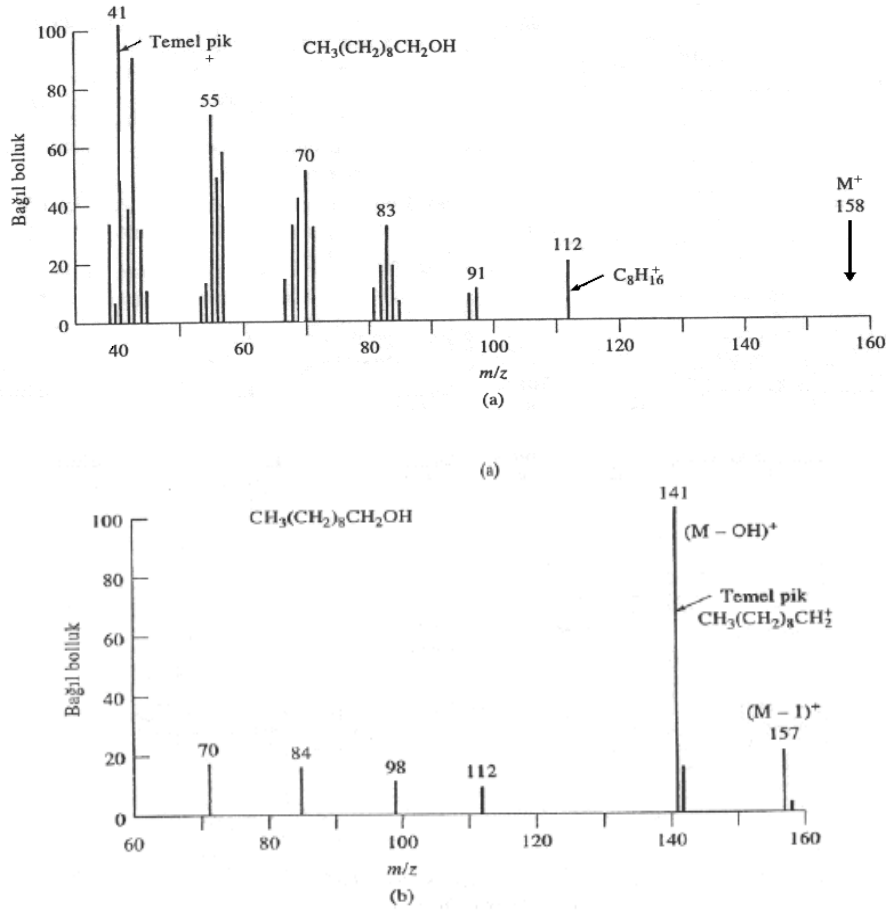
- ✓ Bazı moleküllerde parçalanma yüzünden moleküler iyon oluşmayabilir. Bu yüzden de analitin tanınması için birinci derecede önemli olan mol kütlesi tespit edilemez.
- ✓ Elektron impakt spektrumlarında temel pik genellikle parçalanma ürünlerinin arasından çıkar ve bu moleküler iyon piki değildir.
- ✓ Elektron impakt kaynakları yüksek iyon akımı üretmek için uygundur ve bu nedenle duyarlıkları iyidir.
- ✓ Bu yöntemde parçalanmalar çok sayıda olur ve çok sayıda pik görülür, bu durum analiz edilen maddenin şüpheli kısımlarının tanımlanmasında yardımcı olur.



Şekil 3.4. Elektron-impakt kaynağının yapısı [58].

Elektron impakt kaynaklarının kullanımının dezavantajı, örneğin buharlaştırılmasıdır. Bazı örneklerde iyonlaşmadan önce termal bozulma olayı gözlenir. Bazı durumlarda ise piklerden bazıları moleküler iyon pikinden daha büyük olur. Bu pikler, aynı kimyasal formüle sahip olmasına karşılık farklı izotop bileşimlerinden dolayı

ortaya çıkar. Ayrıca iyon/molekül çarpışmaları moleküler iyonun kütlesinden daha büyük kütlede piklerin meydana gelmesine sebep olabilir. İyon kaynakları sert kaynaklar ve yumuşak kaynaklar olarak sınıflanır. Sert kaynaklar yeterli enerjiyi analit moleküllerine aktaran ve molekülleri yüksek enerjili uyarılmış hallere çıkaran kaynaklardır. Bu moleküllerin durulması bağların kopması şeklinde olur ve kütle/yük oranı moleküler iyonunkinden daha küçük iyonlar ortaya çıkar. Yumuşak kaynaklar analitin daha az parçalanmasına sebep olur. Bunun sonucunda elde edilen kütle spektrumlarında moleküler pik çoğu zaman görülür ve bunun yanında birkaç başka pik bulunur. Şekil 3.5' te görülen spektrum, kütle spektrumlarının genel sunuluş tarzını göstermektedir. Sert ve yumuşak iyon kaynaklarının her ikiside analizlerde kullanılır. Sert kaynaklarla elde edilmiş bir spektrumda gözlenen çok sayıda pik fonksiyonlu grupların tiplerini belirlemede ve analitlerle ilgili yapısal bilgi, dolayısıyla yapı aydınlatmada kullanılır. Yumuşak kaynaklarla alınan spektrumlar ise analiz edilen molekül veya moleküllerin doğru olarak tayin edilmesinde yararlıdır.

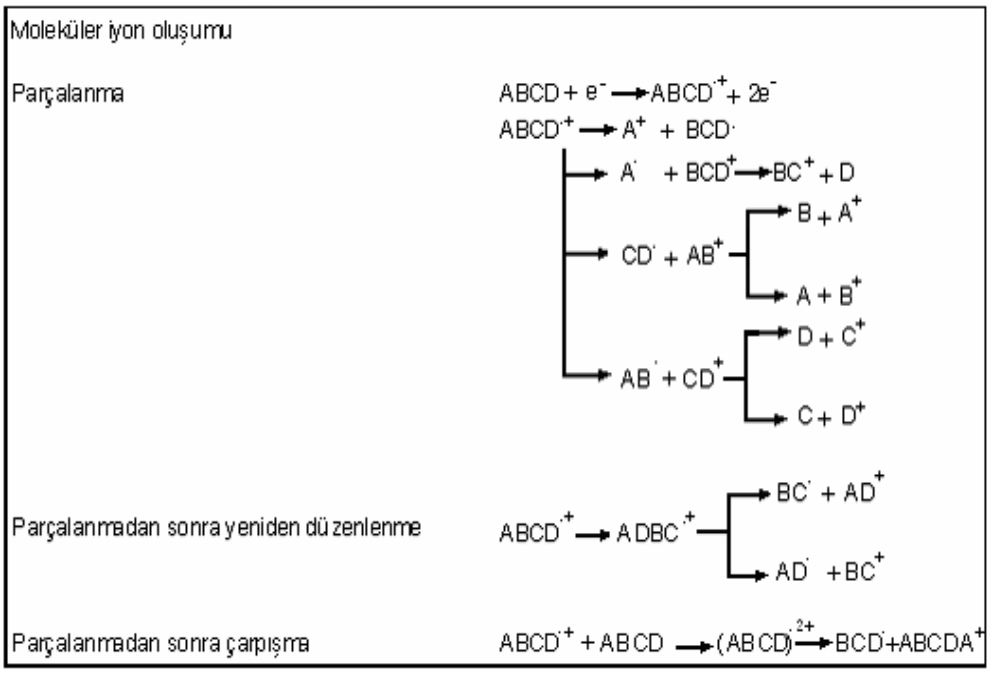


Şekil 3.5. Dekanol'ün **(a)** sert bir kaynakla ve **(b)** yumuşak bir kaynakla alınmış kütle spektrumları [58].

Sert ve yumuşak iyon kaynaklarının her ikiside analizlerde kullanılır. Sert kaynaklarla elde edilmiş bir spektrumda gözlenen çok sayıda pik fonksiyonlu grupların tiplerini belirlemede ve analitlerle ilgili yapısal bilgi, dolayısıyla yapı aydınlatmada kullanılır. Yumuşak kaynaklarla alınan spektrumlar ise analiz edilen molekül veya moleküllerin doğru olarak tayin edilmesinde yararlıdır.

Elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar Tablo 3.3' te görülmektedir.

Tablo 3.3. Bir elektron impakt kaynağındaki bazı tipik reaksiyonlar [66].



3.5.1.1.2. Kimyasal İyonlaştırma Kaynakları

Kimyasal iyonlaştırmada numunenin gaz haline gelmiş atomları, elektron bombardımanı ile iyonlaştırılmış başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılır. Bu amaçla genelde pozitif iyonlar kullanılmaktadır. Fakat zaman zaman elektronegativitesi yüksek atomlar varsa, negatif iyonlar da kimyasal iyonlaşmada kullanılmaktadır. En sık kullanılan reaktif gaz metandır. Propan, izobütan ve amonyak gibi reaktifler de kimyasal iyonlaştırmada kullanılır.

3.5.1.1.3. Alan İyonlaştırma Kaynakları

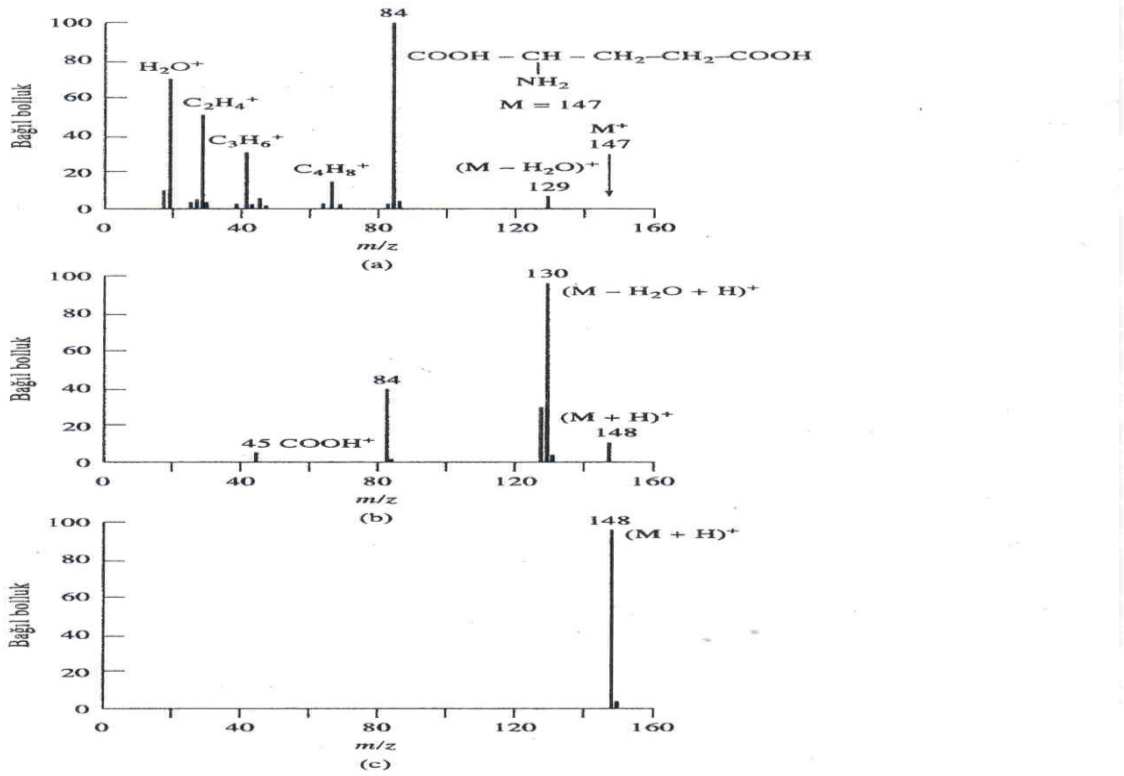
Alan iyonlaştırma kaynaklarında iyonlar, yüksek elektronların etkisiyle (10^8 V/cm) meydana gelir. Alan iyonlaştırmanın duyarlılığı elektron impakt tekniğine göre 10 kat daha kötüdür.

3.5.1.2. Desorpsiyon Kaynakları

3.5.1.2.1. Alan Desorpsiyon Kaynakları

Elektrotlardan anot olarak kullanılan yüzeyine örnek adsorbe ettirilir ve daha sonra elektrik alanın etkisi ile örnek desorbe edilir. Elektrot yüzeyinden böylece sıyrılmış olan numune iyonlaşmış halde elde edilir. Bu yöntemde molekül iyonu çok az parçalanır.

Şekil 3.6' da glutamik asidin elektron impakt, alan iyonlaştırma ve alan desorpsiyonu yöntemi ile elde edilen spektrumları verilmiştir.



Şekil 3.6. Glutamik asidin, **a.** Elektron impakt, **b.** Alan iyonlaştırma, **c.** Alan desorpsiyon yöntemi ile elde edilen spektrumları [58].

3.5.1.2.2. Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyonu/İyonlaştırma

Bu yöntemle karışıma, ışın desorplayıcı matriksten (nikotinik asit, benzoik asit türevleri, 3-nitrobenzoil alkol) katılır. Daha sonra bu çözelti, bir metalik probun (numune tutucu) yüzeyinde buharlaştırılır. Katı karışım, lazer ışınına maruz bırakılır ve analitin süblimleşerek iyonlaşması sağlanır.

3.5.1.2.3. Elektrosprey İyonlaştırma

Elektrosprey iyonlaştırma atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Örnek çözelti, iğne şeklindeki bir kapiler ile bir dakikada birkaç mikrolitre pompalanır. İğneye etrafındaki elektrottan birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır (elektrik yükleri örnek moleküllerine tutturulur). İyonlar gaz fazına desorbe olur.

3.5.1.2.4. Hızlı Atom Bombardıman Kaynakları

Hızlı atom bombardıman kaynakları yüksek mol kütleli polar türleri iyonlaştırmada daha çok kullanılır. Hızlı atom bombardıman kaynağı ile bir matrikste (gliserin çözeltisinde), iyonlaştırılmış haldeki örnekler enerjik ksenon veya argon atomları ile bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Kütle spektrometrelerinin karakteristik özelliği sinyal işleme ve gösterge kısımları hariç cihazın diğer bütün bileşenlerinde bulunan vakum sistemidir. Vakum sistemi yüklü parçacıklar ve elektronların atmosfer bileşenleri ile etkileşmesini önlemektir.

3.5.2. Kütle Ayırıcıları

Kütle spektrometresinde iyonlaşma bölgesinde elde edilen iyonlar, elektrikle yüklü plakalara doğru çekilerek hızlandırılır ve kütle ayırıcısına gönderilir. Kütle ayırıcısında kütle/yük *(m/z)* oranlarına göre hızlıca ayrılır. İyonların çoğu tek yüklü olduğundan, oran basitçe iyonun kütlesine eşittir. Çeşitli tipte kütle spektrometreler kullanılmaktadır.

Kullanılan kütle ayırıcıları;

1. Manyetik
2. Elektrostatik
3. Uçuş zamanlı
4. Dört kutuplu ve
5. İyon siklotron rezonanslı olmak üzere beş türlüdür.

En çok kullanılan kütle ayırıcısı manyetik ayırıcıdır. Vakum altında tutulan spektrometrenin içinde ayırıcıya giren pozitif yüklü hızlandırılmış iyonlar kütleleri ne olursa olsun yaklaşık aynı kinetik enerjiye sahiptirler. Manyetik alan içerisine giren bu iyonlar bu alan içinde doğrusal olan yollarından saptırılır ve dairesel bir yol izlemeye başlarlar. İyonların izledikleri bu yola ait dairenin yarıçapı r, iyonun kütle/yük oranına, (*m/e*), bağlıdır. İyonların m/e oranıyla manyetik alan şiddeti (B) ve iyonun manyetik alana göndermeden önce uygulanan hızlandırıcı elektriksel potansiyel değeri (E) arasında,

$$\frac{m}{e} = \frac{B^2}{2E} . r^2$$

gibi bir bağıntı vardır. Spektrometrenin dedektörüne ulaşan dairesel yolun yarıçapı değiştirilmediğinden, bu yolu izleyerek dedektöre farklı (*m/e*) değerine sahip iyonların ulaşması, sabit bir manyetik alan şiddetinde, hızlandırıcı gerilim değerini (E), değiştirmekle sağlanır. Aynı amaca, sabit bir E değerini kullanıp; B değerini değiştirerek de ulaşılır. Tek odaklamalı olan spektrometrelerde böylece çeşitli (*m/e*) değerlerine sahip iyonlar kaydedilerek örneğin spektrumları elde edilir ve

$$r_e = \frac{2E}{V}$$

eşitliği ile belirlenir. Çift odaklamalı bu tür spektrometrede, istenilen kinetik enerjili iyonlar manyetik ayırıcıya gönderilir ve kütle spektrumunda pikler böylece daha büyük bir ayırıcılıkla elde edilmiş olur. Daha basit bir kütle ayırıcısı uçuş zamanlı ayırıcıdır. Kinetik enerjileri eşit iyonlar, farklı kütlelerde iseler, farklı hızlara sahiptirler. Farklı hız ve eşit kinetik enerjili vakum altında tutulan bir uçuş tüpünün diğer tarafında bulunan dedektöre farklı zamanlarda ulaşırlar.

Uçuş zamanı değerleri ölçülerek farklı (*m/e*) değerlerine sahip olan iyonlar kaydedilir. iyonların (*m/e*) değerleri ile uçuş zamanları arasındaki ilişki

$$\frac{m}{e} = \frac{2E}{d} \cdot t^2$$

eşitliği ile verilir. Burada E, iyonları hızlandıran gerilim değeri, d ise uçuş tüpünün uzunluğudur.

Dört kutuplu ayırıcı hızlandırıcıdan çıkarak bu ayırıcıya gelen iyonlar, bu dört silindirin ortasındaki boşluktan karşıdaki dedektöre doğru karmaşık bir yol izleyerek ilerlemeye çalışırlar. Bu ayırıcının kullanılması ile ekonomik ve hızlı bir biçimde ölçüm yapılır (Şekil 3.7).

İyon siklotron rezonans ayırıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de uygulanan manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması, kaba ayrıca sabit bir gerilim uygulayarak önlenir.

Bir kütle ayırıcısının ayırıcılığı, R,

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

formülü ile hesaplanır.

Ayırıcılığı 3000 olan bir ayrıcı, kütlesi 3000 ile 3001 olan iki iyonu pik yüksekliklerinin en çok yüzde 10' u kadar birçok çakışma ile birbirinden ayırıyor demektir.

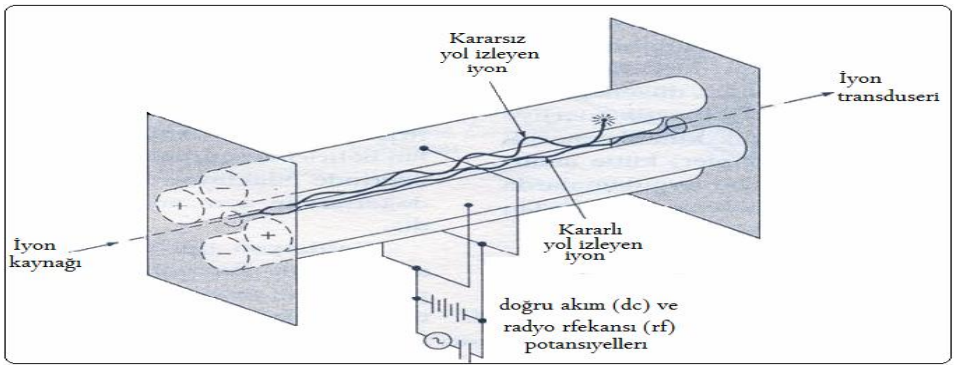
Tek odaklamalı manyetik ayırıcısı olan aletlerle 2000-5000 değerleri arasında bir ayırıcılık elde edilir. Ayırıcılık, çift odaklamalı, yani elektrostatik ve manyetik ayrıcıları ardarda kullanan spektrometreler ile 20000-50000 değerlerine yükseltilebilir. Uçuş zamanlı kütle ayırıcısı ile elde edilen ayrıcılık değeri 500, dört kutuplu ayırıcı ile elde edilebilen ise 1500 civarındadır. Birçok organik molekülün tanımlanabilmesi için 500-1500 arasındaki

ayırıcılık yeterlidir. İyon siklotron rezonans ayrıcısı ile özellikle pulslu uygulamalarda elde edilen ayırıcılık değeri ise çok büyük olup, 100000-1000000 değerine uluşabilir.

Hem moleküler hem de atomik kütle spektrometrelerinde iyonları algılamak üzere kullanılan dedektörlerin en basiti "faraday kabıdır". Bu dedektörlerde bir iletken kap, spektrometrenin öteki kısımlarına göre negatif bir potansiyelde tutulur ve böylece bu kaba doğru çekilen pozitif yüklü iyonlar elektrik akımı oluştururlar. Kütle spektrometresinde kullanılan daha iyi bir dedektör türü "elektron çoğaltıcısı" adını alır. Bu düzenekte detektöre çarpan pozitif yüklü iyonlar yüzeyden birkaç elektron fırlatılır ve bu elektronlar anotta tutularak elektrik akımına dönüştürülürler. "sintilasyon sayıcısı" adını alan bir başka dedektörde ise iyonlar lüminesans özelliğine sahip bir ekrana çarpar ve foton yayılmasına neden olurlar.

Oldukça sık kullanılan ve iyonları öteki dedektörlerdeki gibi teker teker değil, iyonların tümünü birden algılayan bir başka dedektör türü de "fotoğraf plakası" dır. Plakaya çarpan iyonlar kararmaya neden olur. Fotoğraf plakaları ile uzun poz süreleri kullanılarak duyarlılık arttırılabilir ancak, plakaların banyo edilmesi zaman alıcı bir işlemdir. Fotoğraf plakaları daha çok nitel analizde kullanılır, çünkü bu plaklarda oluşan kararma miktarını nicel anlamda ölçmek her zaman hata getiren bir işlemdir.

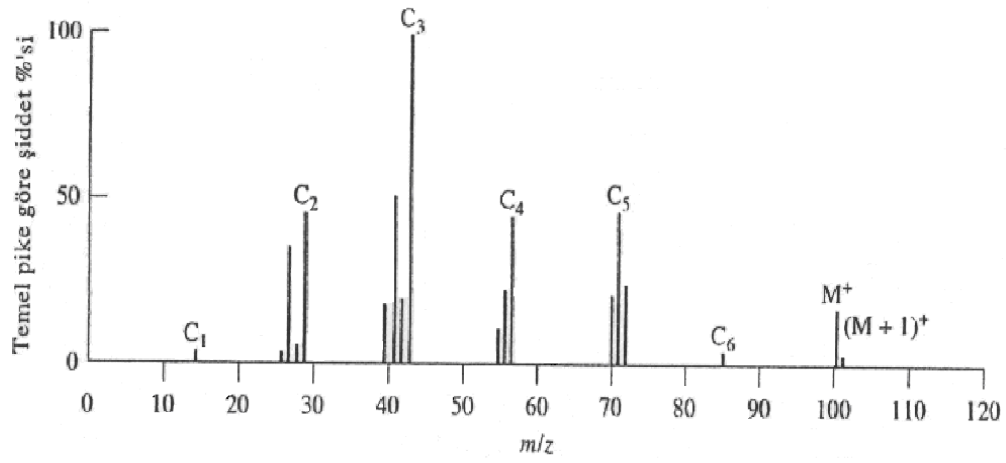
İyon siklotron rezonans uyarıcısı adını alan ve dikdörtgen prizması şeklindeki bir başka tür ayırıcıda, iyonların hızlandırıcıdan çıkarak ilerledikleri yola dik yönde bir manyetik alan ile hem iyonların ilerleme yönüne hem de manyetik alana dik yönde bir alternatif elektriksel alan birlikte uygulanır. İyonlar bu ayırıcının içinde dönerek ilerlerler ve iyonların bu kabın çeperlerine çarpması kaba ayrıca sabit bir gerilim uygulanarak önlenir.



Şekil 3.7. Dört kutuplu bir kütle ayırıcısı

3.5.3. Kütle Spektrumlarının Karşılaştırılması ile Bileşiğin Tespit Edilmesi

Kütle spektrumlarında parçalanma şeklinden maddenin yapısı hakkında bilgi elde edebiliriz. Saf maddelerin parçalanma şekli üzerine yapılan sistematik çalışmalar, parçalanma mekanizmaları üzerine mantıksal değerlendirmeler, spektrum yorumlanmasına yarayan bir dizi genel kuralın ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bir spektrumda tüm piklerin sayılması her zaman mümkün olmamaktadır, hatta bu istenen bir durum da değildir. Bunun yerine parçalanmanın karakteristik şekilleri aranır. Örneğin, Şekil 3.8' deki spektrum, kütle farklılıkları 14 olan pik toplulukları şeklinde tanımlanabilir. Bu çeşit bir dizilim, düz zincirli alkanlar için çok tipiktir. Düz zincirli alkanlarda birbirine yakın karbon-karbon bağlarının kopmasıyla, kütlesi 14 birim olan CH_2 gruplarının yapıdan ayrılması sonucu bu spektrumlar ortaya çıkar. Genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları üç veya dört karbonlu parçalardır, bunlara karşılık gelen pikler en büyük piklerdir.



Şekil 3.8. n-Heptanal'in elektron impakt spektrumu. Pikler C_6, C_5, .. .Cı'e kadar, CH_2 eksilmeleriyle meydana gelen iyonların pikleridir [58].

Alkanlardaki parçalanma sonucu CH_2 grupları çıktığından dolayı pik grupları arasında 14 kütle birimlik fark çok karakteristik olarak şekildeki örnekte de görülmektedir.

Alkenlerde özellikle poliolefinik bileşiklerin moleküler piki belirgin olarak görülür. Halkalı olmayan alkenlerde spektrum çözülürken çift bağın yerini saptamak zordur. Çünkü parçalanma sırasında çift bağın yeri sürekli olarak molekül içinde yer değiştirir. Halkasız

alkenlerde parçalanan gruplar arasında aklanlardaki gibi 14 kütle birimlik (CH_2) fark görülür.

Arenlerde (aromatik halkalılar), aromatik halka moleküler iyonun kararlılığını artırdığından spektrumda miktarı yüksek olarak görülür. En fazla iyonun m/e 91'de görülmesi alkillenmiş benzenin olduğunu gösterir. En kolay en büyük sübstitüent ayrılır. m/e 91'deki pik benzilik katyondan daha çok tropilyum iyonundan ileri gelir ($C_7H_7^+$). Bu yapı kararlı olduğu için 91'deki pik çok şiddetlidir. m/e 65'de görülen pik ise tropilyum iyonundan nötr asetilen molekülünün ayrılmasıdır. Mono alkil benzenlerde ise α- yerinden kopma ve hidrojenin yer değiştirmesi sonucu karakteristik bir grup pik m/e 77 ($C_6H_5^+$), 78 ($C_6H_6^+$) ve 79 ($C_6H_7^+$) görülür.

Karboksilli asitlerde ise en karakteristik pik m/e 60 iyonunun pikidir. Uzun zincirli asitlerde iki seri pik topluluğu ortaya çıkar; zincirdeki her C-C bağının kopması sonucu yük, oksijenli kısımda kalır (m/e 45, 59, 73, 87, 101, 115…) veya alkil grubunda kalır (m/e 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127). Böylece alkil grupları (m/e 27, 28; 41, 42;; 69, 70; 83, 84; 97, 98;….) bir seri pik daha verir. Fakat her grupta en büyük pik $C_nH_{2n-1}O_2$ 'ninkidir.

Aromatik esterlerde en fazla iyon (temel pik) OR ve COOR gruplarının ayrılması sonucu olur. Metil esterlerinde bu pikler M-31 ve M-59' da bulunur. Aromatik asitlerin metil esterleri oldukça büyük moleküler iyon verir. Aynı koşullar altında analizi yapılan bileşikler daima aynı şekilde parçalanır. Örneğin, genel olarak en kararlı hidrokarbon parçaları 3 veya 4 karbonlu parçalardır. Bunlara karşı gelen pikler en şiddetli piklerdir. Alkollerin ise genelde moleküler iyon pikleri çok zayıftır veya hiç gözlenmez. Ancak alkoller çoğunlukla su kaybettiklerinde $(M–18)^+$ ' de şiddetli bir pik verirler. Primer alkollerde oksijenin yanındaki C-C bağının kopması sonucu CH_2OH^+' ya ait şiddetli bir pik gözlenir.

Ayrıca referans bileşiklerin kütle spektrumları varsa, bilinmeyen maddenin kütle spektrumunu, referans maddelerin kütle spektrumları ile karşılaştırılması ile madde tanınabilir. Farkı bileşiklerin aynı spektrumu verme olasılığı, spektral pik sayısı arttıkça belirgin şekilde azalır.

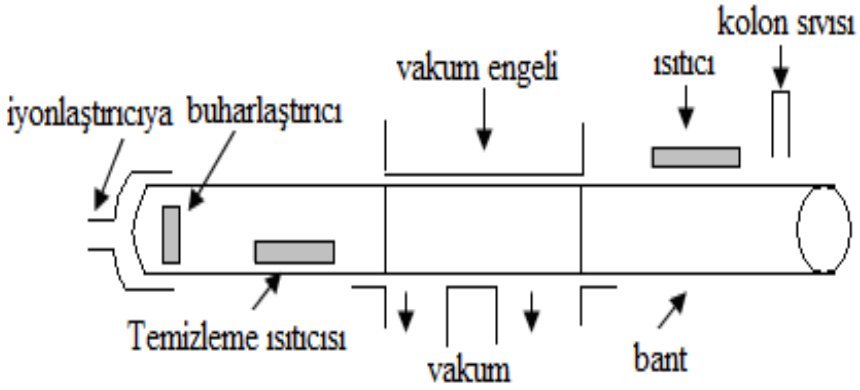
Kütle spektrum piklerinin yüksekliği ise; elektron ışınının enerjisi, örneğin ışına göre yeri, örneğin basıncı ve sıcaklığı, kütle spektrometrenin genel şekli gibi değişkenlere bağlıdır. Genellikle kaynama noktası yüksek, sıcaklığa dayanıksız maddelerin ayırımında

kullanılan sıvı kromatografide kütle spektorometresinin dedektör olarak kullanılması ayrı bir önem taşır.

Sıvı kromatografi kolonundan gelen sıvının kütle spektrometresine aktarılması sağlayan ara faz sistemi aşağıdaki sistemler kullanılmaktadır:

- ✓ Doğrudan sıvı enjeksiyonu,
- ✓ Sürekli akışlı hızlı atom bombardımanı sistemi (FAB),
- ✓ Hareketli bant sistemi,
- ✓ Termosprey,
- ✓ Elektrospray,
- ✓ Atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma sistemi (APCI) dir.

Tablo 3.4' de bazı HPLC/MS ara faz sistemlerinin (Şekil 3.9) karekteristikleri gösterilmiştir. Tabloda sistemler arası önemli farklar görülmektedir. Akış hızı, iyonlaştırıcı türü, tayin edilebilen minimum kütle ve minimum tayin sınırı tabloda verilmiştir.



Şekil 3.9. HPLC/MS hareketli bant ara faz sistemi [57].

Doğrudan sıvının enjekte edilebildiği sistemlerde kimyasal iyonlaştırıcı kullanılırken diğerlerinde farklı sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Diğer taraftan hareketli bant sisteminde ancak kaynama noktası 170 ^{0}C olan maddelere uygulanabilmektedir. Ayrıca hareketli faz sistemi kompleks bir teknik sisteme sahiptir ve kullanılması zordur.

Tablo 3.4. Bazı HPLC/MS ara faz sistemlerinin karakteristikleri [57].

Özellik	Doğrudan enjeksiyon	Hareketli bant	Termosprey	APCI	Sürekli FAB
Hız (ml/dk)	0.01-0.05, 0.2-2.0	1-2	1-2	1-2	0.005-0.01
İyonlaştırıcı	CI	EI/CI/FAB	TSP/CI	APCI	FAB
Kütle aralığı (minimum)	130	50	120	150	-
Tayin sınırı (ng)	1-10	10-20	5-10	1-10	10-50

En çok kullanılan ara faz sistemi termospreydir. Ancak her madde için uygun değildir. Kimyasal iyonlaştırıcı (CI) kullanıldığı için fragmantasyon az olur ve madde yapısı hakkında yeterli bilgi sağlanamaz. Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz: henüz sorunları çözülmüş bir LC/MS bağlantısı yapılabilmiş değildir.

3.5.4. Moleküler Kütle Spektrometrinin Uygulamaları

Moleküler kütle spektrometrinin uygulamaları çok geniş ve kapsamlıdır. Kütle spektrometrinin uygulama alanları;

- ✓ Organik ve biyokimyasal moleküllerin yapılarının aydınlatılması,
- ✓ Peptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin mol kütlelerinin tayin edilmesi,
- ✓ İnce tabaka ve kağıt kromatografide ayrılan bileşiklerin tanınması,
- ✓ Polipeptit ve protein numunelerinde amino asit dizilişinin tayini,
- ✓ Kromatografi ve kapiler elektroforez ile ayrılan türlerin belirlenmesi ve teşhisi,
- ✓ Zararlı ilaçların ve bu zararlı ilaçların metabolitlerinin kan, idrar ve tükrükte belirlenmesi,
- ✓ Ameliyat sırasında hastanın nefesindeki gazların izlenmesi,
- ✓ Yarış atları ve olimpik atletlerde doping kontrolü,

- ✓ Arkeolojik numunelerin yaşlarının belirlenmesi,
- ✓ Aerosol oluşturan partiküllerin analizi,
- ✓ Yiyeceklerde pestisit kalıntılarının tayini,
- ✓ Su kaynaklarında uçucu organik maddelerin izlenmesidir.

3.6. UV-Görünür Bölge Spektrometresi

Lambert-Beer eşitliğine göre moleküllerin monokromatik ışınları absorplaması ilkesine dayanır. Şekil 3.10' da UV-Görünür bölge spektrometresinin genel şeması görülmektedir.



Şekil 3.10. UV-Görünür bölge spektrometresinin genel şekli

3.6.1. Işık Kaynakları

D_2, W, H_2 ve Xe gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Tungsten flaman lambası, görünür IR bölgede tungstenin elektrik akımıyla ısıtılmasıyla 320-3000 nm arasında siyah cisim ışıması yapar. İyot veya brom buharı W lambasına katılırsa, lambanın ömrü artar. H_2 ve D_2 elektrikselboşalım lambalarında 5 mm Hg gibi düşük basınçta H_2 veya D_2 gazı 40 V' luk doğru akım uygulanarak 180-380 nm' de ışık yayılabilir. D_2, H_2 lambasından daha pahalı, daha uzun ömürlü ve daha şiddetli ışık yayar. Xe ark lambası ise 150-700 nm aralığında, civa buhar lambası da UV-Görünür bölgede ışıma yapar. Kuvars 200-320 nm arasında UV ışığını geçirdiğinden; bu bölgede çalışmak için lambaların pencereleri, mercekler, örnek kaplarının duvarları ve dedektörün giriş penceresi kuvarstan yapılır. 320-700 nm arasında ise cam kullanılabilir.

3.6.2. Monokromatör

Polikromatik ışından monokromatik ışın elde eden düzeneğe denir. Prizmalar veya optik ağlar bu amaçla kullanılır. Prizmalarda monokromatik ışık eldesi (λ seçilmesi); farklı λ' daki ışığın prizmaya girişte ve çıkışta farklı miktarlarda kırılması ilkesine dayanır. Prizma ışık kaynağına göre döndürülüp, belirli bir λ' daki ışığın bir aralıktan geçerek monokromatik ışık eldesi sağlanır. Görünür bölgede cam prizmanın ayırıcılığı kuvarstan iyidir.

Optik Ağ: Üzerinde eşit uzaklıklarla ayrılmış ince aralıklar veya çıkıntılar bulunan bir yüzeyle etkileşen polikromatik ışık bu yüzeyden geçtikten veya yansıdıktan sonra da kırınıma uğrar. Bu tür parçalar geçirgen optik ağ veya yansıtan optik ağ adını alır. Yansıtan optik ağlarda santimetrede 1000-14000 tane çıkıntı veya aralıklar vardır ve bu ağlar 10-25 cm uzunluğundadır.

3.6.3. Dedektörler

Işık şiddetini ölçen düzeneklerdir. UV görünür bölgede kullanılabilen farklı dedektör vardır.

Fotovoltaik dedektörler, ışık Se veya Si gibi bir yarıiletken tarafından absorplandığında iletkenlik bandına geçen e- lar nedeniyle bu yarıiletkenle temasta olan bir metal filmi (Ag) arasında bir gerilim farkı oluşur.

Fotoiletken dedektörlerde, PbS, CdSe, ve CdS gibi yarıiletkenler tarafından ışık absorplandığında iletkenlik bandına çıkan elektronlar ışık şiddeti ile orantılı bir elektrik akımı oluşturur.

Fototüp dedektörlerde, alkali metal oksit filmlerden yapılan fotokatodlar üzerine düşen fotonlar bu yüzeyden e^- koparır ve e^-'‘ lar bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir.

Fotoçoğaltıcı tüp dedektörlerde, fotokatod yüzeyinden foton çarpması ile fırlatılan e^-'‘ lar dinot denilen yüzeylere doğru elektriksel alanda hızlandırılır ve dinoda çarpan her e^- dinot yüzeyinden 3-5 e^- daha koparır. Böylece sayıları giderek artan e^-'‘ lar sonunda bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir. Bu dedektörlerin duyarlı oldukları

λ aralığı da farklıdır. Daha hızlı bir dedektör olan fotodiyot dizisi ile birçok λ' da aynı zamanda ve çok hızlı bir biçimde ölçüm yapılabilir.

3.7. Bazı Analitik Terimler

Hatalar: Deneysel hatalar sistematik ve rastgele olarak sınıflandırılabilir. Sistematik hatalar belirli hata olarak adlandırılırlar ve düzeltilebilirler. Rastgele hatalar ise belirsizdir ve düzeltilemezler standart sapma ile verilirler, analiz sırasında sınırlama getirirler.

Mutlak Hata: Ölçümle ilgili belirsizliğin sınırlarının bir ifadesidir.

Mutlak hata = Ölçüm değeri - Doğru değer

Bağıl Hata: Mutlak hata büyüklüğünün ilgili ölçümün büyüklüğü ile karşılaştırılmasının ifadesidir.

Bağıl hata = Mutlak hata / Doğru değer X100

Standart Sapma (S): kesinliğin ölçüsü olan standart sapma verilerin ortalama değer etrafında hangi yakınlıkta kümelendiklerini ifade eder. 20 den az ölçüm için,

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{ortalama})^2}{n-1}}$$

20 den fazla ölçüm için eşitliğin paydasındaki n-1 yerine sadece n alınır. Standart sapma ne kadar küçük ise veriler ortalama etrafında o kadar merkezlenmiştir.

Bağıl standart sapma: $\%RSD = (\frac{s}{x_{ortalama}}) * 100$ eşitliğiyle verilir.

Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection) (LOD): LOD, kullanılan yöntemlerin duyarlıklarını ifade eder. Bu ifade farklı yöntemlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Genellikle, kör değerin standart sapmasının 3 katı LOD olarak alınır. Kalibrasyon grafiğinin x ekseniyle olan açısının 45 dereceden farklı olması durumunda, IUPAC tarafından gözlenebilme sınırının belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler verilmiştir.

$LOD = \frac{3s}{m}$, m: Çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tayin sınırı (Limit of Quantification) (LOQ) : Kullandığımız alet ile belirleyebildiğimiz minimum madde miktarı değeridir. Bu ifade farklı aletlerin performanslarının karşılaştırılmasında kullanılması yanında analiz sonrasında elde edilen sonucun doğruluğunu da yansıtmaktadır. IUPAC tarafından tayin sınırının belirlenmesi için aşağıdaki eşitlikler verilmiştir.

$$LOQ = \frac{10s}{m}$$

m: Çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi.

3.8. Literatürde Antosiyaninler ile İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Chandra ve arkadaşları (2001) kiraz meyvesinde bulunan antosiyanin bileşiklerinin ayrılması, tanımlanması ve method validasyonuyla ilgili çalışmaları HPLC ve HPLC-MS cihazları ile yapmışlardır. Örneklerin ekstraksiyonu için % 2' lik HCl içeren metanol kullanılmıştır. Analizde uygulanan çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 0.1' lik trifloraasetik asit ve Mobil Faz 2: su/asetonitril/asetik asit/trifloraasetik asit (50.4/48.5/1/0.1), kolon olarak 150 x 4 mm, 5 µm (30 ºC' de), akış hızı 0,8 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [59].

Brito ve arkadaşları (2007) tropikal meyvelerde bulunan antosiyanin bileşikleri çalışmışlardır. Dondurulmuş örneklerden yaklaşık 100 mg tartılıp ve % 10 formik asit içeren metanolden 2 mL ekleyip 1 dk süreyle vortekslenmiştir. 20 ºC' de 10 dk santrifüjlenip aynı şekilde iki kez daha ekstrakte yapılıp tüm ekstraktlar birleştirilmiştir. Ekstraktları analizden önce % 10' luk formik asit içeren metanol ile 10 mL' ye seyreltilmiştir. Çalışmada gradient elüsyon uygulanmış, Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük metanol, kolon olarak C18 150 x 4.6 mm, 3.5 µm (20 ºC), akış hızı 1 mL/dk ile çalışılmıştır [60].

Bilusu ve arkadaşları (2009) kırmızı üzüm, çilek, kiraz ve vişne gibi doğal meyve sularında bulunan antosiyanin bileşiklerinden siyanidin-3-glikozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glikozit, pelargonidin-3-rutinozit bileşiklerinin analizlerini HPLC yöntemiyle yapmışlardır. Meyvelerin analize hazırlanma basamağında, doğal meyveler ezildikten sonra meyve suları elde edilmiş ve süzgeç kağıdından geçirilerek analiz süresine kadar dondurucuda saklanmıştır. Derin dondurucudan çıkarılan meyve suları çözüldükten

sonra meyve suyunun 3 mL' lik kısmına % 0.1' lik askorbik asit içeren 2:8 oranında su/metanol ekstraksiyon çözeltisinden 5 mL eklenip oda sıcaklığında 20 dk boyunca homojenize edilmiş ve daha sonra filtrelenip HPLC cihazıyla analiz edilmiştir. Bu çalışmada, meyve sularında bulunan siyanidin ve pelargonidin konsantrasyonları kiraz için sırasıyla 61 ve 23 mg/L, ve çilek için 2 ve 328 mg/L şeklindedir [61].

Oszmianski ve arkadaşları (2009) üç farklı çilek türünde bulunan antosiyanin bileşiklerini HPLC-DAD cihazı ile analiz etmişlerdir. Çilek örneklerine dört farklı yöntem uygulanmıştır. Bu yöntemlerden birincisi çilek örneklerine herhangi bir işlem uygulaması yapılmadan, ikinci olarak şeker ilavesi, üçüncü olarak şeker ve pektin ilavesi ve son olarak ta şeker ve askorbik asit ilavesi farklı oranlarda eklenmiştir. Çilek örneklerinin HPLC cihazı ile analizinde uygulanan çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 4.5' luk formik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük asetonitril, kolon olarak 250 x 4.6 mm, 4 µm (30 ºC' de), akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. 3 farklı çilek türü için siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği 19,9-34,0 ppm aralığında, pelargonidin-3-o-glikozit 299,4-682,0 ppm aralığında bulunmuştur [62].

Kalt ve arkadaşları (2008) dut, muz, portakal ve elma örneklerini çalışmışlardır. Taze örneklerden yaklaşık 50 g' lık kısım, % 40 asetonitril, % 40 metanol, % 20 su ve % 0.01 formik asit içeren 100 mL' lik mix karışım ile 2 dk homojenize edilip filtrelenmiştir. Katı kısma tekrardan aynı çözeltiden 100 mL eklenip aynı şekilde 2 dk homojenize edilip tekrar filtrelenmiştir. Kombine ekstraktların çözüleri döner evaporatör ile buharlaştırılıp LC-MS cihazıyla analiz edilmiştir [63].

Ek ve arkadaşları (2006) Lingonberry (*Vaccinium-vitis-idaea*) meyvesindeki fenolik bileşikleri LC-TOF-MS ve LC-MS/MS incelemişlerdir. *Vaccinium vitis-idaea* analize kadar -18 ºC' de saklanıp analizden önce oda sıcaklığında çözülerek 40 ºC' de 2 saat süreyle kurutulmuştur. Örnekler metanol ile oda sıcaklığında ekstrakte edilip 3000 rpm' de santrifüjlenmiştir. Örnekler aynı çalışma şartlarında etanol ve asetonitril çözeltisi ile de ekstrakte edilip en iyi çözücünün metanol olduğunu belirlenmiştir. LC-MS ile analizden önce örnekler 1:2 oranında ultra saf su ile seyreltilmiştir. LC-MS ile örneklerin analizinde uygulanan çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 0.1' lik formik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük metanol, kolon olarak C18 50 x 2 mm, 3 µm (30 ºC de), enjeksiyon hacmi 10-20 µL, akış hızı 0,3 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [64].

Elisia ve arkadaşları (2007) böğürtlen meyvesindeki siyanidin-3-glikozit ve toplam antosiyanin bileşiklerini tayin etmişlerdir. Böğürtlen örnekleri % 80' lik etanol ile ekstrakte edilmiştir. Kalıntıya % 80' lik etanolden 25 mL ilave edilip ekstrakte edilmiştir ve filtrelenen katı kısıma % 80' lik etanolden 150 mL eklenerek 4000 rpm' de 1 saat süreyle santrifüjlenmiştir. Kalıntıya tekrar % 80' lik etanolden eklenip gece boyunca ekstrakte edilmiştir. Süzüntüler birleştirilerek döner evaporatörde buharlaştırılmış ve son olarak 0.45 µm' lik enjeksiyon filtresinden geçirilmiştir. LC-MS ile çalışma şartları, Mobil Faz 1: % 100' lük metanol ve Mobil Faz 2: %3' lük formik asit, kolon olarak 250 x 4.6 mm, 5 µm (30 ^{0}C), akış hızı 1 mL/dk uygulanarak gradient çalışılmıştır [65].

Seeram ve arkadaşları (2006) çilek örneğinde bulunan antosiyanin bileşiklerini LC-ESI-MS ile analiz etmişlerdir. Çilek örneğinden alınan 975 g lık bir kısım % 0.1 HCl içeren metanol yada aseton:su (7:3) ile ayrı ayrı homojenize edilip santrifüjlenmiş ve süpernatan kısımları düşük ısıda konsantre edilmiştir. Çilek ekstrakları asidik metanol (1:1) ile çözülmüş ve HPLC-MS' de analiz edilmiştir. LC-MS cihazında uygulanan şartlar; Mobil faz 1: % 100' lük asetonitril ve Mobil Faz 2: % 1' lik formik asit, kolon olarak C18 250 x 4.6 mm, 5 µm (25 ºC) , akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [66].

Sarıburun ve arkadaşları (2010) ahududu ve böğürtlen meyvelerinde toplam antosiyanin miktarını belirlemişlerdir. Çalışmada farklı iki ekstraksiyon tekniği denenmiştir. 5 g meyve örneği 40 mL metanol-10 mL 6 M HCl içeren ve 40 mL su-10 mL 6 M HCl ile 80 mg askorbik asit ilavesiyle 16 saat süreyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlar evaporatörde 3 mL kalıncaya kadar buharlaştırılıp 0.45 µm' lik enjeksiyon filtresinden geçirilmiştir. Fenolik bileşiklerin analizi HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiş ve toplam antosiyanin için pH farkı yönteminden yararlanılmıştır. Ahududu meyvesinin farklı kültürlerine ait su ekstrakları 22,4-69,5 mg/100 g aralığında, metanol ekstrakları 12,4-24,8 mg/100 g aralığında, böğütlen meyvesinin farklı kültürlerine ait su ekstraktları 54,8-87,1 mg/100 g aralığında, metanol ekstraktları 41,3-52,9 mg/100 g aralığında bulunmuştur [67].

Felgines ve arkadaşları (2005) böğürtlen örneklerinde antosiyanin bileşiklerini HPLC-ESI-MS/MS ile analiz etmişlerdir. 100 g dondurulmuş böğürtlen örnekleri çözüldükten sonra homojenize edilmiştir. Homojenize edilen böğürtlen örneğinden 5 g alınıp 90 mL 0.12 M HCl içeren metanol çözeltisi ile 30 dk ekstrakte edilmiştir. Filtrasyondan sonra süzüntü hacmi 0.12 M HCl içeren su çözeltisiyle 100 mL' ye tamamlanmıştır. LC-MS ile çalışma şartları; Mobil Faz 1: asetonitril/formik asit/su

(5/2/93) ve Mobil Faz 2: asetonitril/formik asit/su (40/2/58), akış hızı 0,2 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [68].

Wu ve arkadaşları (2005) ahududu ve böğürtlen meyvelerinde antosiyanin bileşiklerinden siyanidin-3-glikozit, pelargonidin-3-glikozit, malvidin-3-glikozit, delfinidin-3-glikozit, peonidin-3-glikozit ve petunidin-3-glikozit türevlerini HPLC-ESI-MS/MS cihazında analiz ve karakterize etmişlerdir. Meyveler analize kadar derin dondurucuda saklanmıştır. Dondurulmuş meyveler analiz aşamasında metanol/su/asetik asit (85/15/0.5) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. HPLC-ESI-MS/MS cihazında çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 5' lik formik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük metanol, kolon olarak C18 250 x 4.6 mm, 5 µm, akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [69].

Watson ve arkadaşları (2004) kızılcık meyvesinde bulunan aglikonlardan peonidin ve siyanidin bileşiklerini kapiler elektroforez ve HPLC cihazı ile analiz etmişlerdir. Kızılcık örneklerinden yaklaşık 5 g alınıp 20 mL ekstraksiyon çözeltisi (% 95' lik etanol/1.5 M HCl 85/15) eklenerek santrifüjlenmiştir. Süpernatan kısımları birleştirilip 3 mL' lik süpernatana % 1 HCl içeren metanol eklenmiş ve yaklaşık 40 dk su banyosunda bırakılmıştır. Ardından soğuk su banyosunda bir süre bekletilen örnekler C18 Sep-Pak kolonundan geçirilmiştir. HPLC' de çalışma şartları; mobil faz olarak su/ACN/asetik asit/fosforik asit (70/20/7.5/1.5), kolon olarak C18 150 x 4.6 mm, 5 µm, enjeksiyon hacmi 10 µL, 1 mL/dk akış hızı ile izokrotik olarak çalışılmıştır [70].

Nado ve arkadaşları (2002) nar meyvesinde antosiyanin bileşiklerinden delfinidin, siyanidin ve pelargonidin bileşiklerini çalışmışlardır. Meyve örneği 1/20 (w/v) oranında %70' lik aseton/% 30' luk su çözeltisi ile ektrakte edilmiştir. Nar ekstraktlarını filtreledikten sonra analiz edilmiştir [71].

Nyman ve arkadaşları (2001) yaban mersini, siyah kuş üzümü, çilek ve kırmızı şarap örneklerinde bulunan antosiyanin bileşiklerinden delfinidin, siyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin ve malvidin bileşikleri HPLC cihazı ile analiz etmişlerdir. Örneklerin analize hazırlanma basamağında; 0,5 g kuru örnek, antosiyanin miktarına bağlı olarak 2 M HCl içeren metanol çözelti ile su banyosunda 50 dk süreyle hidrolize edilmiştir. Kırmızı şarabın 5 mL' lik kısmına 5 mL metanol ve 5 mL 12 M HCl çözeltisi eklenmiştir. Örneklerin hacmine bağlı olarak metanol ile son hacimleri 25-100 mL olacak şekilde tamamlanmıştır. Örnekler 0.2 µm' lik enjeksiyon filtresinden geçirilerek ve HPLC cihazında analiz edilmiştir. HPLC çalışma koşulları; Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit ve

Mobil Faz 2: % 100' lük asetonitril, kolon olarak C18 ODS-3 150 x 4mm, 3 μm (35 °C), enjeksiyon hacmi 10 μL, akış hızı 0,8 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. Toplam antosiyanin miktarı çilekte 447 mg/100 mL, siyah kuş üzümünde 0,4 mg/100 mL, yaban mersini 3 mg/100 mL ve kırmızı şarapta 26,1 mg/100 mL olarak bulunmuştur [72].

Rababah ve arkadaşları (2010) kekik, menengiç yaprakları ve nar gibi örneklerdeki toplam antosiyanin miktarını belirlemek için farklı ekstraksiyon şartlarını çalışmışlardır. Bu amaçla, farklı çözücü, sıcaklık gibi parametreler optimize edilmiştir. Örnekler metanol, % 70' lik etanol ve saf su çözücüleri ile ekstrakte edilmiştir. Her çözücü için 20 ºC ve 60 ºC' de 60 dk süreyle tarama yapılmış ve toplam antosiyanin miktarı UV spektrofotometresi ile yapılmıştır. Çözücü taramasında sırayla su, etanol ve metanol şeklinde toplam miktarda azalma görülmüş ve tüm solventlerde 60 ºC' de yüksek miktarda antosiyanin bulunmuştur. Her örnek için çözücü ve sıcaklık taramasında elde edilen en yüksek değerler; keklikotu örneği için çalışılan üç çözücü arasında, en iyi metanolde 60 ºC' de 3566,5 mg/100 g, kekik için metanolde 60 ºC' de 2419,9 mg/100 g, kırmızı menengiç için % 70' lik etanolde 60 ºC' de 925 mg/100 g, yeşil menengiç için % 70' lik etanolde 60 ºC' de 682,3 mg/100 g, mavi menengiç için % 70' lik etanolde 60 ºC' de 118,2 mg/100 g, menengiç yaprağı için metanolde 60 ºC' de 1343,5 mg/100 g, tatlı nar için metanolde 2115,5 mg/100 g ve ekşi nar için metanolde 60 ºC' de 3255,1 mg/100 g olarak bulunmuştur [73].

Sun ve arkadaşları (2007) kırmızı ahududu meyvesinde bulunan antosiyanin bileşiklerini HPLC-MS cihazı ile analizini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 60 g dondurulmuş meyve örneği homojenize edildikten sonra 1.5 M HCl-% 95' lik metanol (15/85) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Örnekler mikrodalga ekstraksiyonu ile bir süre temas ettirilip filtredikten sonra analiz edilmiştir. HPLC-ESI-MS' de çalışma; Mobil Faz 1: formik asit/su (3/97) ve Mobil Faz 2: formik asit/su/metanol (3/47/50), kolon olarak C18 250 x 4.6 mm, 5 μm, enjeksiyon hacmi 5 μL, akış hızı 0,8 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [74].

Srivastava ve arkadaşları (2010) kırmızı renkli tespih (canna) çiçeğinde bulunan antosiyanin bileşiklerinden siyanidin bileşiğinin farklı formlarını incelemişlerdir. Canna çiçeğini % 0.1 HCl içeren metanol ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle karıştırdıktan sonra süzülmüş ve kalan kalıntı % 0.1 HCl içeren methanol ile berrak çözelti kalıncaya kadar yıkanmıştır. Süzüntüler birleştirildikten sonra döner evaporatörde buharlaştırılarak konsantre örnekler % 0.01 HCl içeren metanol çözeltisinde çözülmüştür. HPLC-ESI-MS

ile çalışma şartları; Mobil Faz 1:asetonitril ve Mobil Faz 2: formik asit/metanol (1/99), kolon olarak C 8 250 x 4.6 mm, 5 µm (32 °C), enjeksiyon hacmi 5 µL, akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır [75].

Sass-Kiss ve arkadaşları (2005) vişne, kayısı ve domates örneklerinde bulunan antosiyanin ve karetonoid bileşiklerini HPLC cihazı ile incelemişlerdir. Örnekler yıkandıktan sonra homojenize edilerek santrifüj ve filtrelenme işlemlerinden sonra -20 ºC' de analiz süresine kadar saklanılmıştır. HPLC cihazında çalışma şartları; Mobil Faz 1: su/formik asit (90/10) ve Mobil Faz 2: su/formik asit/asetonitril (40/10/50), kolon olarak C 18 150 x 3.9 mm, 5 µm, akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. [76].

Jing ve arkadaşları (2007) mor mısır (*Zea mays* L.) örneğinde bulunan toplam antosiyanin, proteinler ve taninleri incelemişlerdir. Mor mısır örneğinde ekstraksiyon sıcaklığı (25 ºC, 50 ºC ve 75 ºC' de), ekstraksiyon çözücüsü (su, asitlendirilmiş su ve asitlendirilmiş etanol) gibi parametreleri incelenmiştir. 1 g mor mısır tozu için 25 mL saf su, % 0.01 HCl içeren su, % 0.01 HCl içeren etanol ile çözücü taraması gerçekleştirilmiştir. Aynı solventler ile ekstraksiyon sıcaklığı taramasıda yapılmıştır. Elde edilen toplam antosiyanin sonuçları incelendiğinde saf su ile yapılan ekstraksiyonda 50 ºC' de, asitlendirilmiş su ile 50 ºC' de en iyi sonuç elde edilmiştir. Hem sıcaklık hem de solvent dikkate alındığında en iyi sonuç saf su ile 50 ºC' de (0,94 mg/100 g) elde edilmiştir. Ayrıca HPLC ile yapılan çalışmada mor mısırda siyanidin-3-glikozit, pelargonidin-3-glikozit, peonidin-3-glikozit, siyanidin-3-molonilglikozit, pelargonidin-3-molonilglikozit ve peonidin-3-molonilglikozit bileşikleri tespit edilmiştir [77].

Dai ve arkadaşları (2009) karadut meyvesinde antosiyanin bileşiklerinden siyanidin-3-glikozit ve toplam antosiyanin miktarını, ekstraksiyon sonucu depolanma şartlarına göre incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, ilk gün ve 90. günde -80, 4 ve 25 ºC' deki depolama şartlarında değişen antosiyanin konsantrasyonu incelenmiştir. Karadut örneklerinden yaklaşık 10 g alındıktan sonra 25 mL % 0.01 HCl içeren etanol ile 30 dk karıştırılmıştır. Filtrasyondan sonra, süpernatan kısımları evaporatörde buharlaştırılıp saf su ile seyreltilmiş daha sonra 20-25 µm' lik filtreden geçirilmiştir. HPLC çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük asetonitril, kolon olarak C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm, akış hızı 1 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlardan siyanidin-3-glikozit bileşiği ilk gün maksimum miktarda (600 mg/L) iken 90. günde depolanma şartları incelendiğinde depolanma sıcaklığı arttıkça miktarın azaldığı

(589, 539, 230 mg/L) gözlenmiştir. Toplam antosiyanin miktarı ilk gün maksimum (710 mg/L) iken 90. günde depolanma şartları incelendiğinde depolanma sıcaklığı arttıkça toplam antosiyanin miktarının azaldığı (684, 621, 261 mg/L) gözlenmiştir [78].

Yan ve arkadaşları (2009) mor mısırda (*Zea mays* L.) antosiyanin bileşiklerini HPLC-MS ile analiz etmişlerdir. Yapılan çalışmada, farklı ekstraksiyon süresi, farklı ekstraksiyon sıcaklığı ve katı/sıvı taraması gibi parametreler incelenmiştir. Yaklaşık 1 g mısır örneği için 1,5 N HCl/% 95' lik etanolden (15/85) farklı katı/sıvı oranı (1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40), ekstraksiyon süresi (30, 60, 90, 120, 150, 180 dk) ve farklı ekstraksiyon sıcaklığı (20, 30, 40, 50, 60, 70 ºC) taranmiştır. Mor mısır örneği için ekstraksiyon süresi 60 dk, katı/sıvı oranı 1:30 oranında sabit bırakılarak 20-70 ºC aralığında sıcaklık taraması yapılmıştır ve maksimum antosiyanin miktarı 50 ºC de 3,95 mg/g bulunmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı 50 ºC, katı/sıvı oranı 1:30 oranında sabit bırakılarak 30-180 dk aralığında ekstraksiyon süresi taraması yapılmış ve maksimum antosiyanin miktarı 90 dk da 4,88 mg/g bulunmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı 50 ºC, ekstraksiyon süresi 90 dk olacak şekilde sabit bırakılarak katı/sıvı oranı 1:15-1:40 aralığında tarama yapılmış ve maksimum antosiyanin miktarını 1:40 oranında bulmuşlardır. Mor mısırda elde edilen maksimum antosiyanin miktarı (6,02 mg/g) 70 ºC sıcaklıkta, ekstraksiyon süresi 73 dk, katı/sıvı oranı 1/25' de elde edilmiştir. HPLC-MS çalışma şartları; Mobil Faz 1: % 0.05' lik trifloraasetik asit ve Mobil Faz 2: % 100' lük asetonitril, kolon olarak C18, 5 µm, 250x2.1 mm, enjeksiyon hacmi 10 µL, akış hızı 0,3 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. HPLC-MS ile siyanidin-3-glikozit, pelargonidin-3-glikozit ve pelargonidin-3-glikozit bileşikleri belirlenmiştir [79].

Can ve arkadaşları (2012) meyve, sebze ve ticari ürünlerde (kiraz, kayısı, vişne, nar, kırmızı lahana, havuç, domates, kırmızı biber, ticari kiraz, nar, vişne suyu vb.) bulunan antosiyanin bileşiklerinden delfinidin, siyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin ve malvidin glikozit türevlerini HPLC-DAD cihazı ile analiz etmişlerdir. Katı veya yarı katı meyve ve sebze örnekleri yaklaşık olarak 10 g tartılıp saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır. Homojenize edilen karışım 5600 rpm' de 10 dk santrifüjlenmiştir. Sıvı örneklerin (ticari meyve suları gibi) 10 mL' lik kısmı 5600 rpm' de 10 dk santrifüjlendikten sonra süpernatan kısımları 0.2 µm' lik filtreden geçirilerek HPLC-DAD ile analiz edilmiştir. HPLC-DAD' da çalışma şartları; Mobil Faz 1: su/asetonitril/formik asit 85/10/5 ve Mobil Faz 2: su/asetonitril//formik asit 35/10/55, kolon olarak C18 3 µm, 150 x 4.6 mm, 3 µm

(40 ºC), enjeksiyon hacmi 10 µL, akış hızı 0,8 mL/dk ile gradient olarak çalışılmıştır. HPLC-DAD cihazı ile farklı sebze, meyve ve ticari ürün arasından delfinidin-3-glikozit en yüksek vişnede (1111.83 µg/g), siyanidin-3-glikozit en yüksek ticari siyah havuç suyunda (75 µg/g), petunidin-3-glikozit en yüksek kirazda (1837.14 µg/g), pelargonidin-3-glikozit en yüksek kırmızı lahanada (44.83 µg/g), peonidin-3-glikozit ticari kiraz suyunda (81.45 µg/g) ve malvidin-3-glikozit kirazda (55.07 µg/g) bulunmuştur [80].

Bazı meyve ve sebzelerde bulunan antosiyanin bileşikleri ve toplam antosiyanin miktarı ile ilgili literatürde yapılan çalışmalar Tablo 3.5' te verilmiştir.

Tablo 3.5. Bazı meyve ve sebzeler için literatürde bulunan antosiyanin bileşiklerinin konsantrasyonları (ppm).

Meyve-Sebze Örneği	Antosiyanin Bileşikleri	Antosiyanin Miktarı	Kaynak
Çilek	Siyanidin-3-*o*-glikozit	20-34	62
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	299-682	
Ahududu (Su Ekstraktı)	Toplam antosiyanin	224-695	67
Ahududu (Metanol Ekstraktı)		124-248	
Böğürtlen (Su Ekstraktı)		548-871	
Böğürtlen (Metanol Ekstraktı)		413-529	
Siyah Kuş Üzümü	Toplam antosiyanin	40	72
Yaban Mersini		30	
Kırmızı Şarap		261	
Karadut	Siyanidin-3-*o*-glikozit	600	78
	Toplam antosiyanin	710	
Kırmızı Lahana	Delfinidin-3-glikozit	6.4	80
	Siyanidin-3-glikozit	37.77	
	Petunidin-3-glikozit	1837.14	
	Pelargonidin-3-glikozit	6.70	
	Peonidin-3-glikozit	12.33	
	Malvidin-3-glikozit	55.07	
Kırmızı Gül	Delfinidin-3-glikozit	19.30	
	Siyanidin-3-glikozit	14.90	
	Petunidin-3-glikozit	3.08	
	Pelargonidin-3-glikozit	0.44	
	Peonidin-3-glikozit	0.97	
	Malvidin-3-glikozit	t.s	
Nar	Delfinidin-3-glikozit	248.12	
	Siyanidin-3-glikozit	68.90	
	Petunidin-3-glikozit	338.46	
	Pelargonidin-3-glikozit	10.84	
	Peonidin-3-glikozit	1.82	
	Malvidin-3-glikozit	5.20	
Üzüm	Delfinidin-3-glikozit	4.18	
	Siyanidin-3-glikozit	2.28	
	Petunidin-3-glikozit	t.s	
	Pelargonidin-3-glikozit	1.76	
	Peonidin-3-glikozit	4.58	
	Malvidin-3-glikozit	6.53	
Siyah Havuç Suyu	Delfinidin-3-glikozit	80.08	
	Siyanidin-3-glikozit	75.73	
	Petunidin-3-glikozit	76.90	
	Pelargonidin-3-glikozit	0.79	
	Peonidin-3-glikozit	0.29	
	Malvidin-3-glikozit	0.60	
Karadut	Delfinidin-3-glikozit	2.40	
	Siyanidin-3-glikozit	53.03	
	Petunidin-3-glikozit	108.59	
	Pelargonidin-3-glikozit	9.22	
	Peonidin-3-glikozit	8.12	
	Malvidin-3-glikozit	t.s	
Kiraz	Delfinidin-3-glikozit	6.42	

	Siyanidin-3-glikozit	37.77	
	Petunidin-3-glikozit	1837.14	
	Pelargonidin-3-glikozit	6.70	
	Peonidin-3-glikozit	12.33	
	Malvidin-3-glikozit	55.07	
Çilek	Toplam antosiyanin	436	81
Kızılcık	Siyanidin-3-glikozit	45	82
Çilek (*F.chiloensis F.chiloensis*)	Siyanidin-3-*o*-glikozit	11.5	83
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	4	
	Toplam antosiyanin	22	
Çilek *(F.chiloensis F. aatagonica)*	Siyanidin-3-*o*-glikozit	43	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	168	
Çilek *(F. ananassa)*	Siyanidin-3-*o*-glikozit	303	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	204	
	Toplam antosiyanin	279	
Mor mashua 1	Toplam antosiyanin	132	84
Mor mashua 2		123	
Mor mashua 3		46	
Kızılcık suyu	Siyanidin-3-*o*-glikozit	128	85
Vişne Türü 1	Siyanidin-3-*o*-glikozit	40	86
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	14	
	Malvidin-3-*o*-glikozit	83	
	Delfinidin-3-*o*-glikozit	4	
	Peonidin-3-*o*-glikozit	1.2	
	Toplam antosiyanin	142	
Vişne Türü 2	Siyanidin-3-*o*-glikozit	66	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	60	
	Malvidin-3-*o*-glikozit	2.7	
	Delfinidin-3-*o*-glikozit	0.1	
	Peonidin-3-*o*-glikozit	0.1	
	Toplam antosiyanin	129	
Vişne türü 3	Siyanidin-3-*o*-glikozit	34	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	211	
	Malvidin-3-*o*-glikozit	14	
	Delfinidin-3-*o*-glikozit	1.6	
	Peonidin-3-*o*-glikozit	0.2	
	Toplam antosiyanin	261	
Vişne türü 4	Siyanidin-3-*o*-glikozit	45	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	154	
	Malvidin-3-*o*-glikozit	5.3	
	Delfinidin-3-*o*-glikozit	0.9	
	Peonidin-3-*o*-glikozit	0.1	
	Toplam antosiyanin	206	
Vişne türü 5	Siyanidin-3-*o*-glikozit	61	
	Pelargonidin-3-*o*-glikozit	644	
	Malvidin-3-*o*-glikozit	27	
	Delfinidin-3-*o*-glikozit	5.2	
	Peonidin-3-*o*-glikozit	1.9	
	Toplam antosiyanin	738	
Siyah Ahududu	Toplam antosiyanin	244-541	87
Kırmızı Üzüm	Toplam antosiyanin	40-990	88
Çilek	Toplam antosiyanin	64-120	89

4. MATERYAL-METOT

4.1. Kullanılan Cihazlar ve Cam Malzemeler

Yapılan çalışmada antosiyanin bileşiklerinden; delfinidin, siyanidin, pelargonidin, ve malvidin bileşiklerinin 3-*o*-glikozit türleri Agilent 1200 yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve elektrosprey iyonlaşma (ESI) başlığı kullanılarak 6110 quadropol kütle spektrometresi (MS) ile tayin edildi. Toplam antosiyanin tayinleri için Shimadzu 1601 UV spektrofotometresi kullanıldı.

Kullanılan diğer yardımcı malzemeler;

- ✓ Ultra saf su cihazı (Millipore, Direct-Q),
- ✓ Elektronik terazi (Precisa-92SM-202A),
- ✓ Ultrasonik su banyosu (Bandelin-Sonorex),
- ✓ Isıtılıcı karıştırıcı (VELP Multiposition heating magnetik stirrer),
- ✓ Santrifüj (NF 200 Nüve),
- ✓ pH metre (SCHOTT LabStar pH),
- ✓ Kolon (Inertsil ODS-3, 3µm, 4x150 mm),
- ✓ Enjeksiyon Filtresi (0.45 µL' lik),
- ✓ Enjektör,
- ✓ Vial tüp,
- ✓ Blender,
- ✓ Değişik büyüklükte erlen, mikro pipet, beher, balon joje, mezür vb cam malzemeler.

4.2. Standart Çözeltiler ve Reaktiflerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan antosiyanin standartlarından; delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit katıları Extrasynthese (Lyon, France)' den temin edildi.

Delfinidin-3-*o*-glikozit Standart Çözeltisinin Hazırlanması; HPLC saflıkta olan (% ≥95) katıdan 500 ppm' lik stok çözelti % 0.1 (w/v) HCl içeren metanol içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiden ara stok ve 0.1-200 ppm aralığında farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde yine % 0.1 (w/v) HCl içeren metanolde seyreltilerek hazırlandı**.**

Siyanidin-3-*o*-glikozit Standart Çözeltisinin Hazırlanması; HPLC saflıkta olan (% ≥96) katıdan 500 ppm' lik stok çözelti % 0.1 (w/v) HCl içeren metanol içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiden ara stok ve 0.1-200 ppm aralığında farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde yine % 0.1 (w/v) HCl içeren metanolde seyreltilerek hazırlandı**.**

Pelargonidin-3-*o*-glikozit Standart Çözeltisinin Hazırlanması; HPLC saflıkta olan (% ≥95) katıdan 500 ppm' lik stok çözelti % 0.1 (w/v) HCl içeren metanol içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiden ara stok ve 0.1-200 ppm aralığında farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde yine % 0.1 (w/v) HCl içeren metanolde seyreltilerek hazırlandı.

Malvidin-3-*o*-glikozit Standart Çözeltisinin Hazırlanması; HPLC saflıkta olan (% ≥95) katıdan 500 ppm' lik stok çözelti % 0.1 (w/v) HCl içeren metanol içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiden ara stok ve 0.1-200 ppm aralığında farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerde yine % 0.1 (w/v) HCl içeren metanolde seyreltilerek hazırlandı.

Mobil Fazın Hazırlanması; çalışmada gradient elüsyon uygulandı. Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit, Mobil Faz 2: % 100' lük metanol kullanıldı. Tablo 4.1 ve 4.2' de HPLC ve MS için uygulanan çalışma şartları verildi.

4.3. Örneklerin Temini

Elazığ ve yöresinde tüketilmekte olan kiraz (*Prunus avium* L.), çilek (*Fragaria vesca* L.) ve kızılcık (*Cornus mas* L.) meyveleri mevsiminde farklı marketlerden temin edildi. Örnekler uygun şekilde temizlendikten sonra -20 ºC' de analiz edilinceye kadar muhafaza edildi. HPLC-ESI-MS ile çalışma şartları optimize edildikten sonra örneklerdeki adı geçen antosiyanin bileşiklerinin tayini gerçekleştirildi. Yine örneklerin ekstraksiyonunda, çözücü türü, ekstraksiyon süresi, çözücü/katı oranının etkileri araştırıldı.

Tablo 4.1. HPLC ile gradient çalışma şartları

Süre (dk)	Mobil faz 1: Su/Formik Asit (%90/%10)	Mobil Faz 2: Metanol (%100)
0	% 95	% 5
20	% 40	% 60
25	% 0	% 100

Tablo 4.2. MS parametreleri için uygulanan şartlar

Kurutucu gaz akışı (L/dk)	11.0
Nebulizer basıncı (psi)	30
Kurutucu gaz sıcaklığı (ºC)	300
Buharlaştırıcı sıcaklığı (ºC)	500
	Pozitif Mod
Kapiler akım (V)	3000
Kıvılcım voltajı (µA)	6.0

4.4. Antosiyanin Bileşiklerinin HPLC-ESI-MS' de Tayini İçin Optimizasyon Çalışmaları

Antosiyanin bileşiklerinden delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile analizi için optimum şartlar her bir bileşik için ayrı ayrı belirlendi. HPLC-ESI-MS cihazı ile optimizasyon çalışmaları ve örnek analizleri boyunca Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit, Mobil Faz 2: % 100' lük metanol solventleri kullanılarak, Inertsil ODS-3, 3µm, 4x150 mm kolon ile akış hızı, fragmentasyon (parçalayıcı) voltajı, enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı gibi parametreler optimize edildi. Çalışmalarda bir parametre değiştirilirken, diğer parametrelerin optimum olarak bulunan değerleri kullanıldı. Dört bileşik için elde edilen optimum şartlar dikkate alınarak dört bileşiğide içeren standart çözeltiler hazırlandı ve bir analizde dört bileşiğin tayini yapıldı.

4.4.1. Delfinidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS İle Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

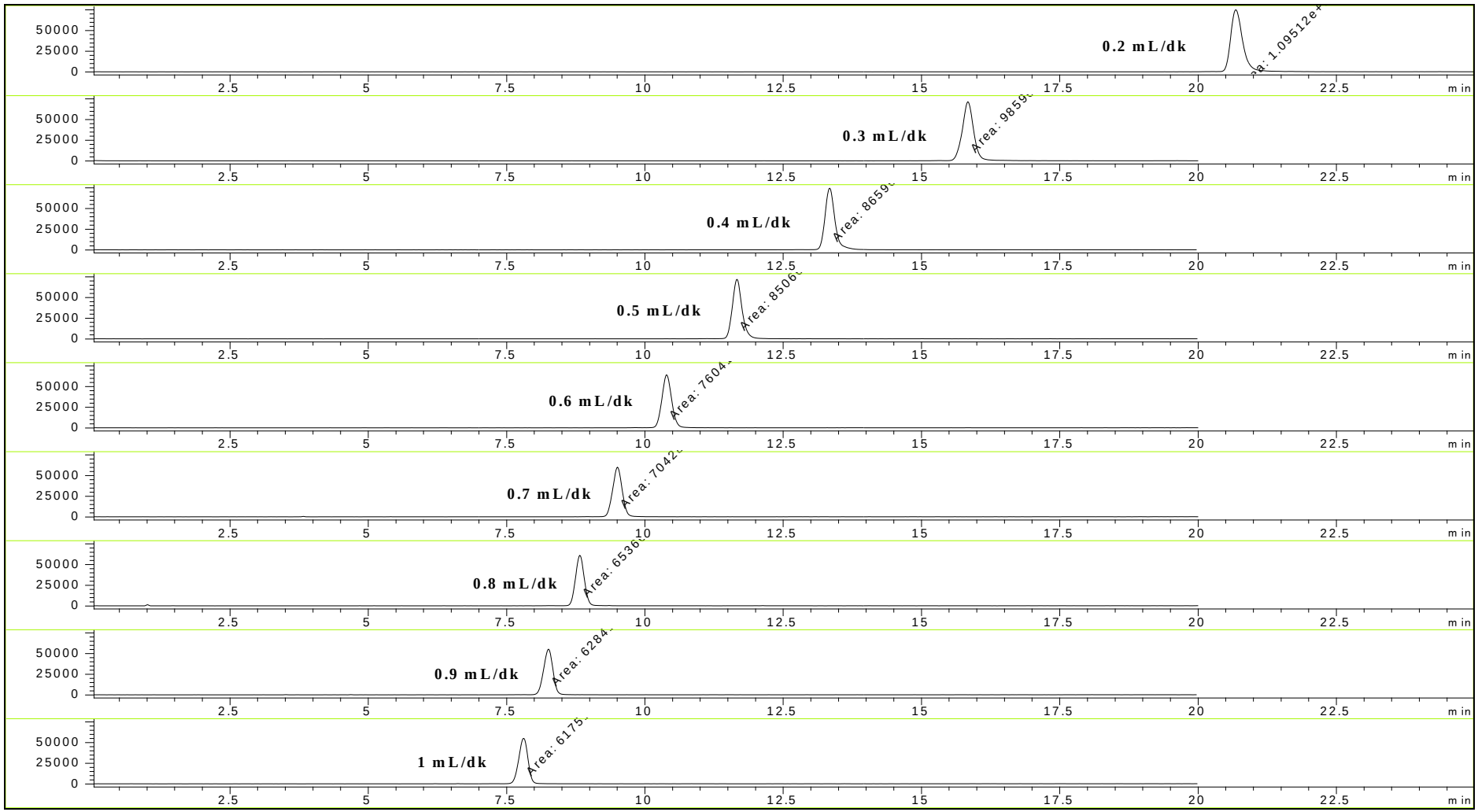
Hazırlanan 50 ppm' lik delfinidin-3-*o*-glikozit standart çözeltisi kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Öncelikle optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 mL/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrileri, alan değerleri ve kolondan çıkış süresi dikkate alınarak karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.1**)** 0.5 mL/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı.

En iyi fragmentasyon (parçalayıcı) voltajı belirlemek için yapılan deneysel çalışmalarda, 10-190 V aralığında kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için en uygun fragmentorün 110 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.2).

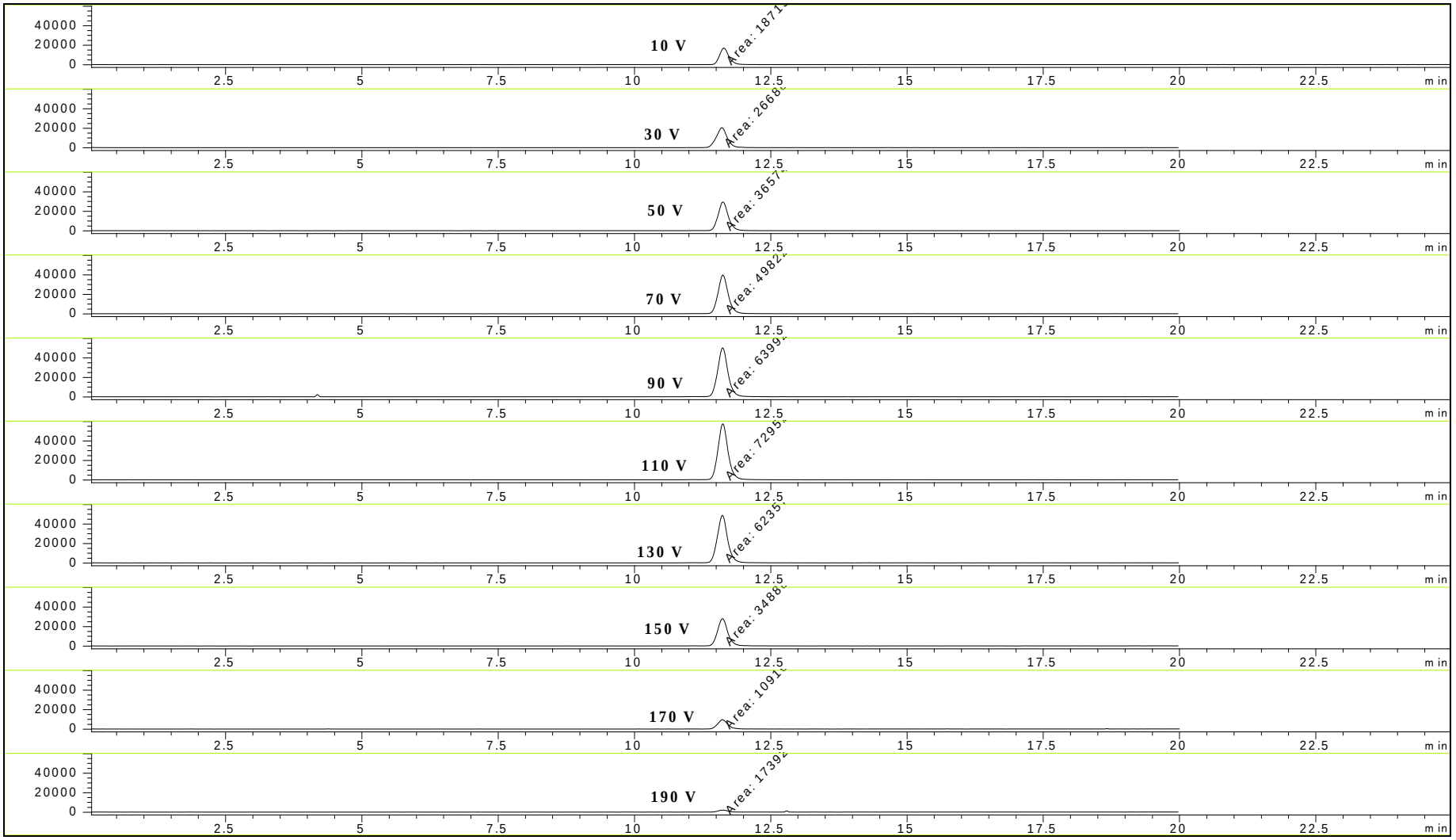
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 1–45 μL aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminde 5 μL' den sonra piklerde belirgin bir bozulma olduğu gözlendi. Pik alanı ve simetrisi dikkate alındığında enjeksiyon hacmi 5 μL olarak belirlendi (Şekil 4.3).

Uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-50 °C aralığında delfinidin-3-*o*-glikozite bileşiğine ait kromatogram ve spektrumlar alındı (Şekil 4.4). Pik alanı, pik simetrisi ve kolon çıkış süresi dikkate alındığında kolon sıcaklığı 30 ºC olarak belirlendi.

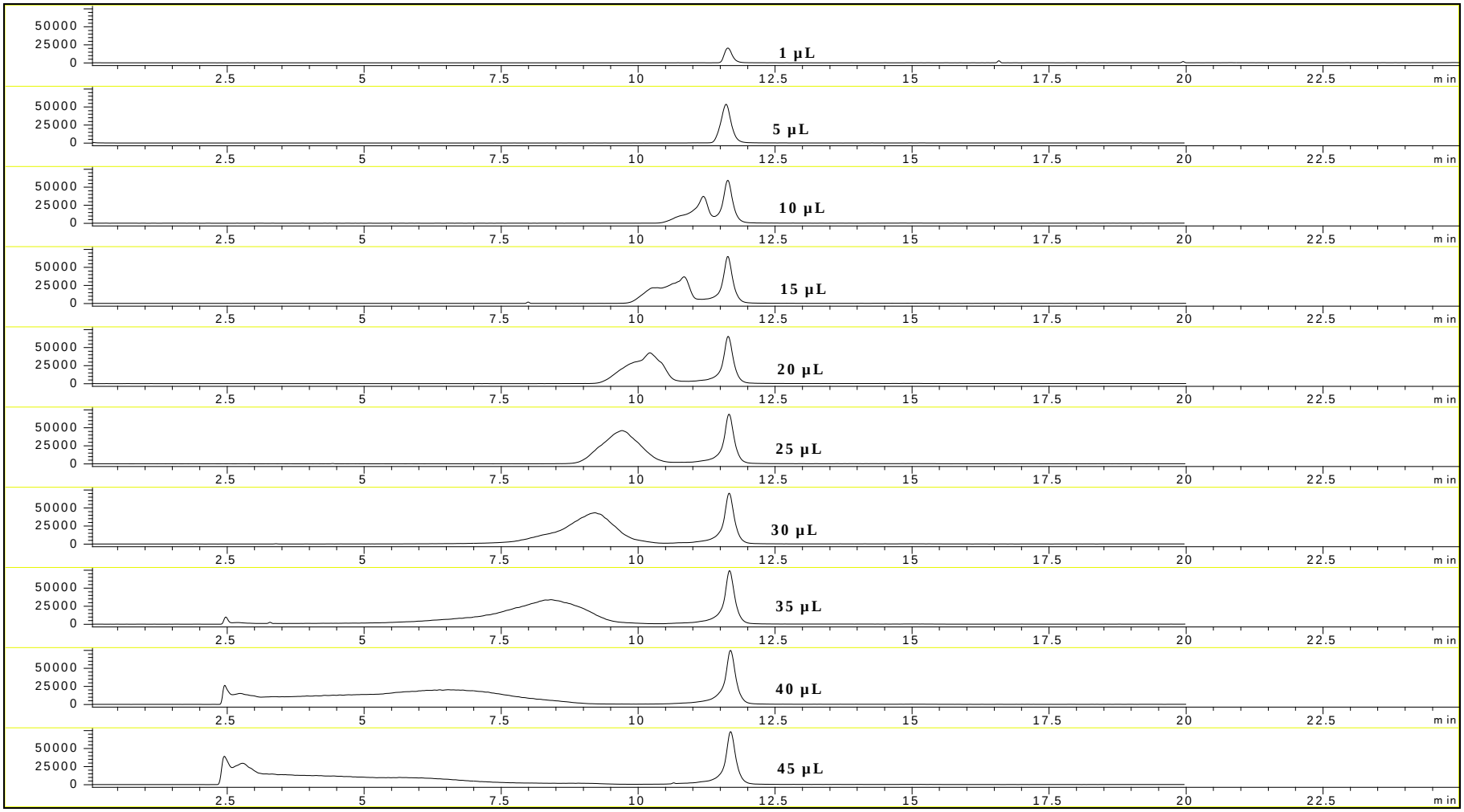
Şekil 4.5-4.6' da 0.1-7.5 ppm arasındaki standartların kromatogramları görülmektedir. Şekil 4.7' de 0.5-7.5 ppm aralığındaki kalibrasyon grafiği verildi. Şekil 4.8-4.12' de 0.5-7.5 ppm arasındaki standartların kütle spektrumları görülmektedir. Şekil 4.13' de 0.5-7.5 ppm aralığındaki MS spektrumlarına ait kalibrasyon grafiği verildi. Kütle spektrumları incelendiğinde, delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış hali olan 465.0 m/z $(M)^+$ temel piki, 466.1 m/z $(M+1)^+$ piki delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri ve delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan delfinidin bileşiğine karşılık gelen 303.1 m/z piki görülmektedir.



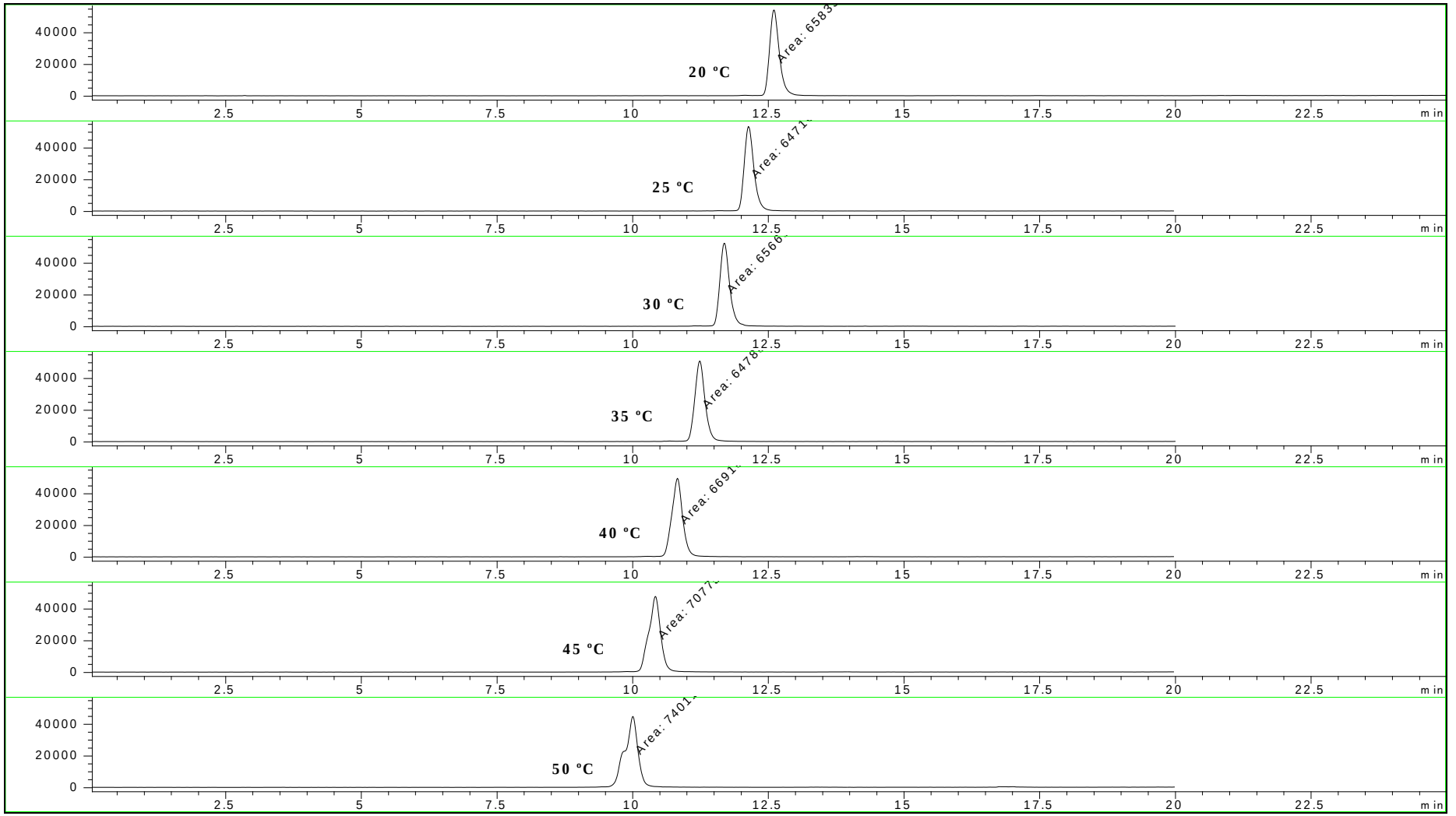
Şekil 4.1. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar



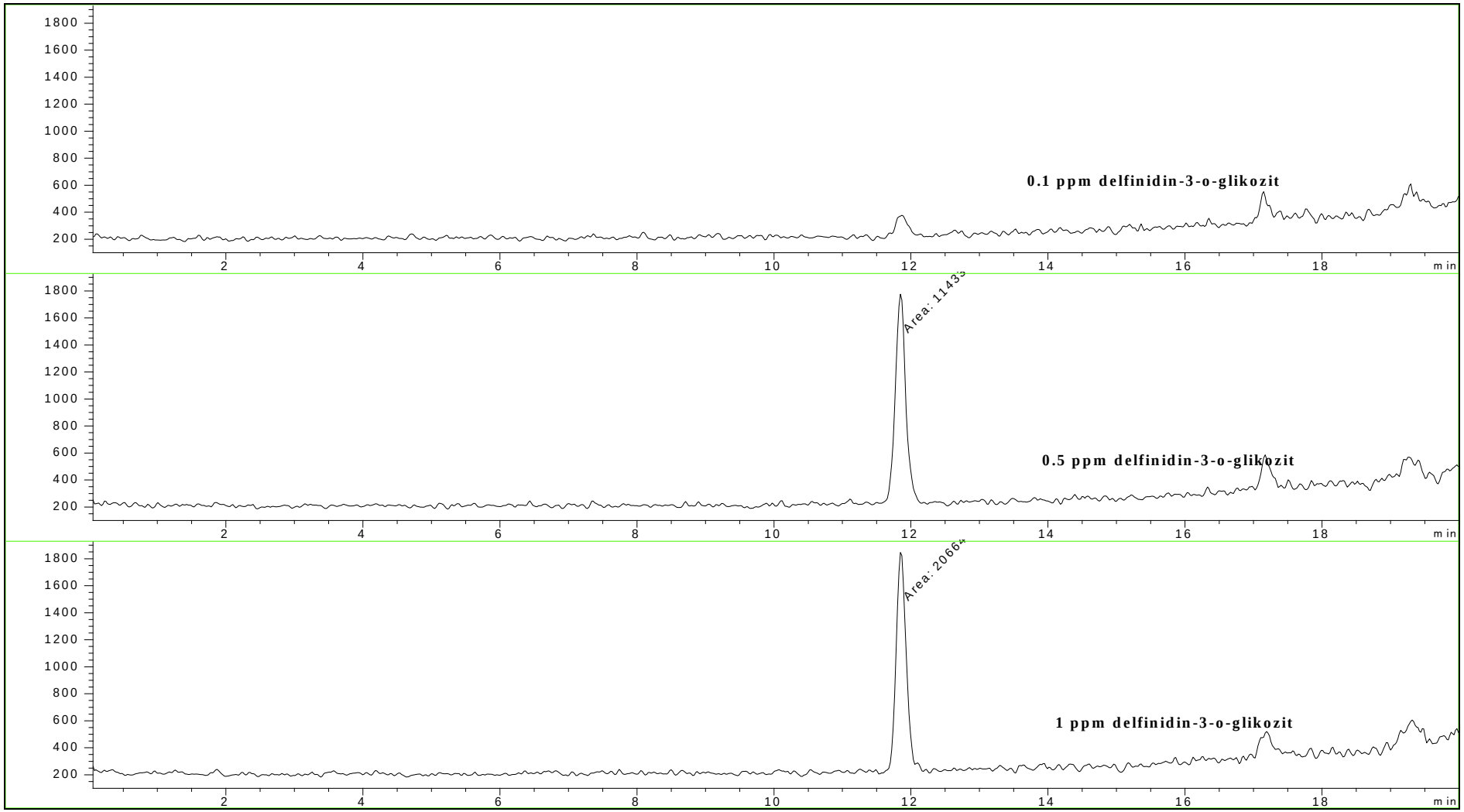
Şekil 4.2. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar



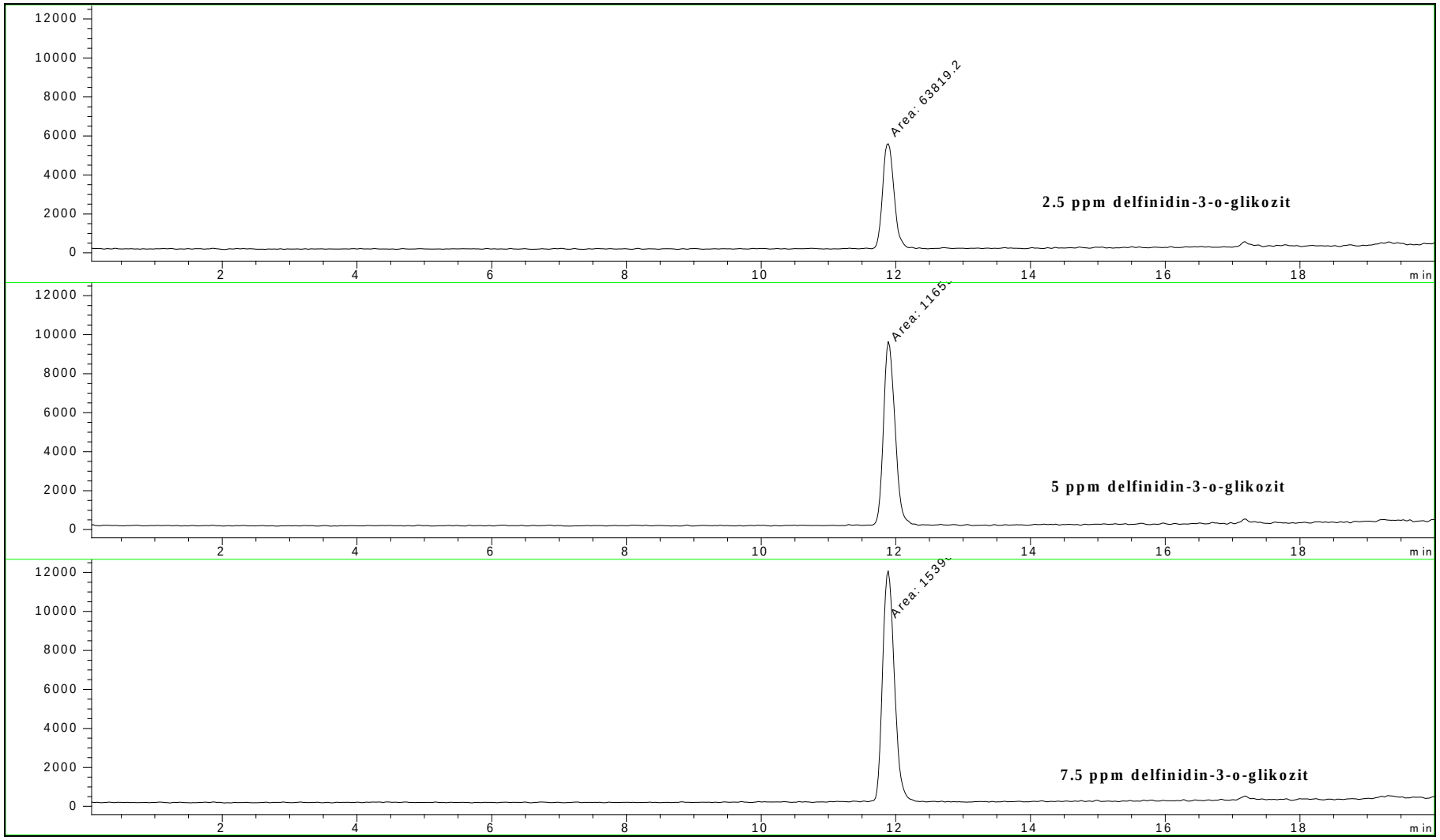
Şekil 4.3. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar



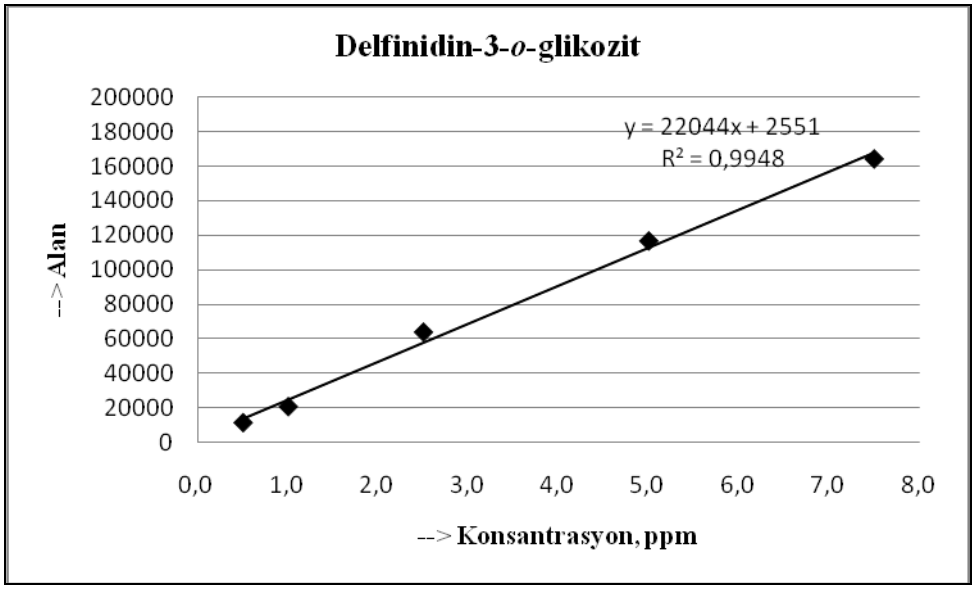
Şekil 4.4. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar



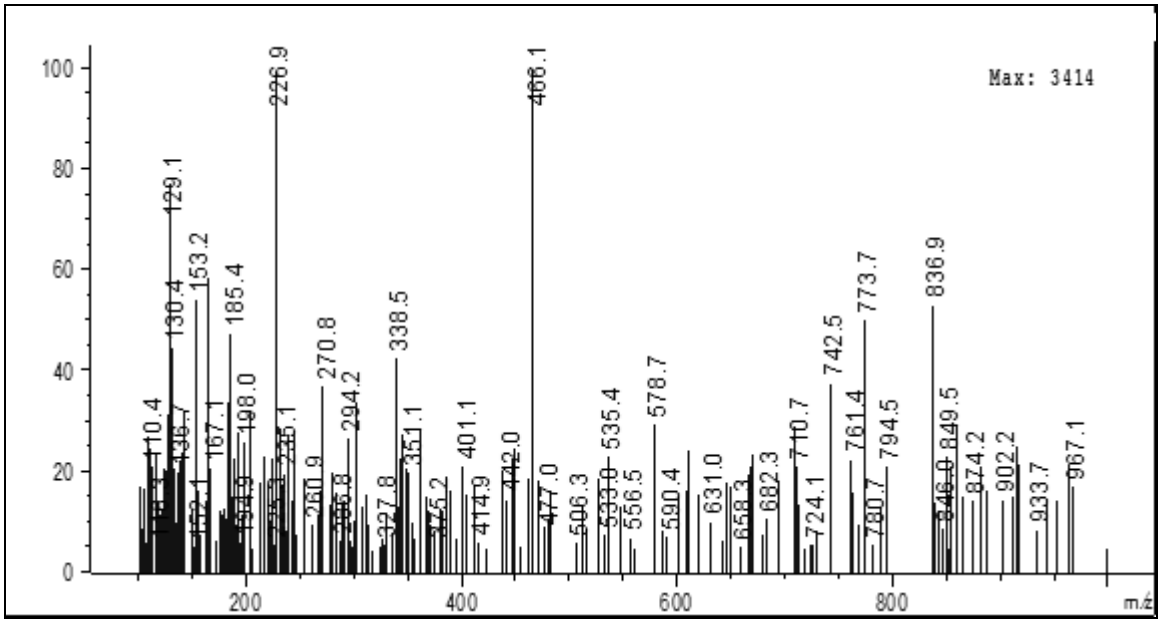
Şekil 4.5. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar



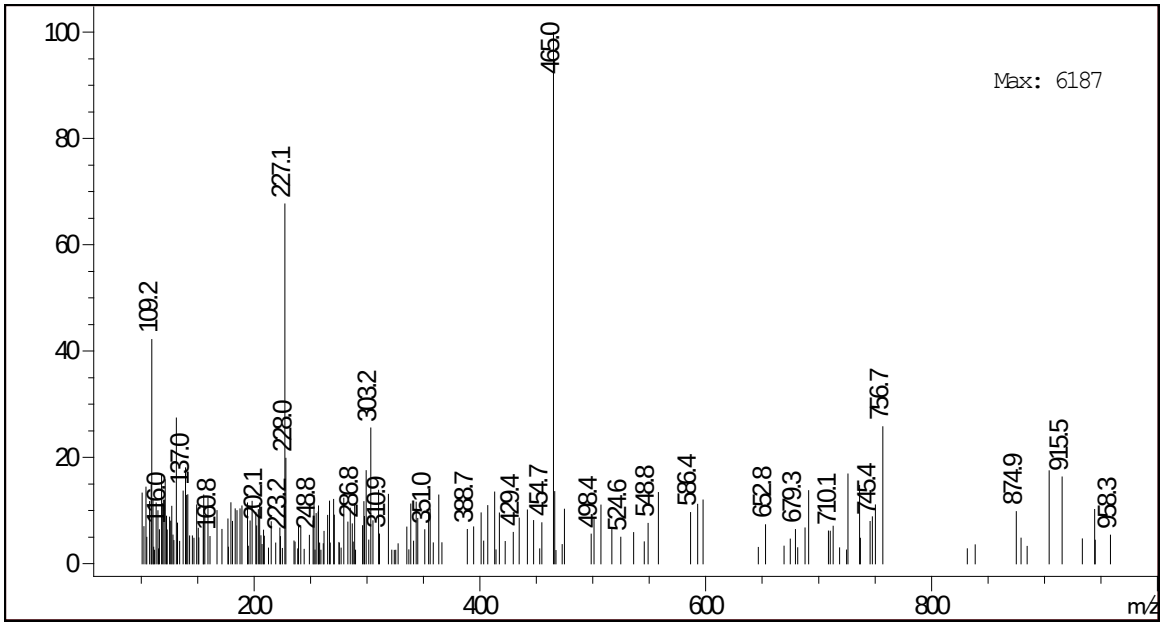
Şekil 4.6. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar



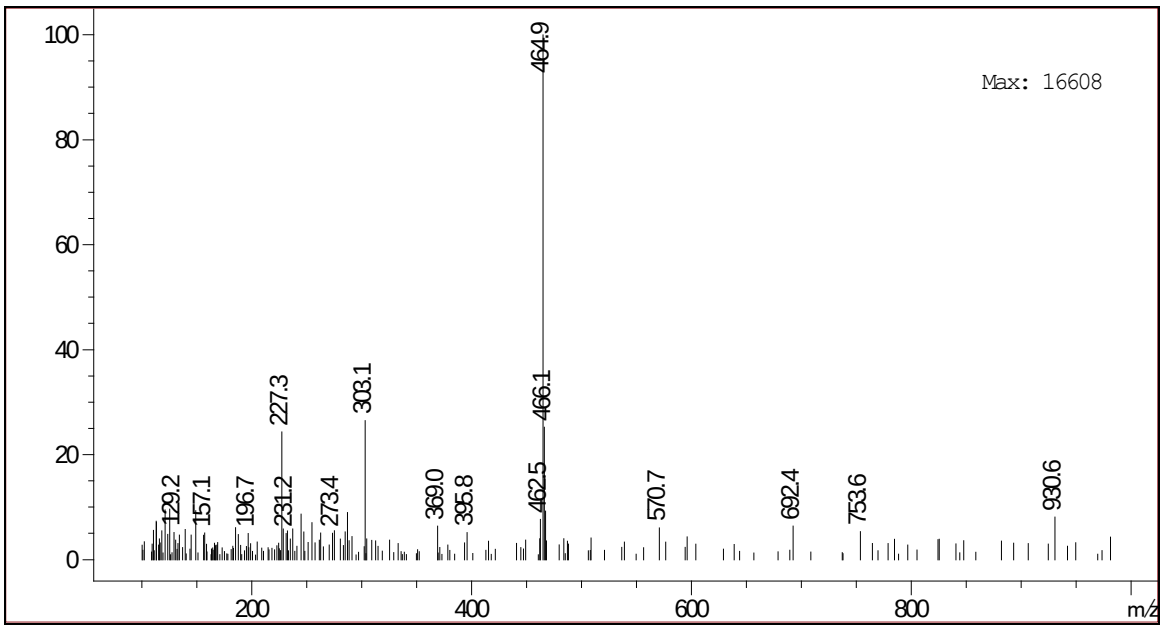
Şekil 4.7. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.5-7.5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



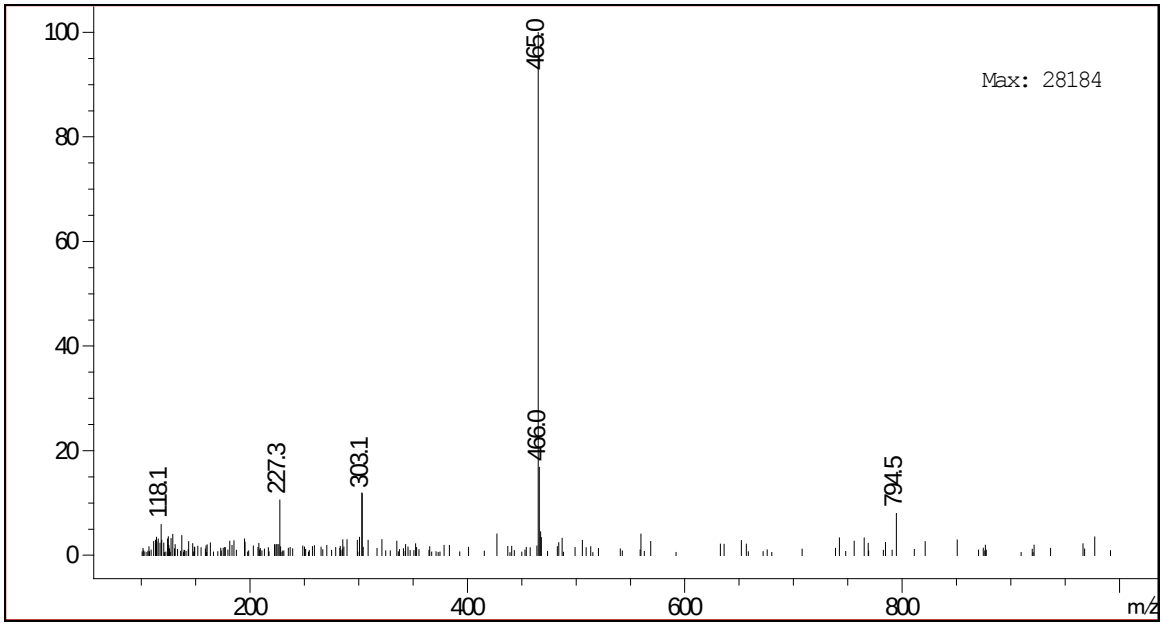
Şekil 4.8. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu



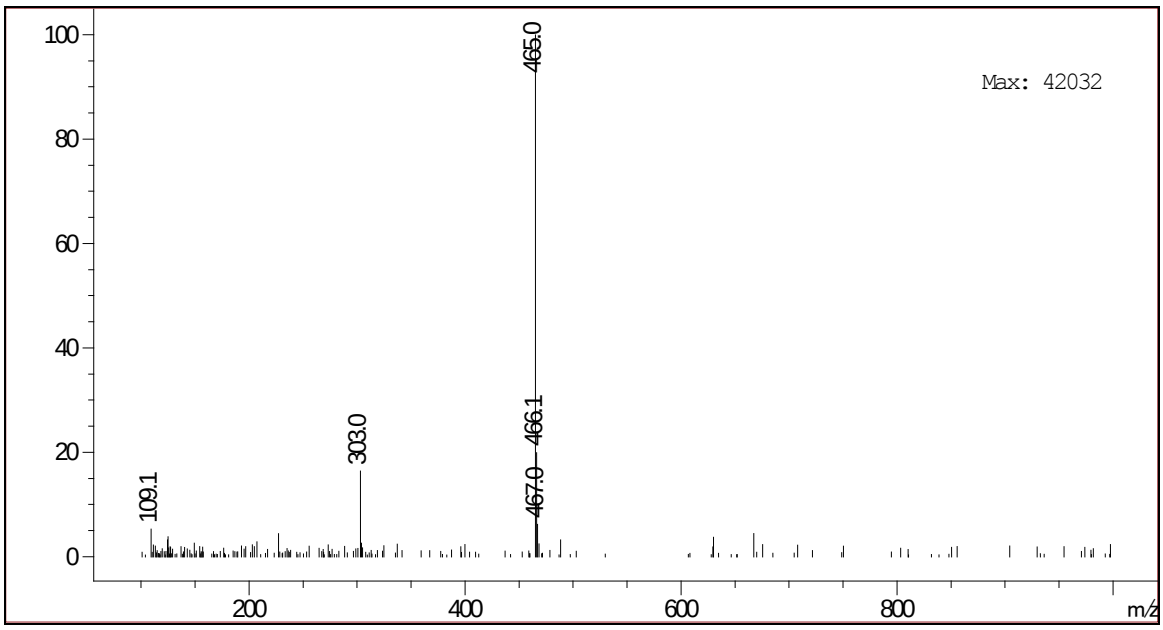
Şekil 4.9. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



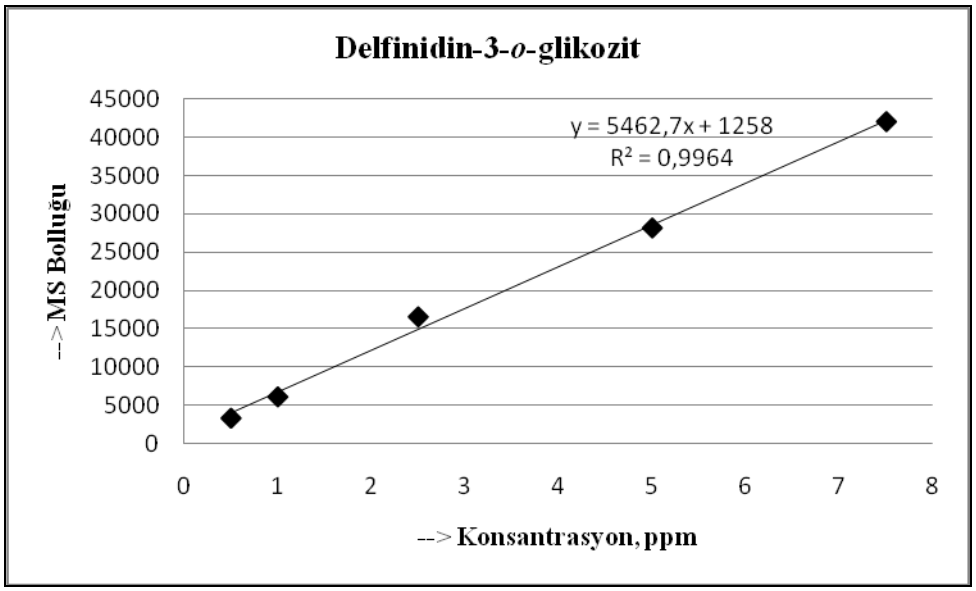
Şekil 4.10. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.11. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.12. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.13. HPLC-ESI-MS ile delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-7.5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği

4.4.2. Siyanidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS İle Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

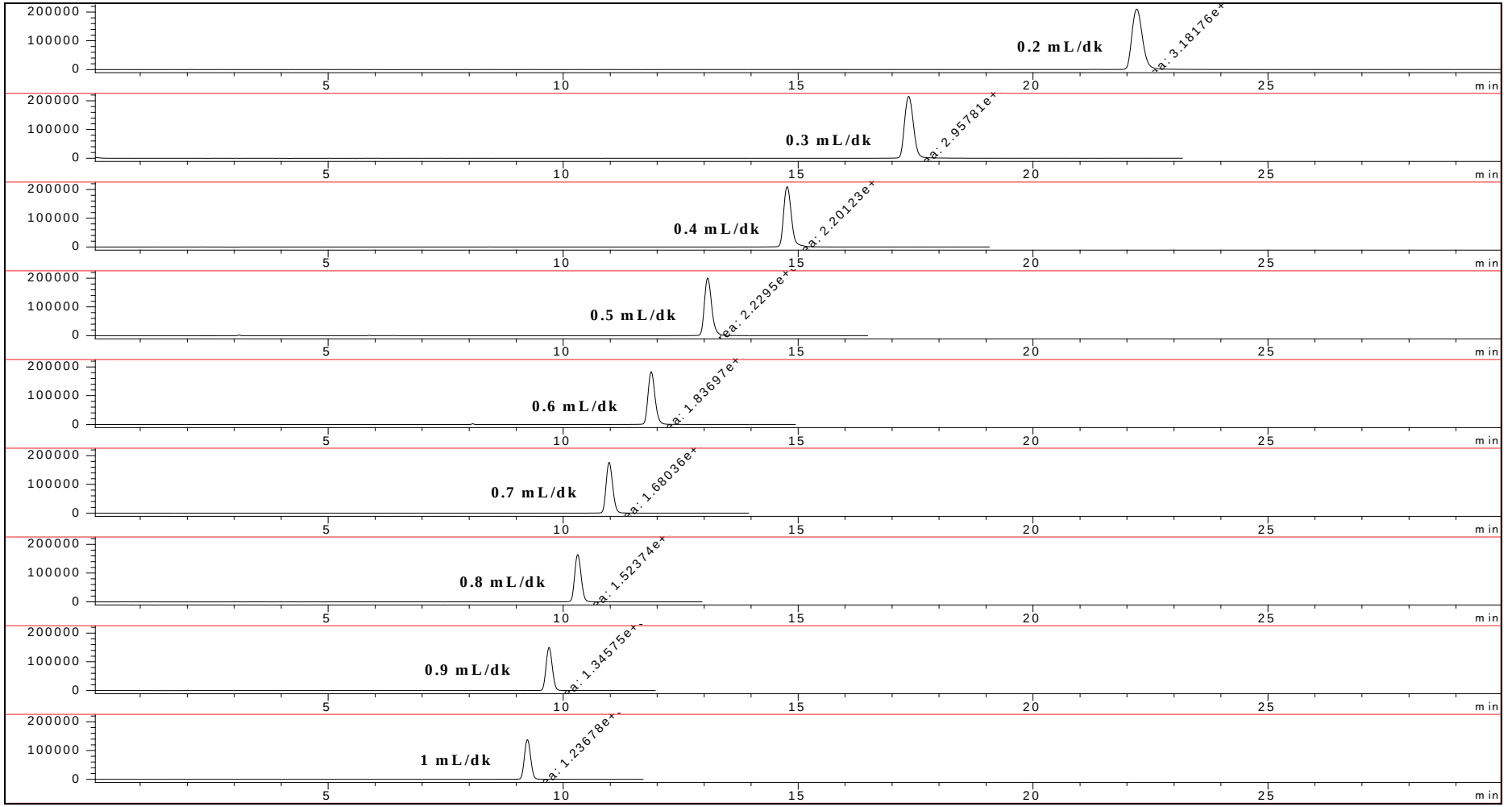
Hazırlanan 50 ppm' lik siyanidin-3-*o*-glikozit standart çözeltisi kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Öncelikle optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 mL/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrileri, alan değerleri ve kolondan çıkış süresi dikkate alınarak karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.14**)** 0.5 mL/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı.

En iyi fragmentasyon (parçalayıcı) voltajını belirlemek için yapılan deneysel çalışmalarda, 10-190 V aralığında kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, siyanidin-3-*o*-glikozit için en uygun fragmentorün 110 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.15).

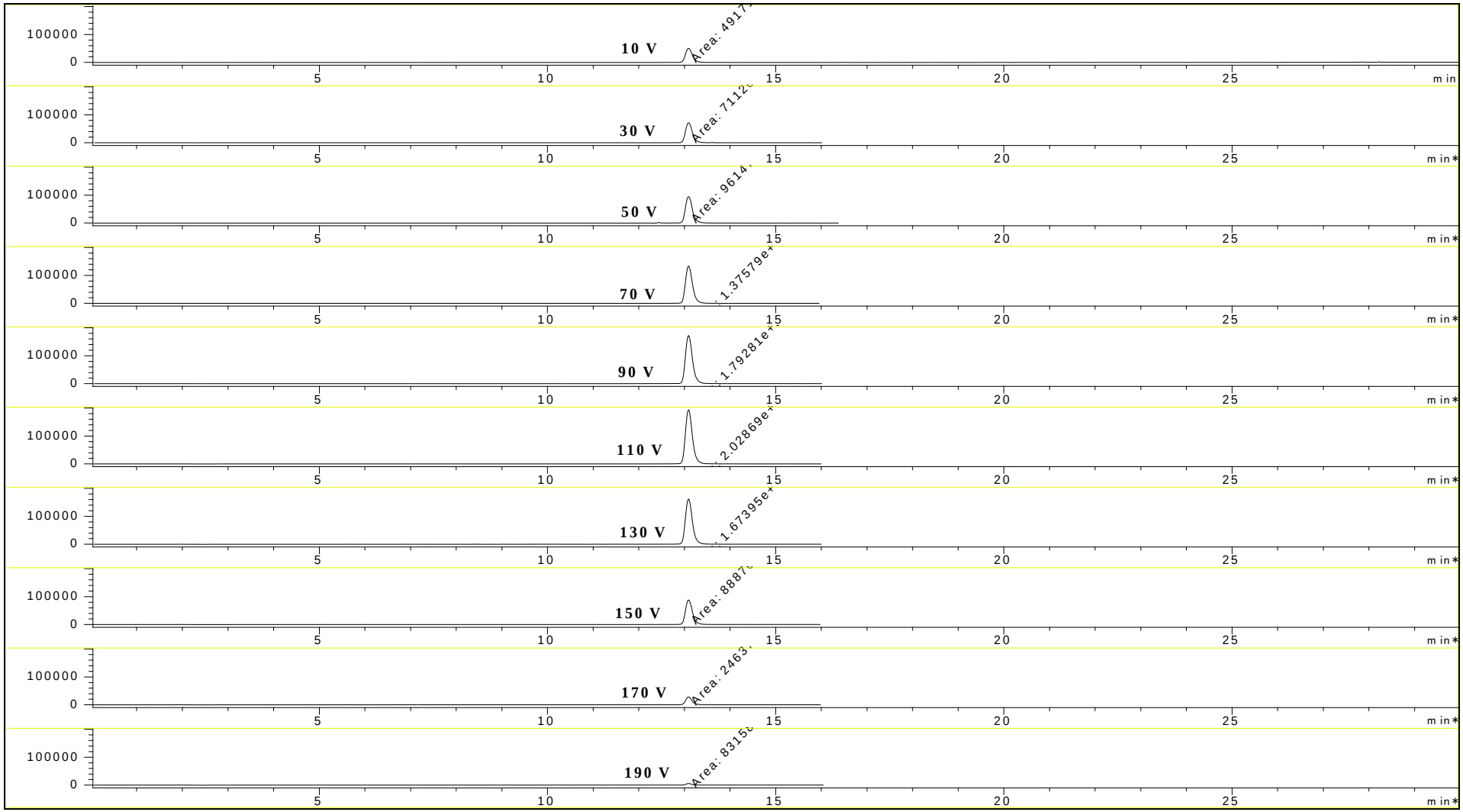
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 1–45 μL aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminde 5 μL' den sonra piklerde belirgin bir bozulma olduğu gözlendi. Pik alanı ve simetrisi dikkate alındıdığında enjeksiyon hacmi 5 μL olarak belirlendi (Şekil 4.16).

Uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-50 °C aralığında siyanidin-3-*o*-glikozite ait kromatogram ve spektrumlar alındı (Şekil 4.17). Pik alanı, pik simetrisi ve kolon çıkış süresi dikkate alındığında kolon sıcaklığı 30 ºC olarak belirlendi.

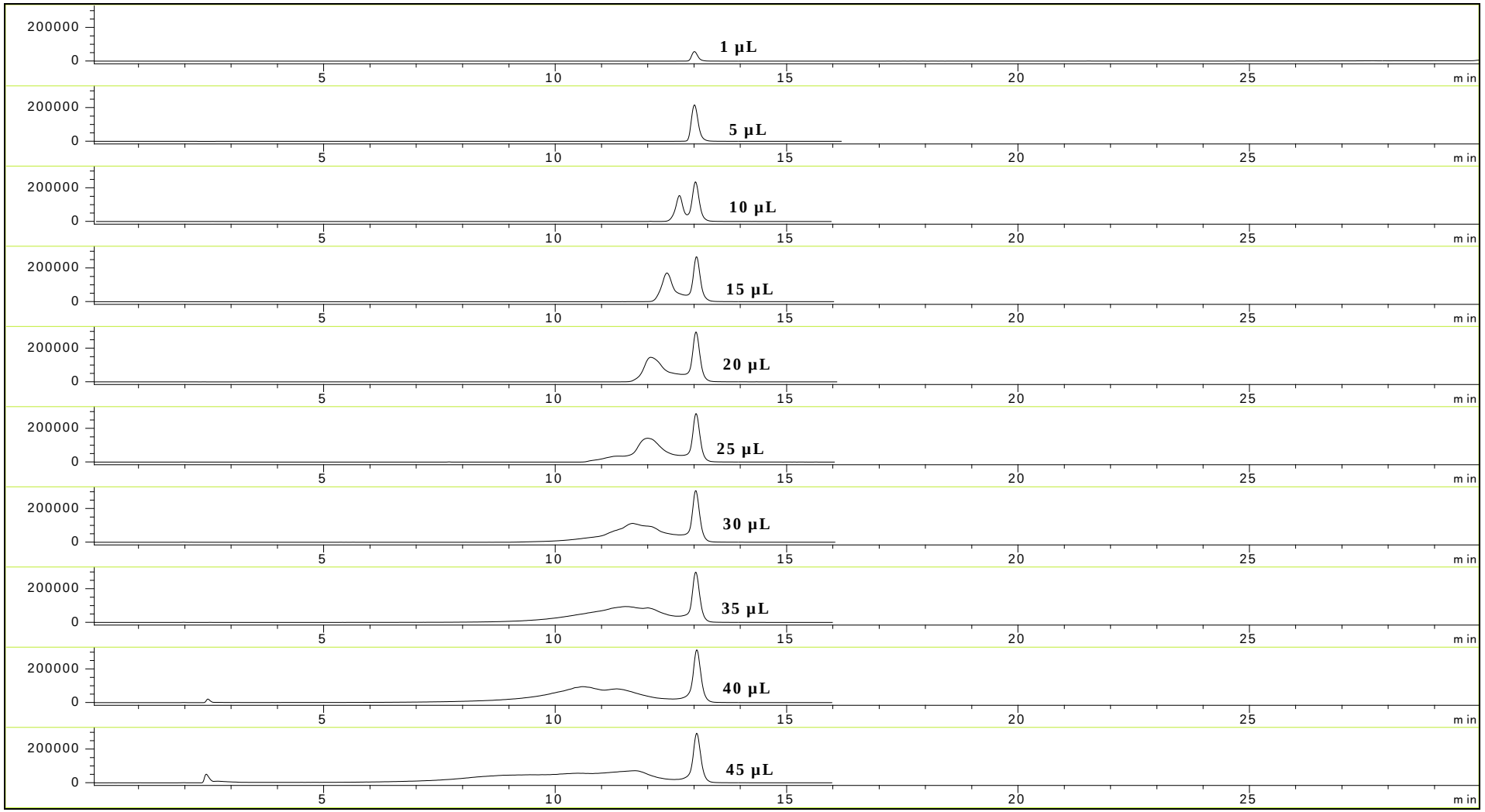
Şekil 4.18-4.20' de 0.1-50 ppm arasındaki standartların kromatogramları görülmektedir. Şekil 4.21' de 0.1-5 ppm ve Şekil 4.22' de 7.5-50 ppm aralığındaki kalibrasyon grafikleri verildi. Şekil 4.23-4.30' da 0.5-50 ppm arasındaki standartların kütle spektrumları görülmektedir. Şekil 4.31' de 0.5-5 ppm ve Şekil 4.32 ' de 7.5-50 ppm aralığındaki MS spektrumlarına ait kalibrasyon grafikleri verildi. Kütle spektrumları incelendiğinde, siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış hali olan 449.0 m/z $(M)^+$ temel piki, 450.1 m/z $(M+1)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri ve siyanidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerin kopmuş hali olan siyanidin bileşiğine karşılık gelen 287.1 m/z piki görülmektedir.



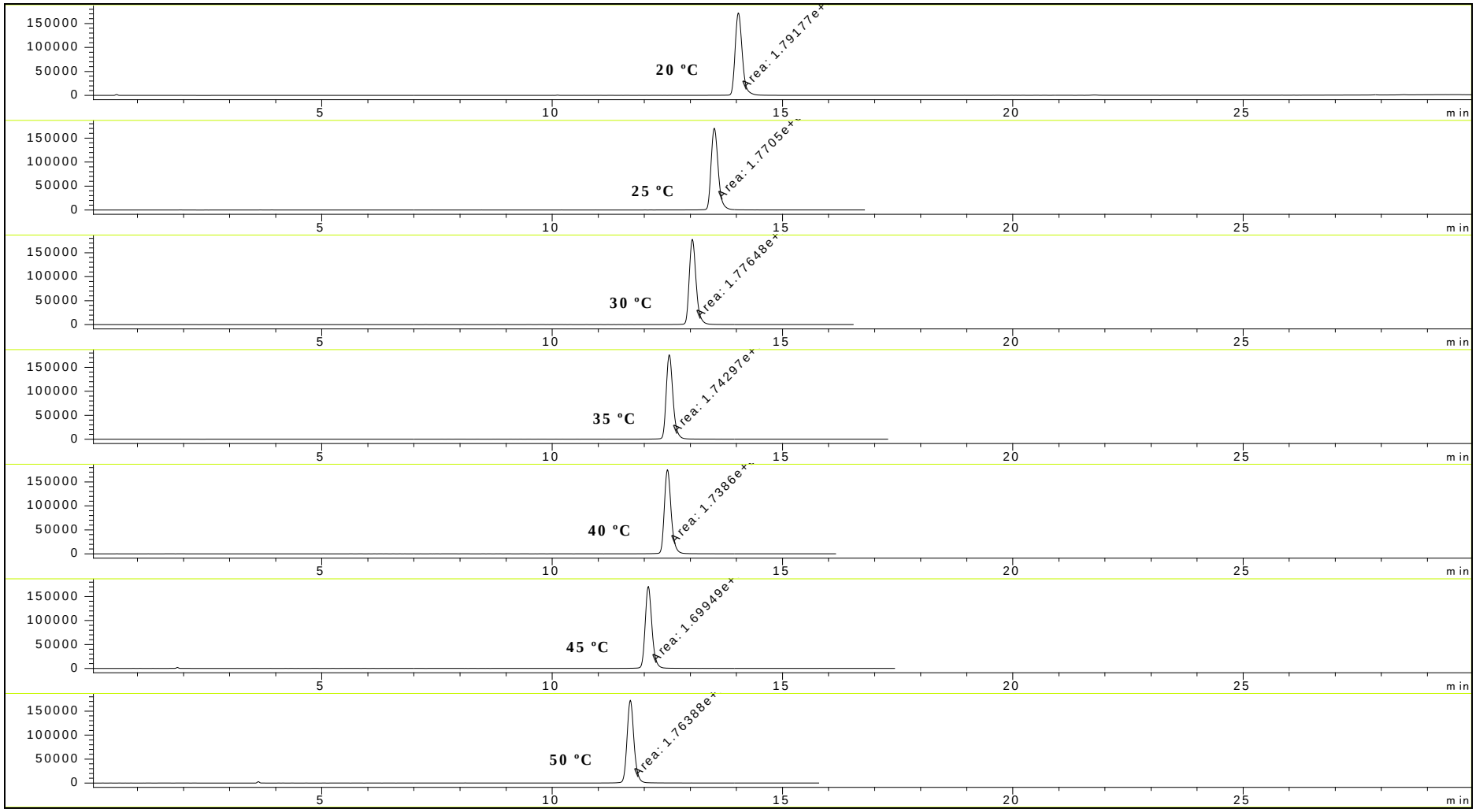
Şekil 4.14. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar



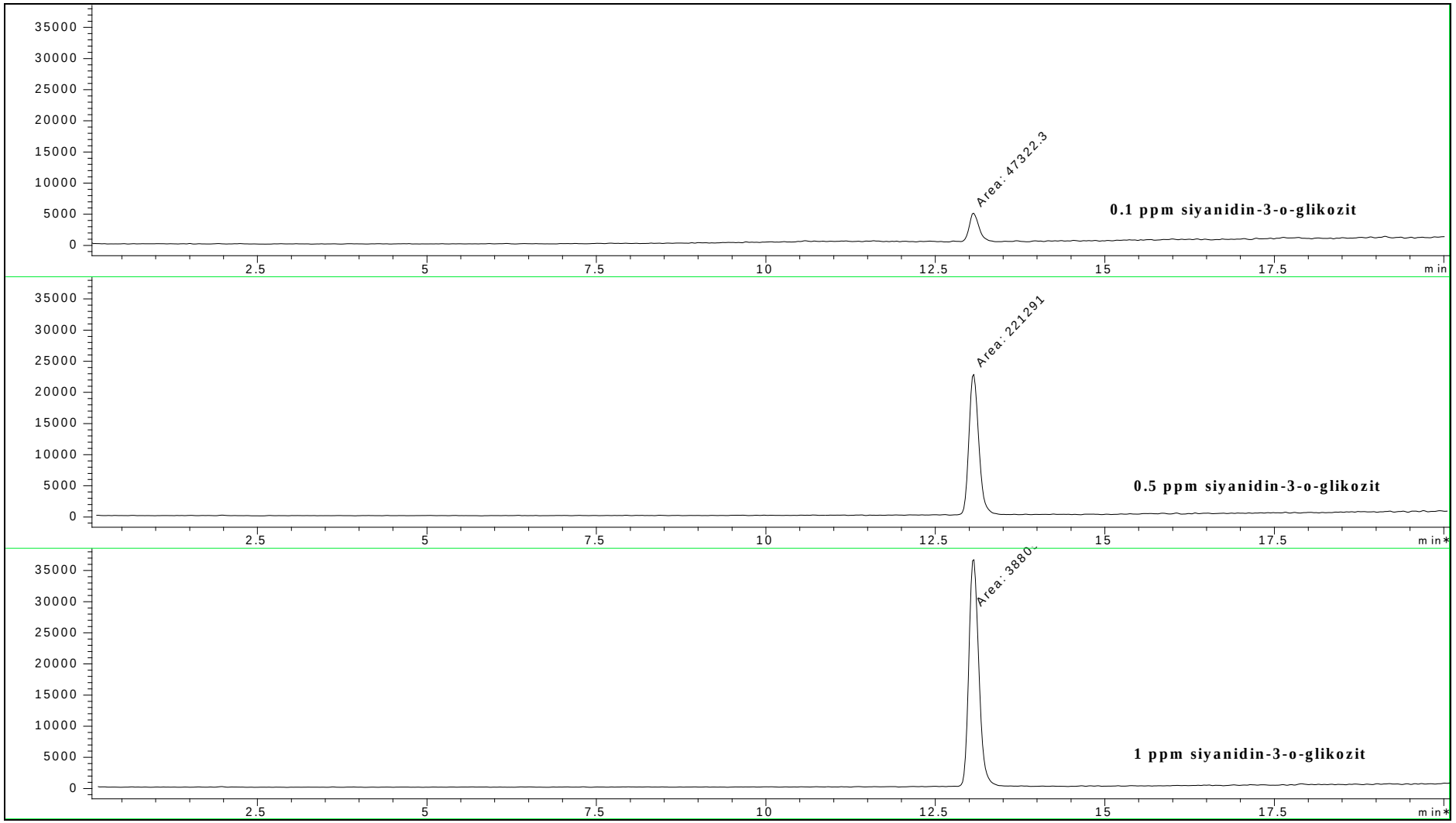
Şekil 4.15. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar



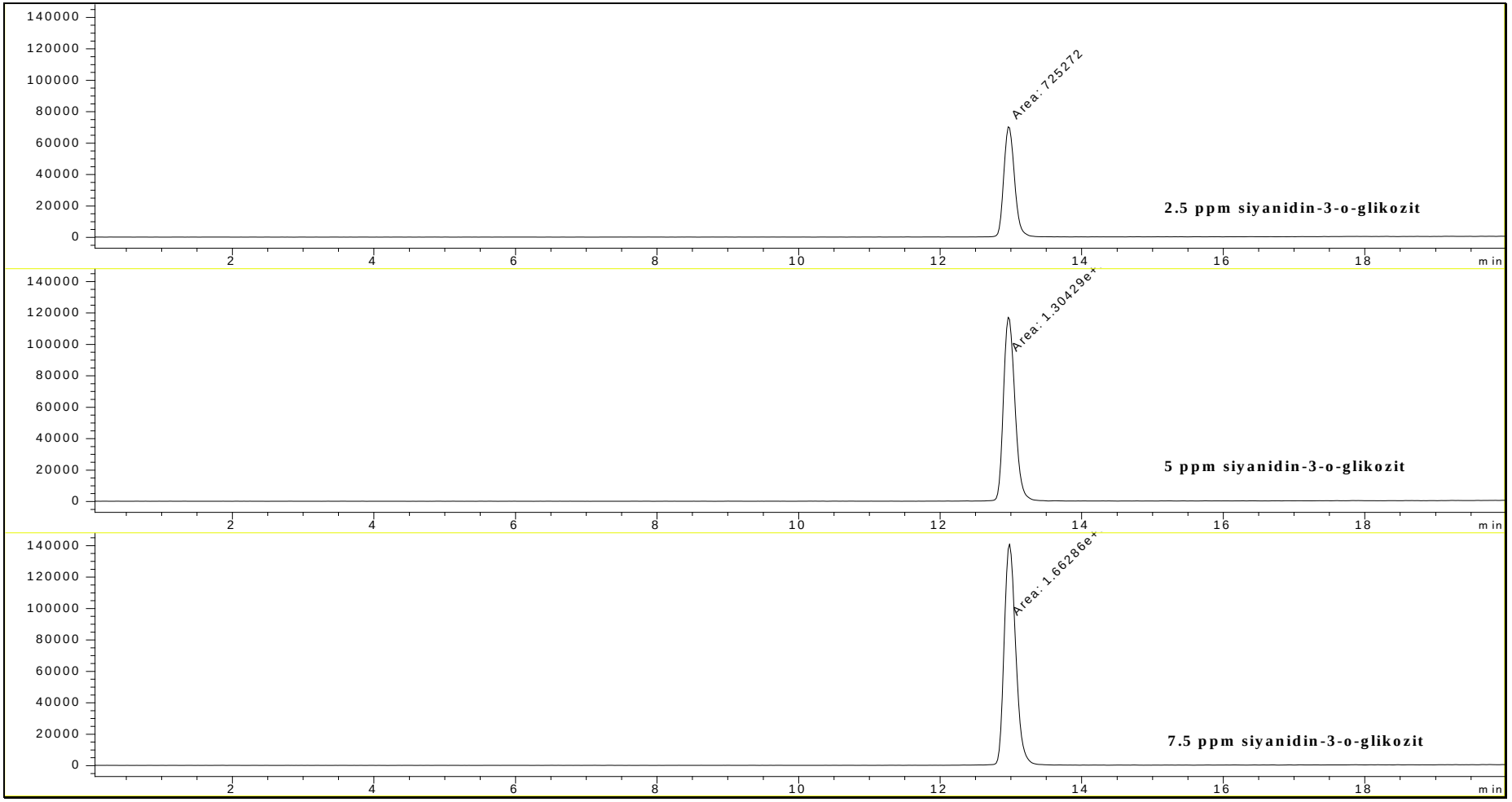
Şekil 4.16. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar



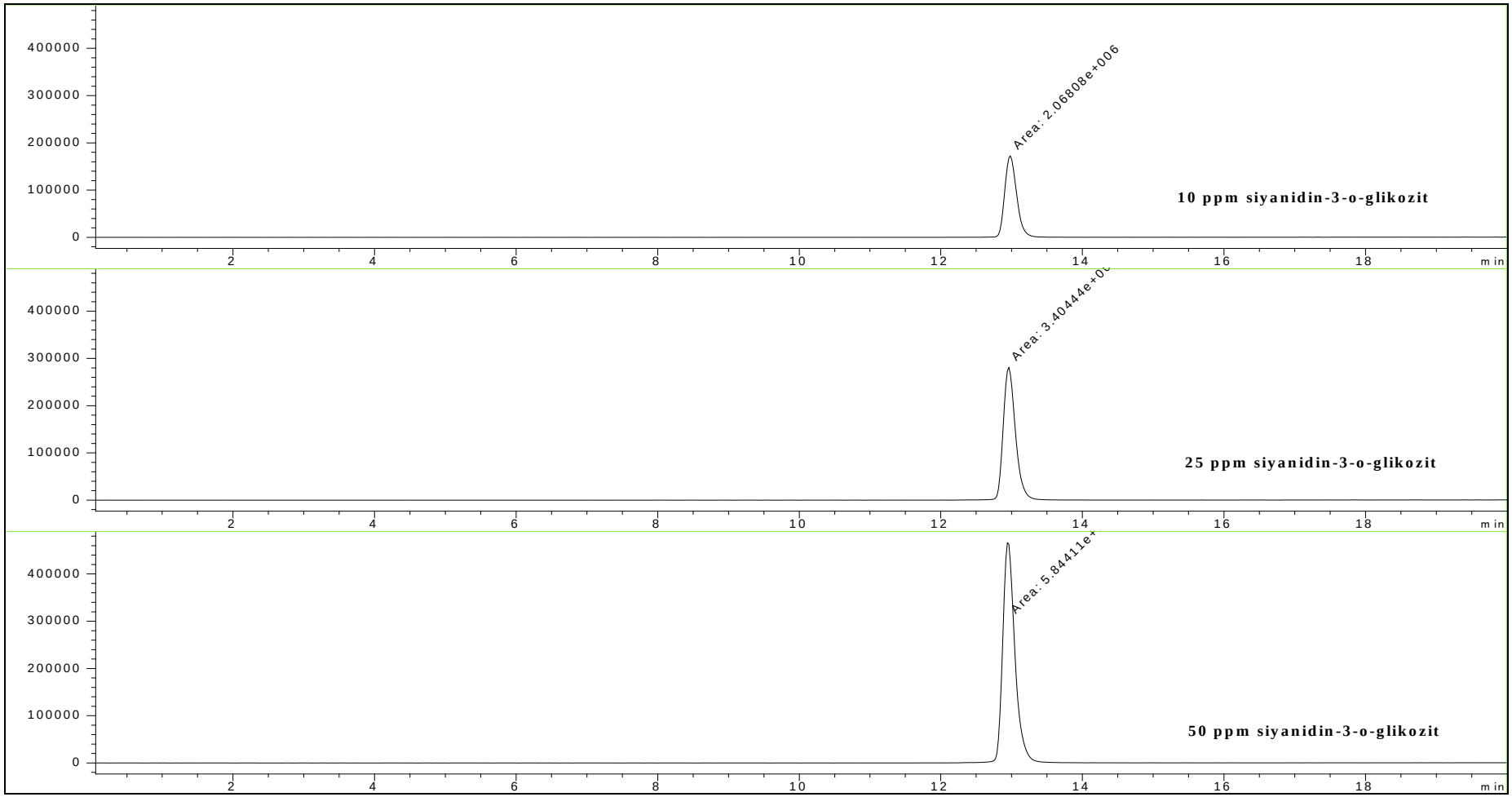
Şekil 4.17. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar



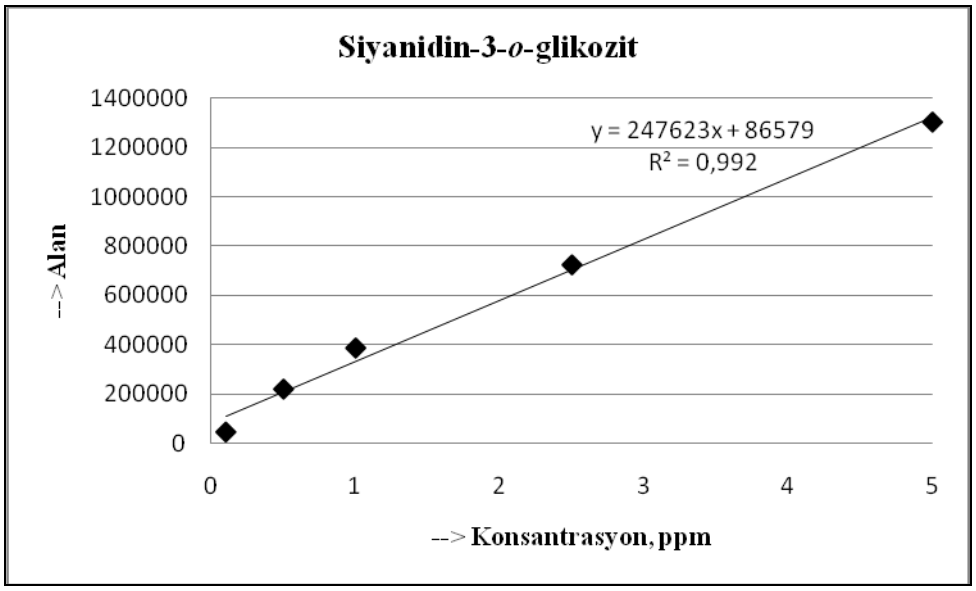
Şekil 4.18. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar



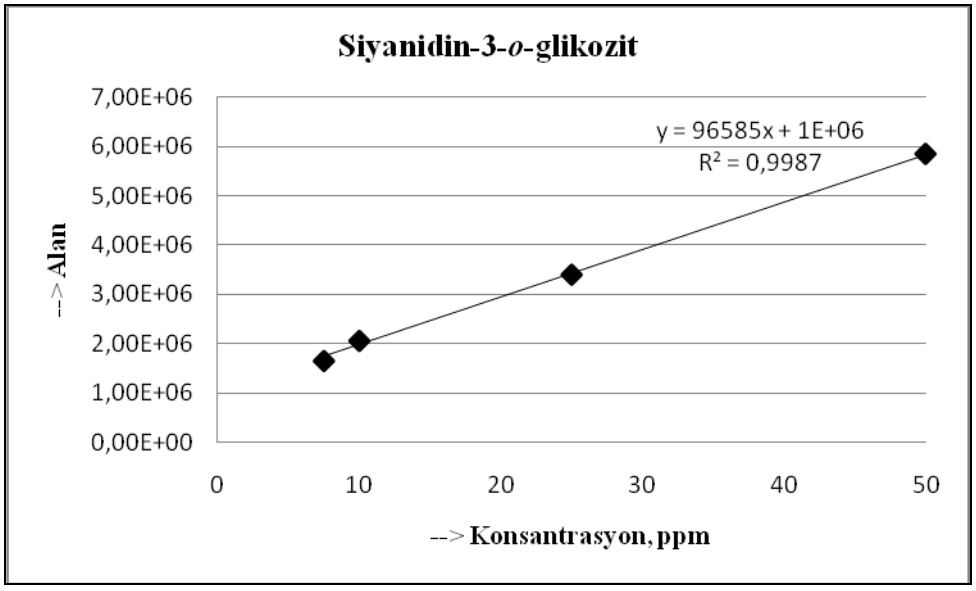
Şekil 4.19. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar



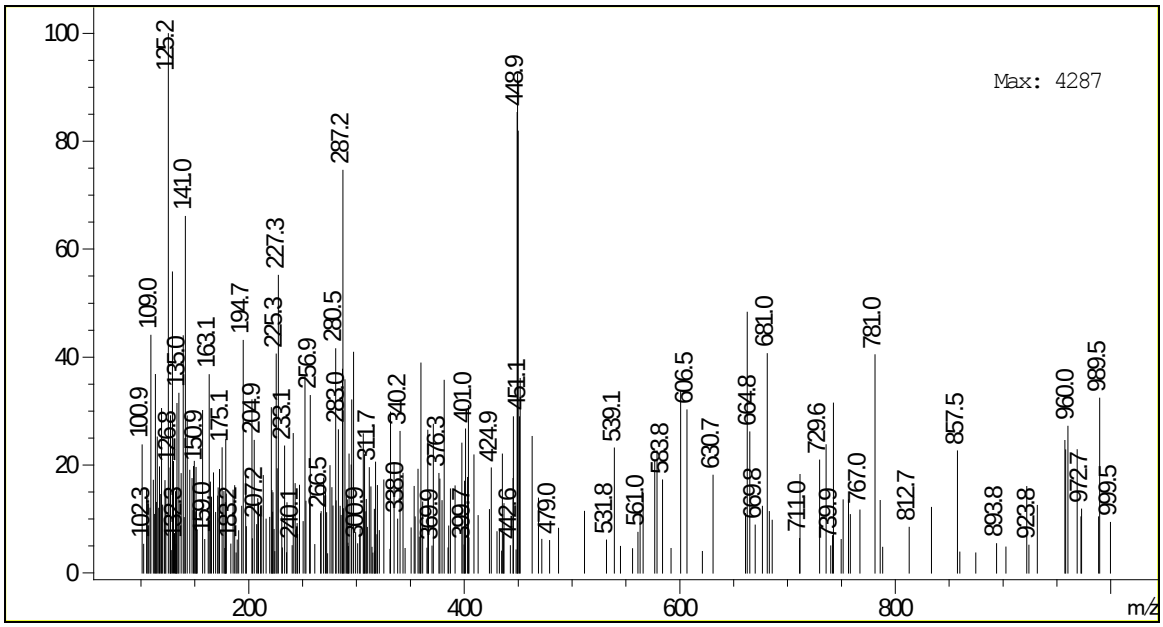
Şekil 4.20. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar



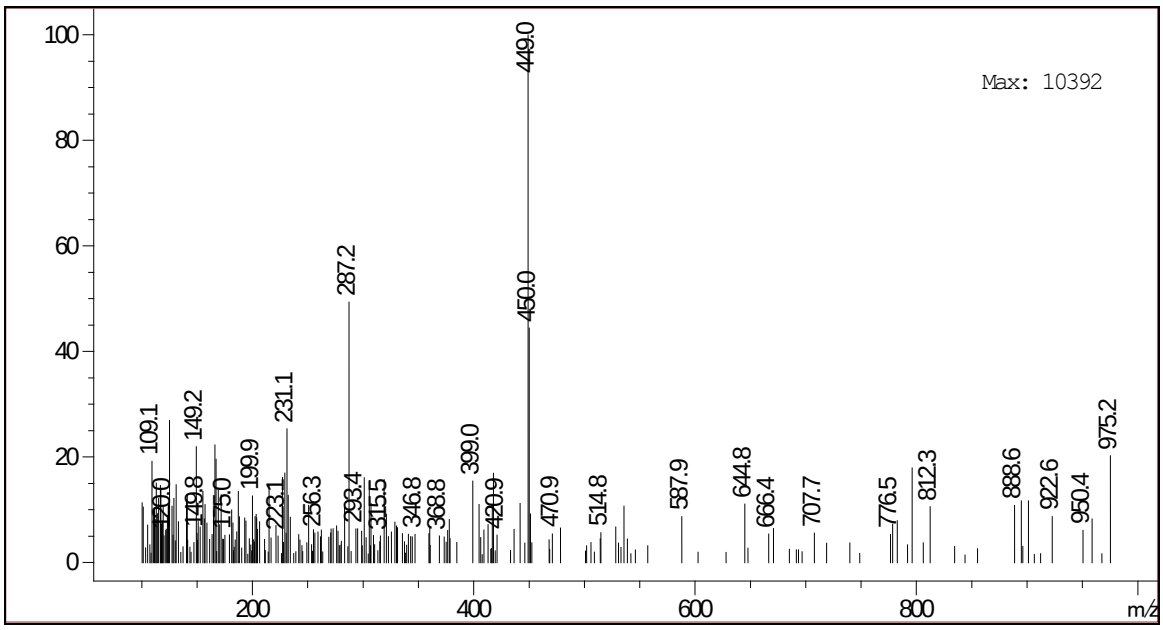
Şekil 4.21. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



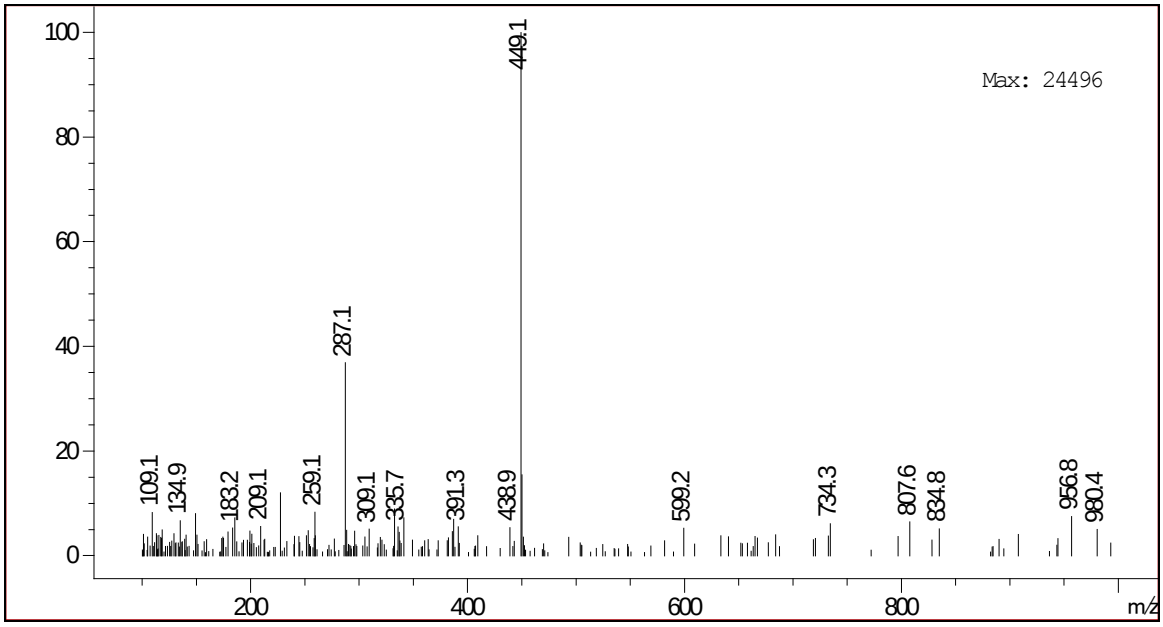
Şekil 4.22. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 7.5-50 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



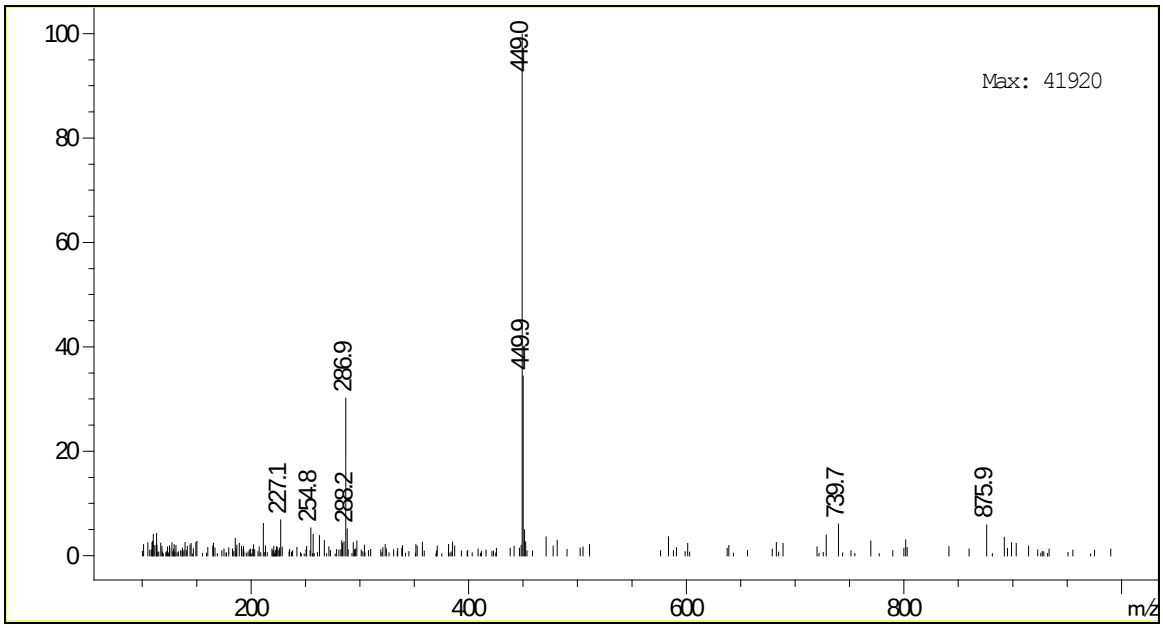
Şekil 4.23. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu



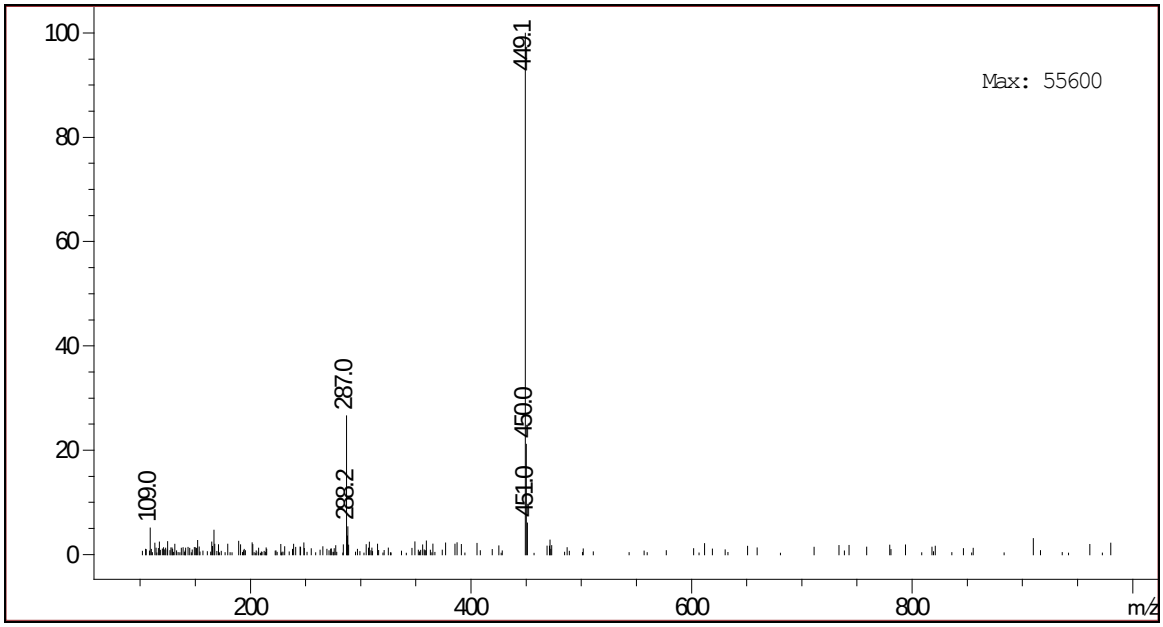
Şekil 4.24. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



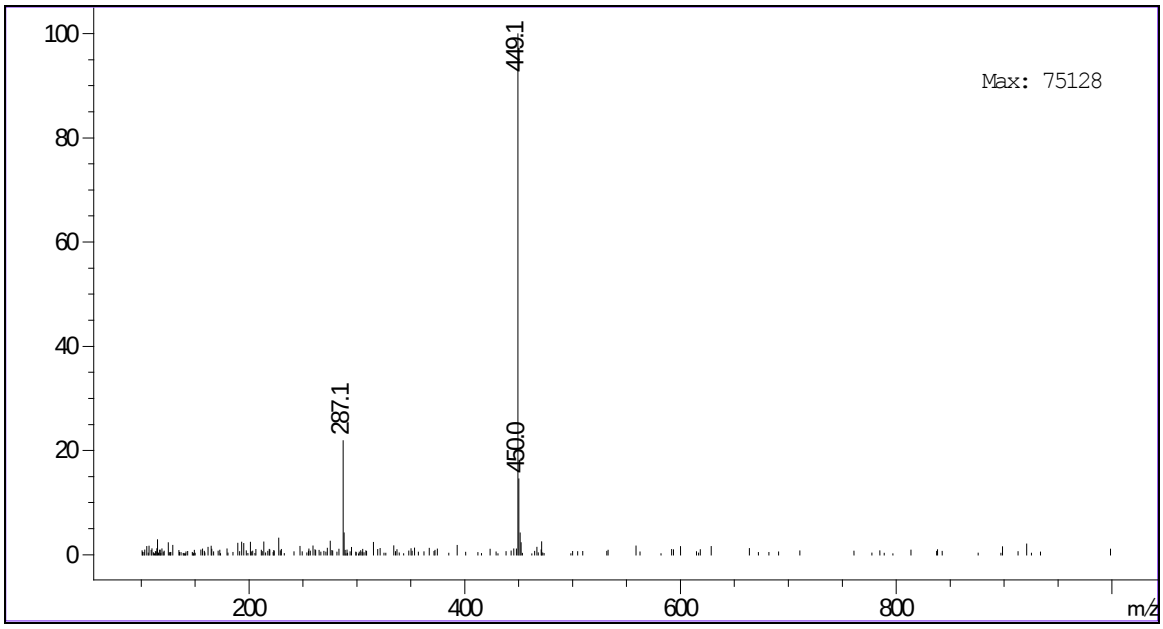
Şekil 4.25. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



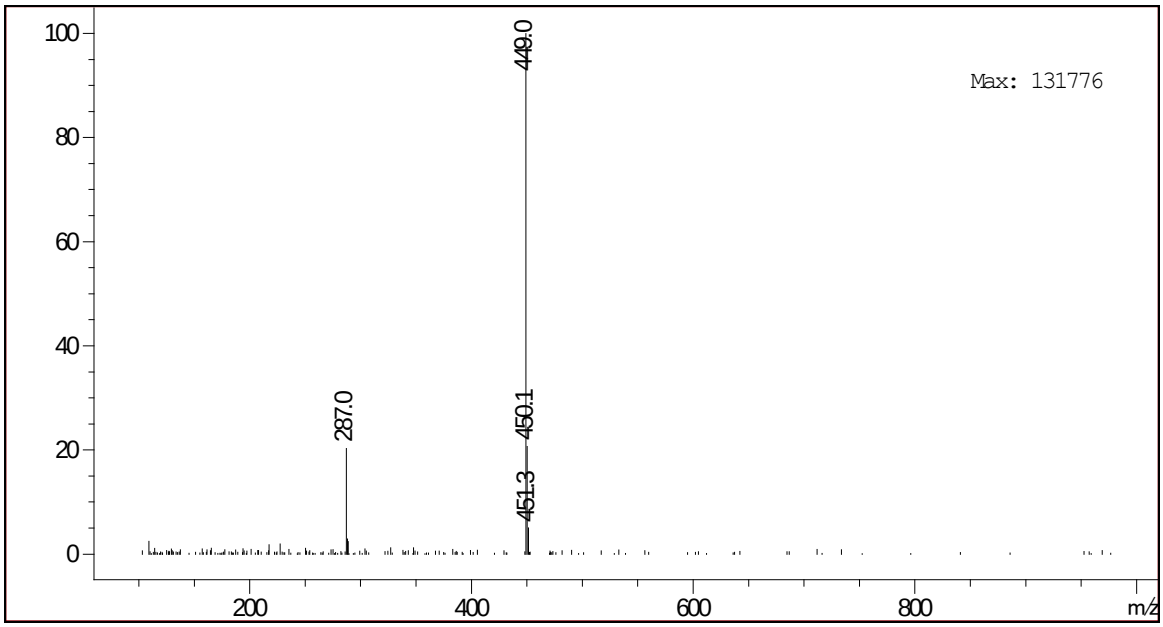
Şekil 4.26. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



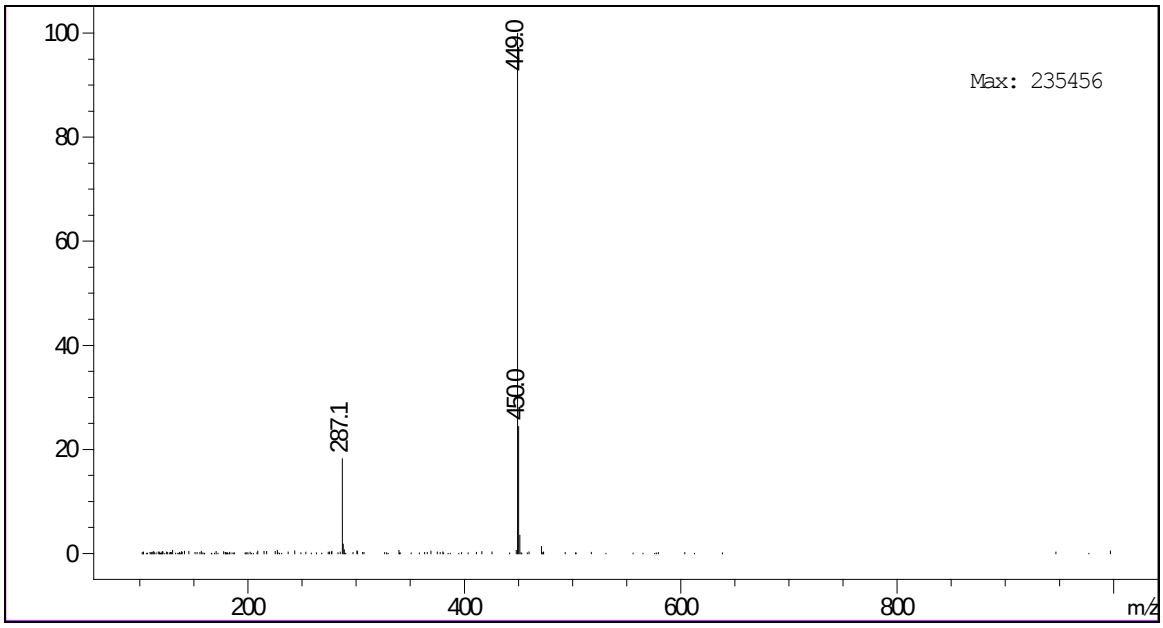
Şekil 4.27. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



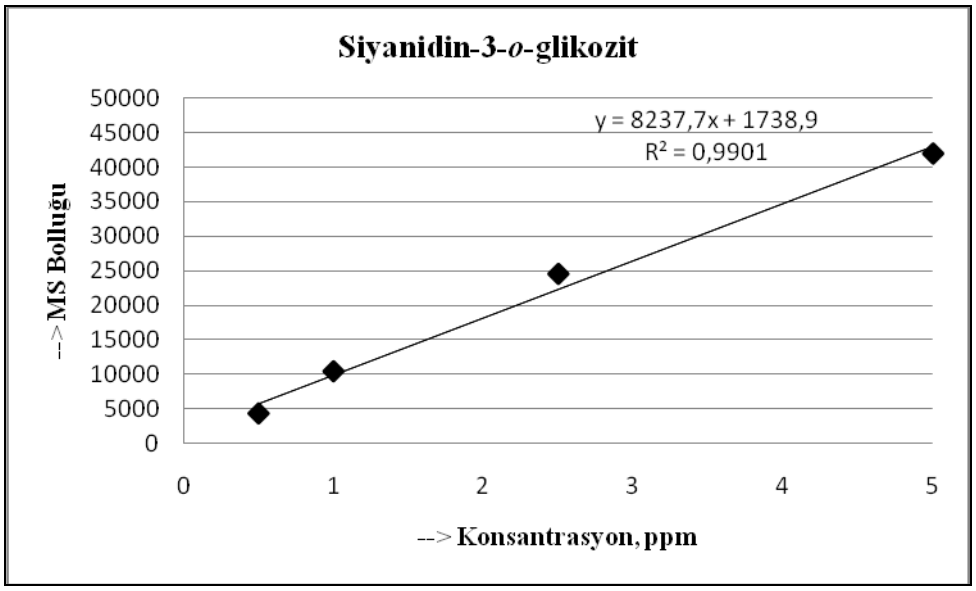
Şekil 4.28. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



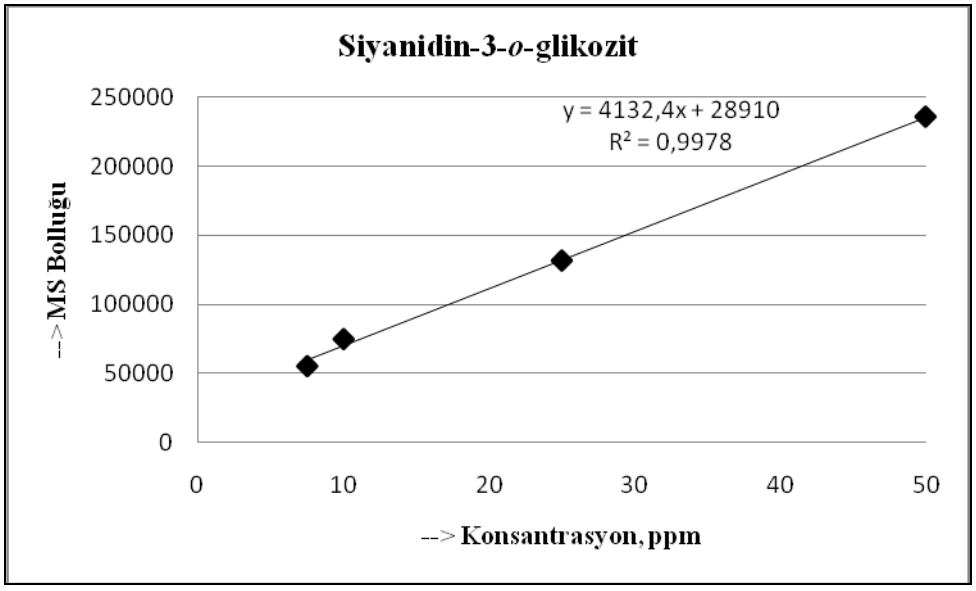
Şekil 4.29. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (25 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.30. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (50 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.31. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.32. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 7.5-50 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği

4.4.3. Pelargonidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS Tayini için Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

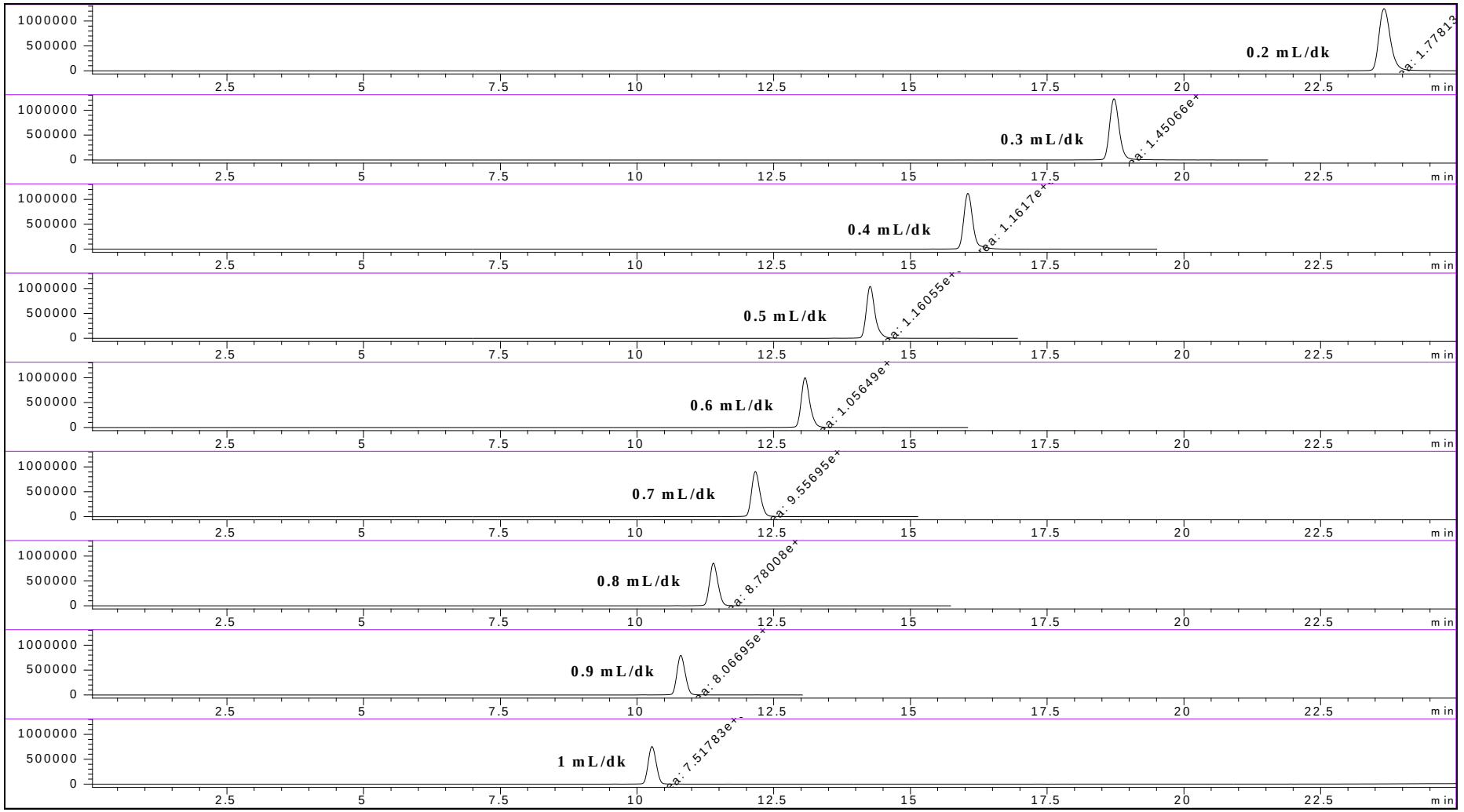
Hazırlanan 50 ppm' lik pelargonidin-3-*o*-glikozit standart çözeltisi kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Öncelikle optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 mL/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrileri, alan değerleri ve kolondan çıkış süresi dikkate alınarak karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.33**)** 0.5 mL/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı.

En iyi fragmentasyon (parçalayıcı) voltajını belirlemek için yapılan deneysel çalışmalarda, 10-190 V aralığında kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit için en uygun fragmentorün 110 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.34).

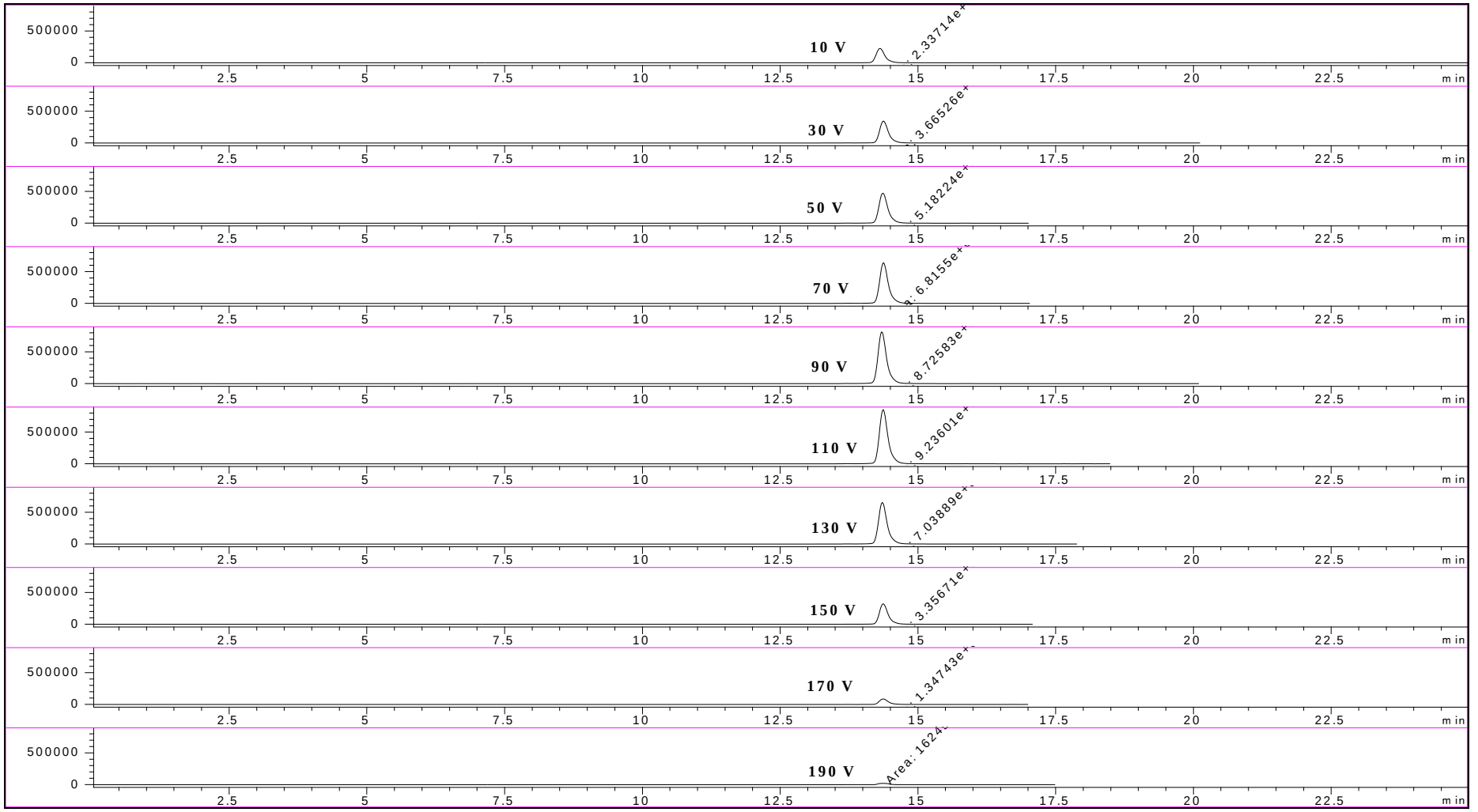
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 1–45 μL aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminde 5 μL' den sonra piklerde belirgin bir bozulma olduğu gözlendi. Pik alanı ve simetrisi dikkate alındığında enjeksiyon hacmi 5 μL olarak belirlendi (Şekil 4.35).

Uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-50 °C aralığında pelargonidin-3-*o*-glikozite ait kromatogram ve spektrumlar alındı (Şekil 4.36). Pik alanı, pik simetrisi ve kolon çıkış süresi dikkate alındığında kolon sıcaklığı 30 ºC olarak belirlendi.

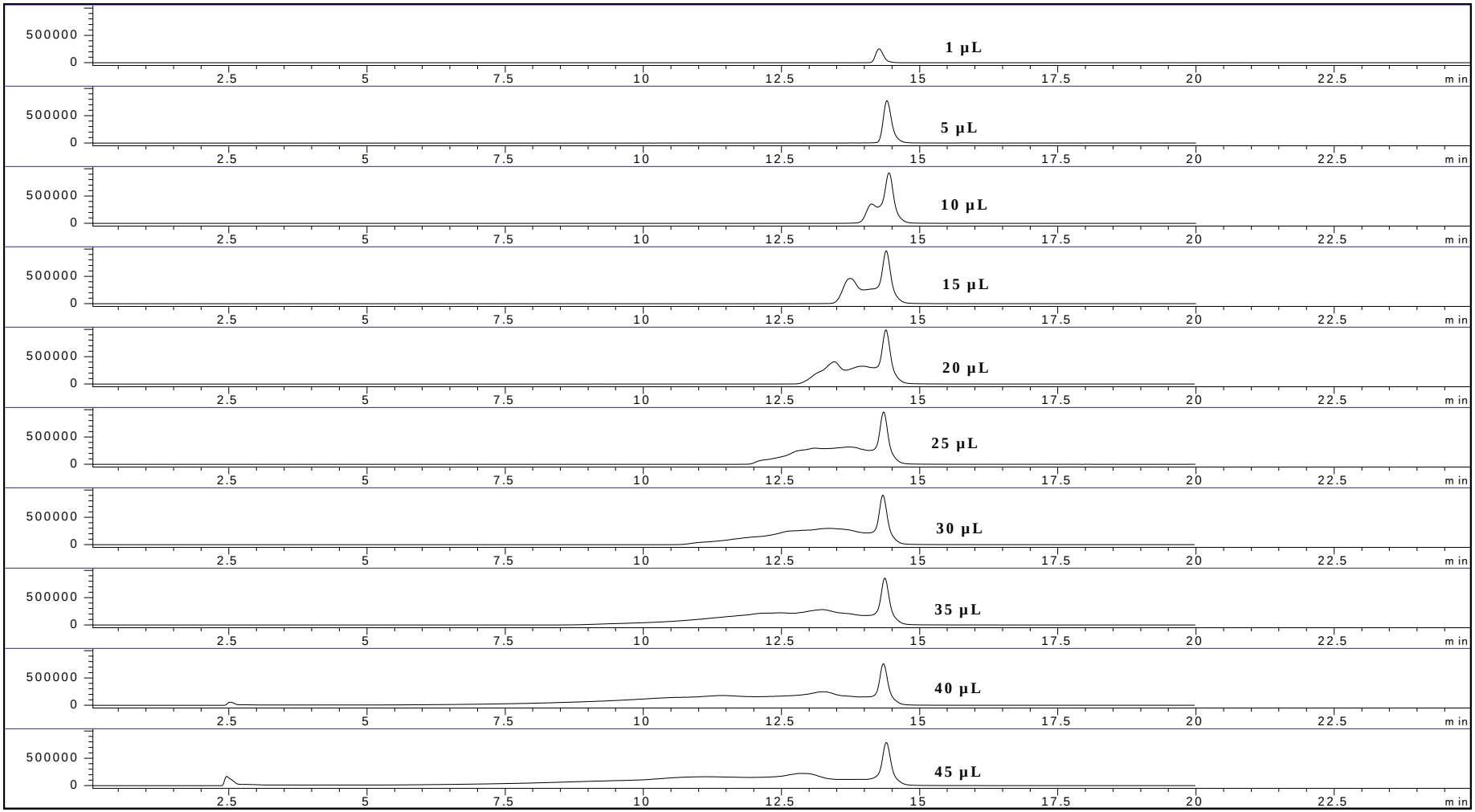
Şekil 4.37-4.40' da 0.1-200 ppm arasındaki standartların kromatogramları görülmektedir. Şekil 4.41' de 0.1-5 ppm ve Şekil 4.42' de 7.5-200 ppm aralığındaki kalibrasyon grafikleri verildi. Şekil 4.43-4.52' de 0.5-200 ppm arasındaki standartların kütle spektrumları görülmektedir. Şekil 4.53' te 0.5-5 ppm ve Şekil 4.54' de 7.5-200 ppm aralığındaki MS spektrumlarına ait kalibrasyon grafikleri verildi. Kütle spektrumları incelendiğinde, pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış hali olan 433.1 m/z $(M)^+$ temel piki, 434.1 m/z $(M+1)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri ve pelargonidin bileşiğinden bir hidrojen atomu koparılmış haline karşılık gelen 271.1 m/z piki görülmektedir.



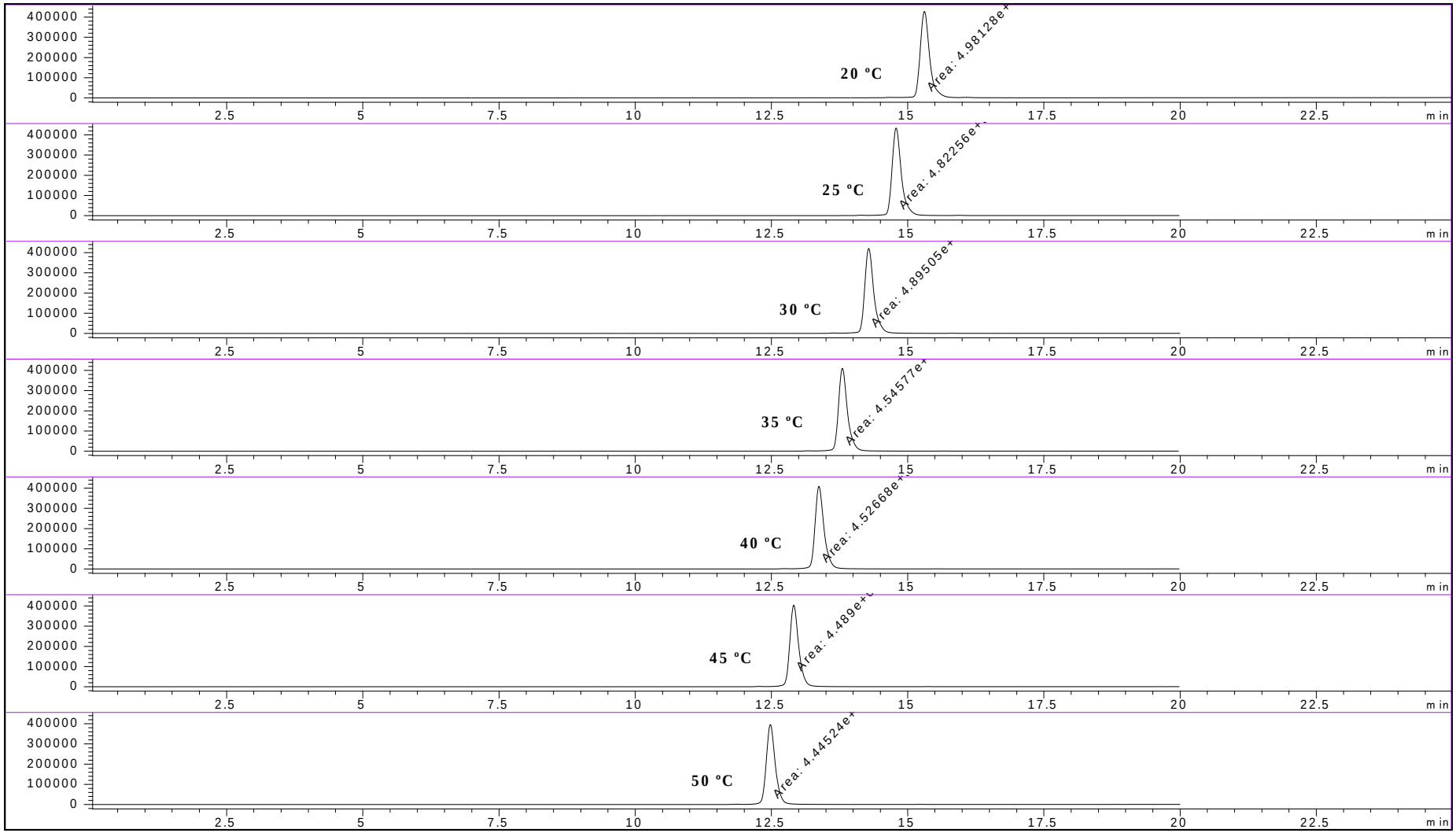
Şekil 4.33. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar



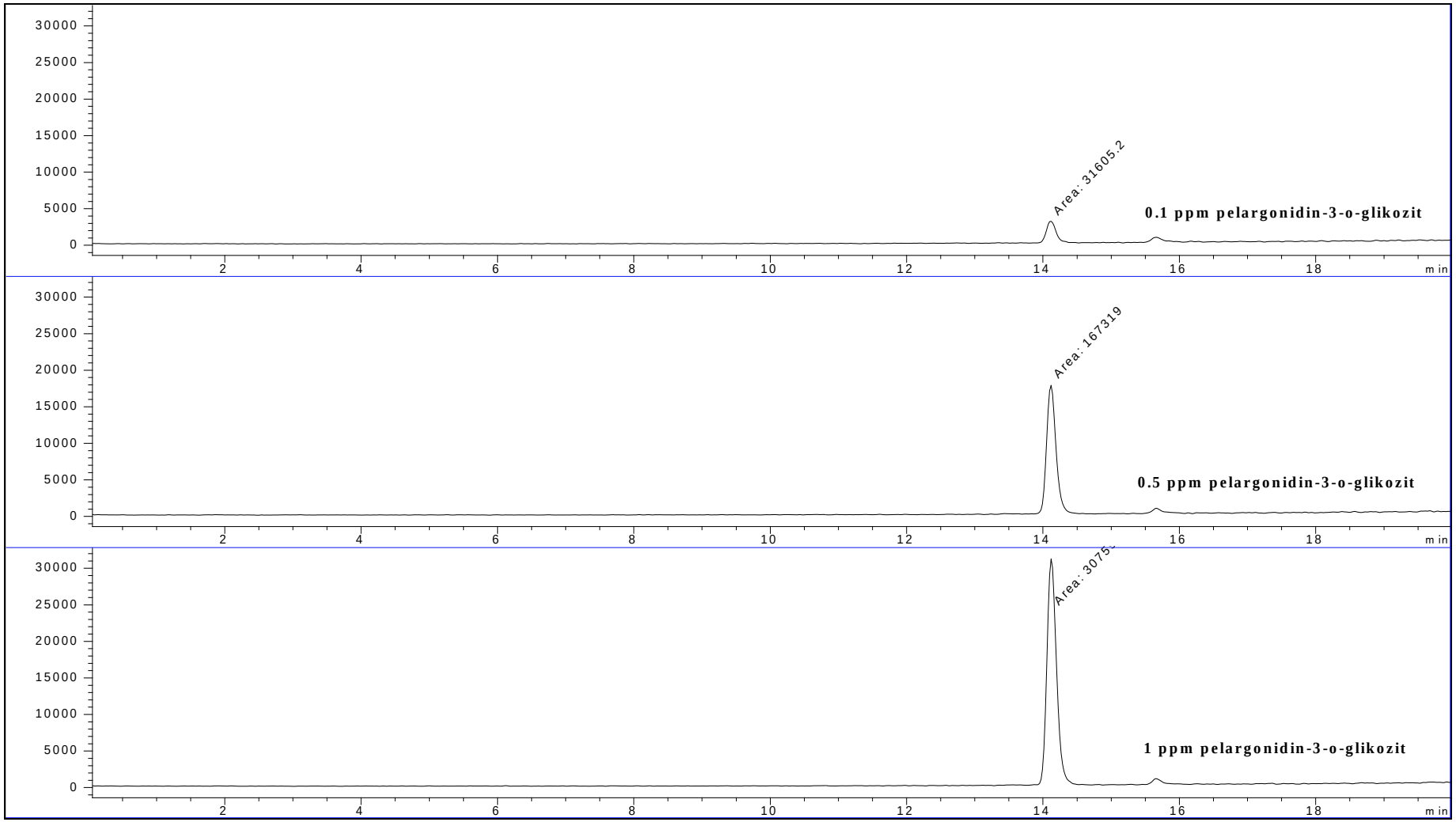
Şekil 4.34. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar



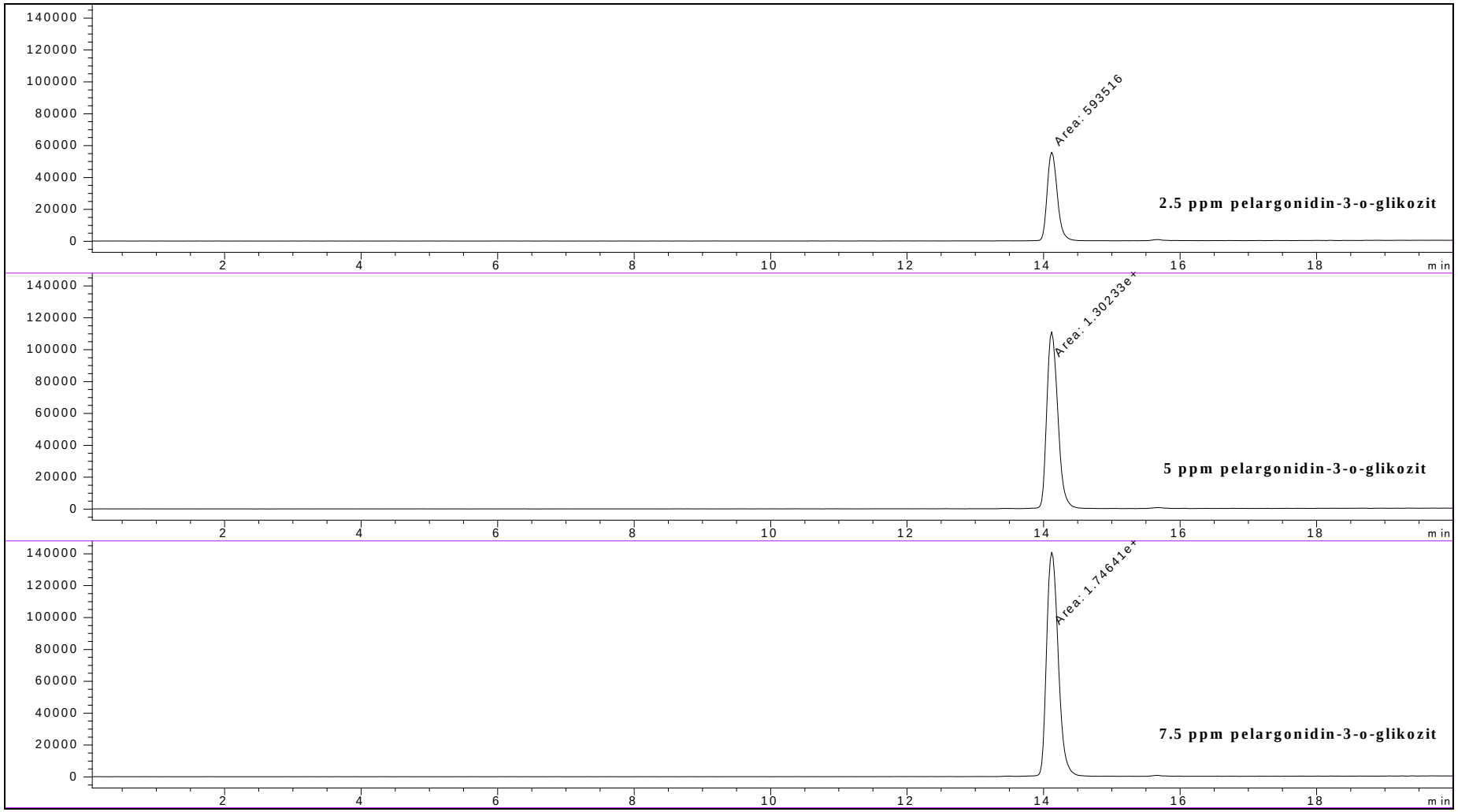
Şekil 4.35. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar



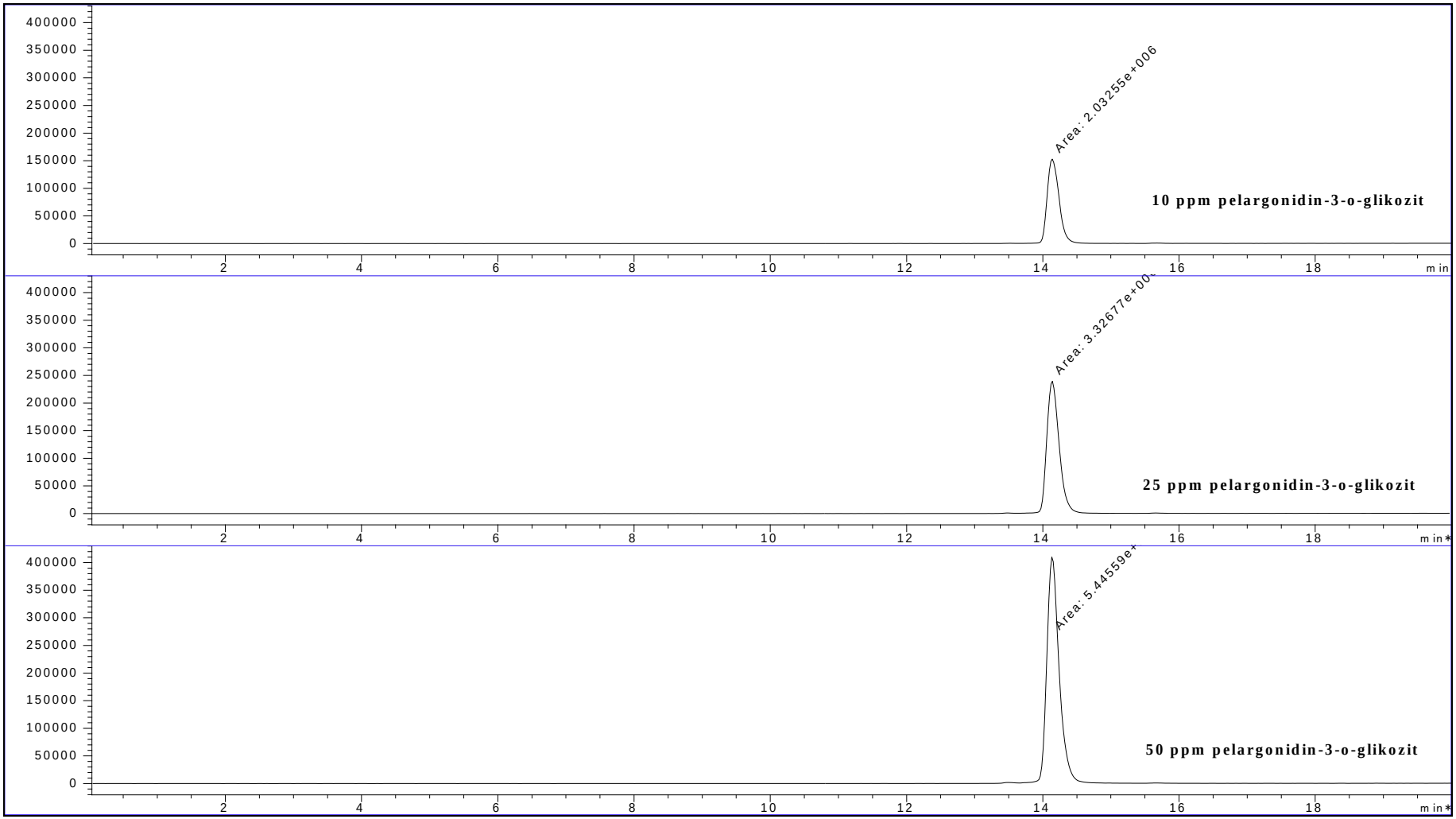
Şekil 4.36. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar



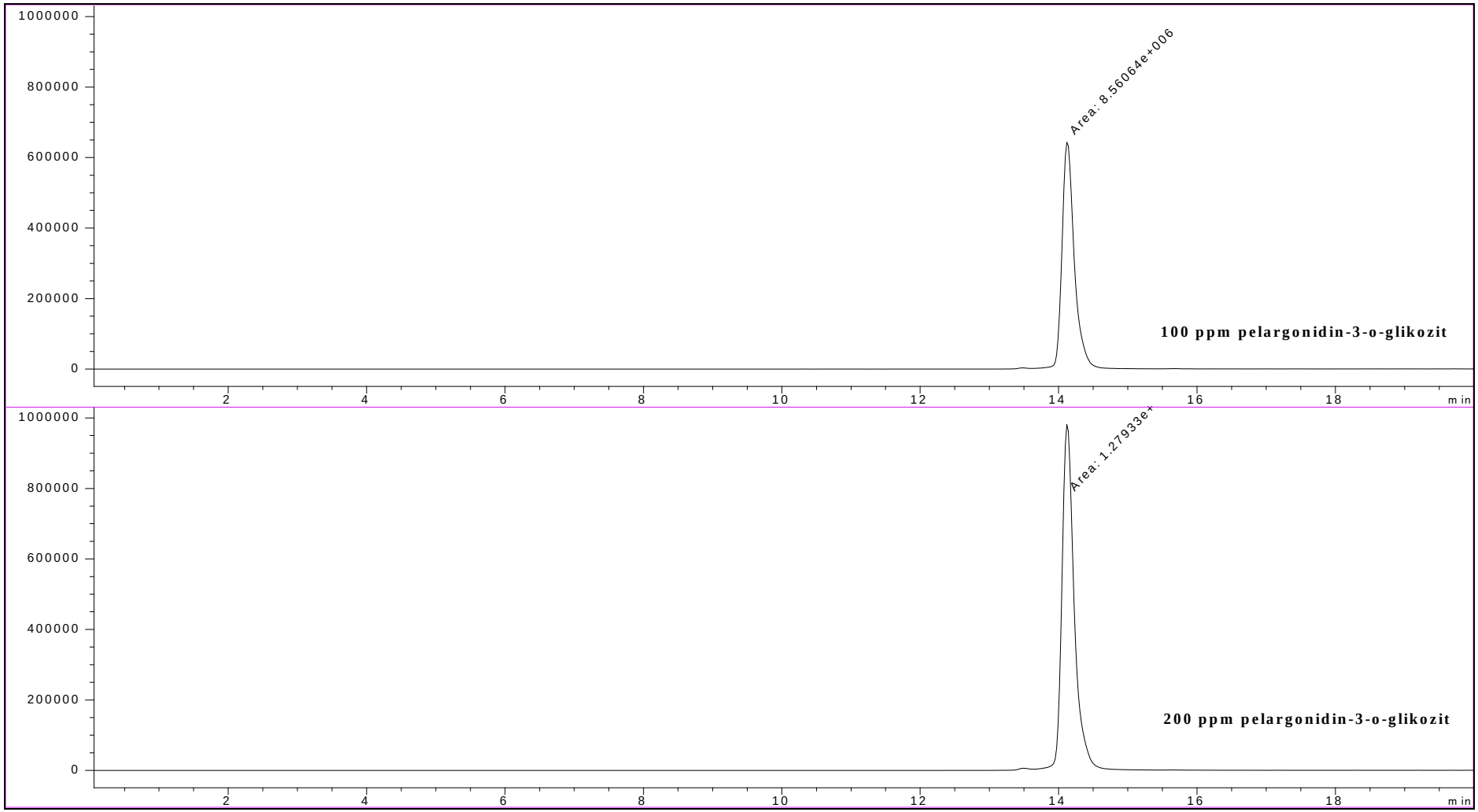
Şekil 4.37. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar



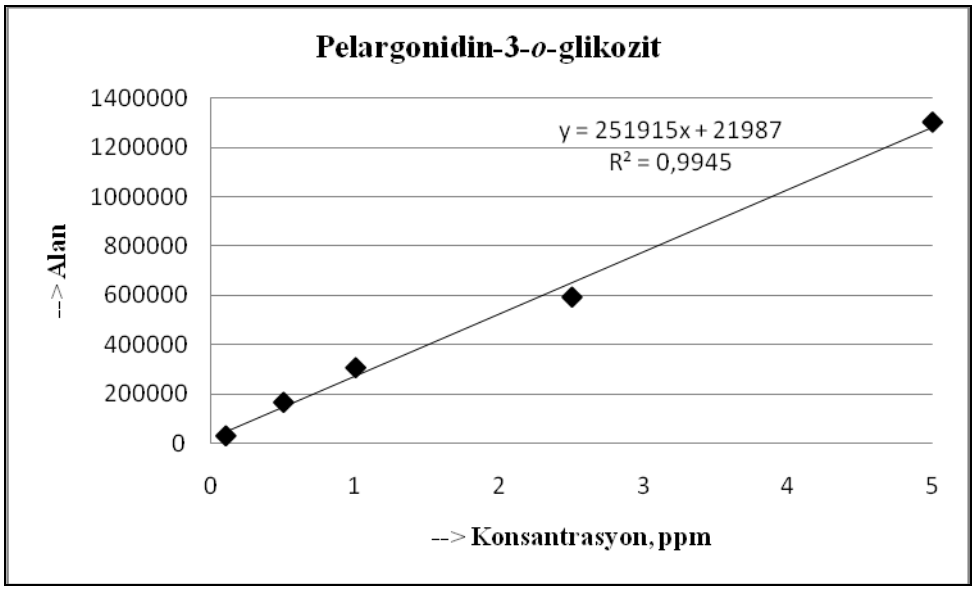
Şekil 4.38. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar



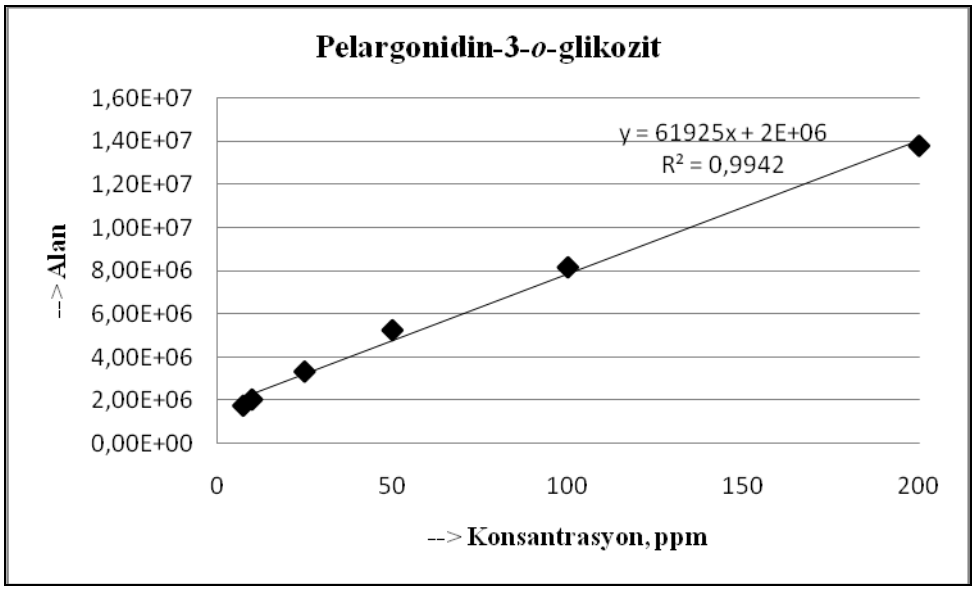
Şekil 4.39. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar



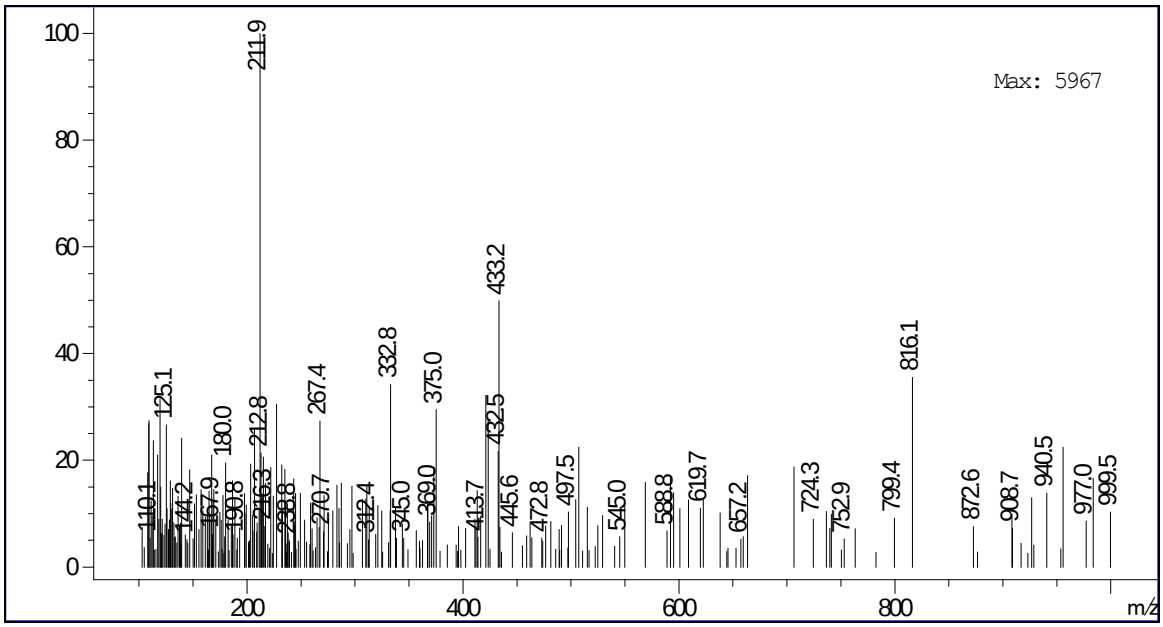
Şekil 4.40. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ve 200 ppm için) ait kromatogramlar



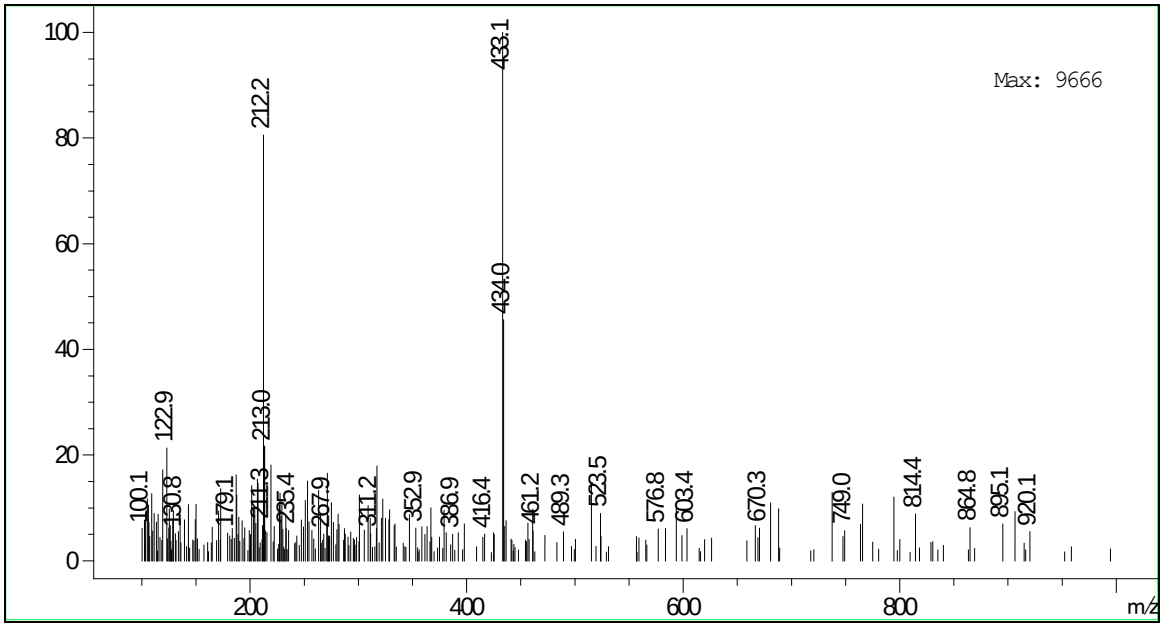
Şekil 4.41. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



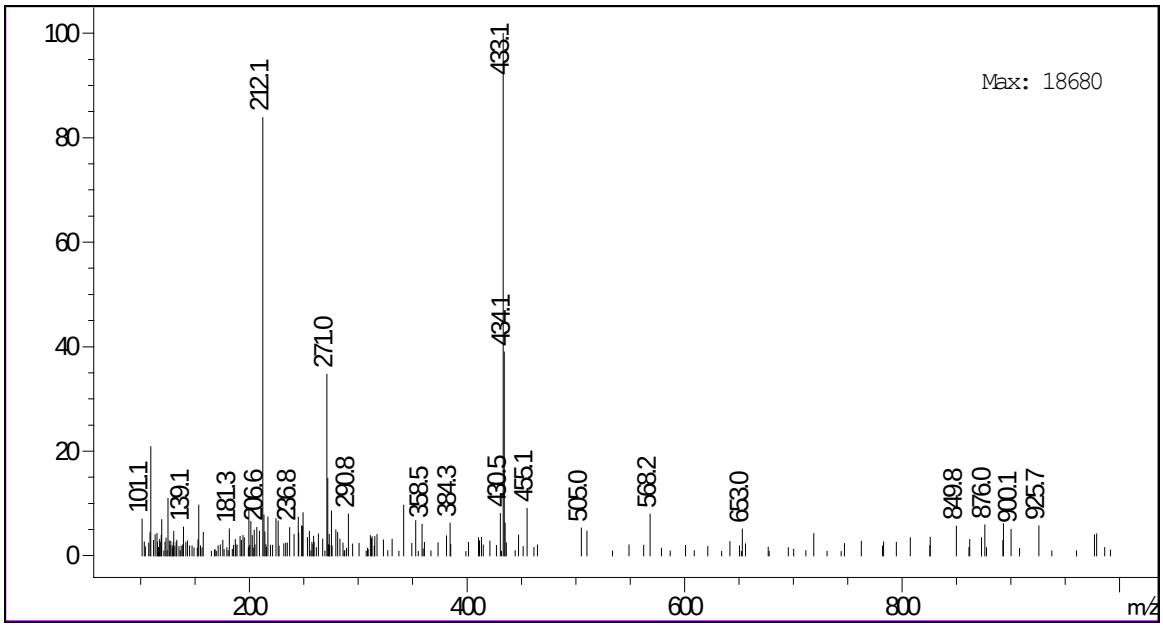
Şekil 4.42. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 7.5-200 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



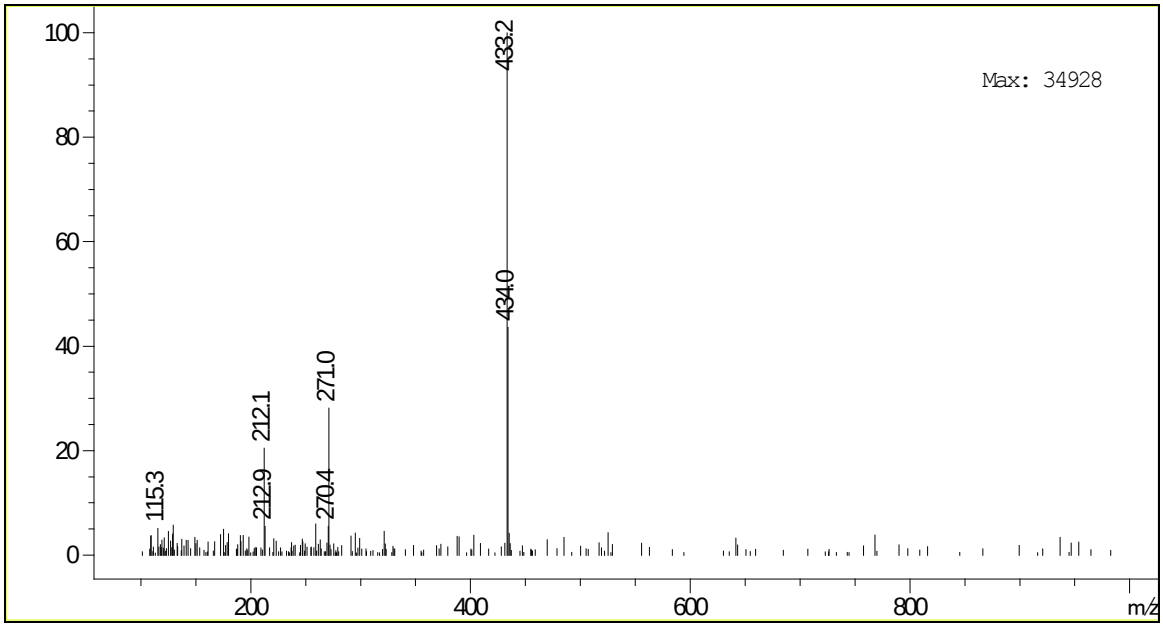
Şekil 4.43. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu



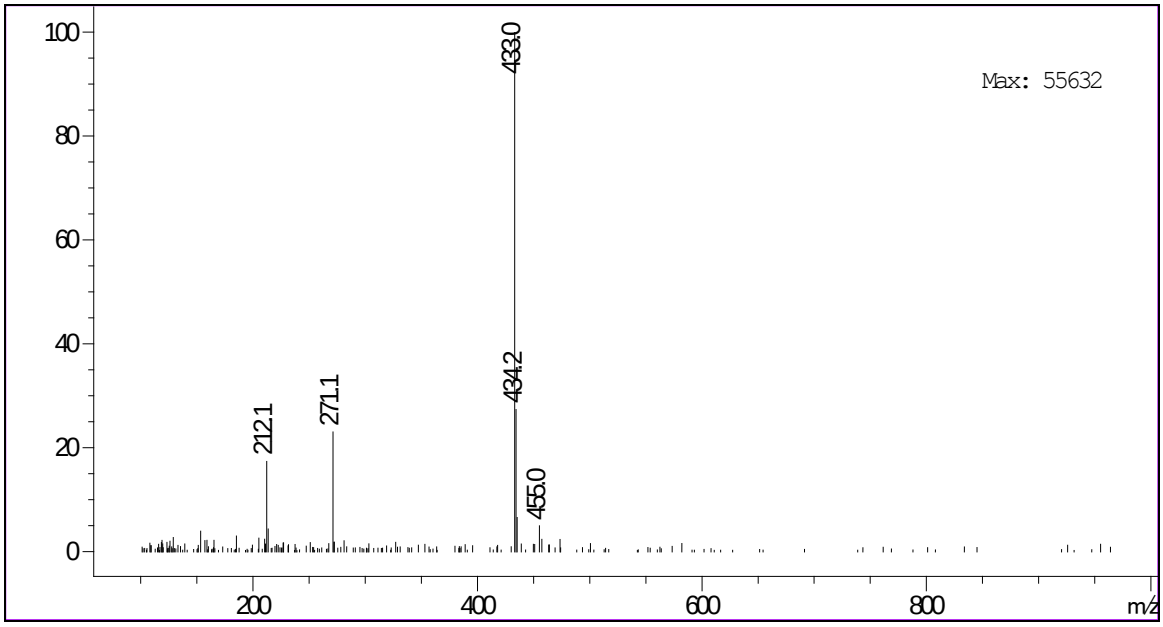
Şekil 4.44. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



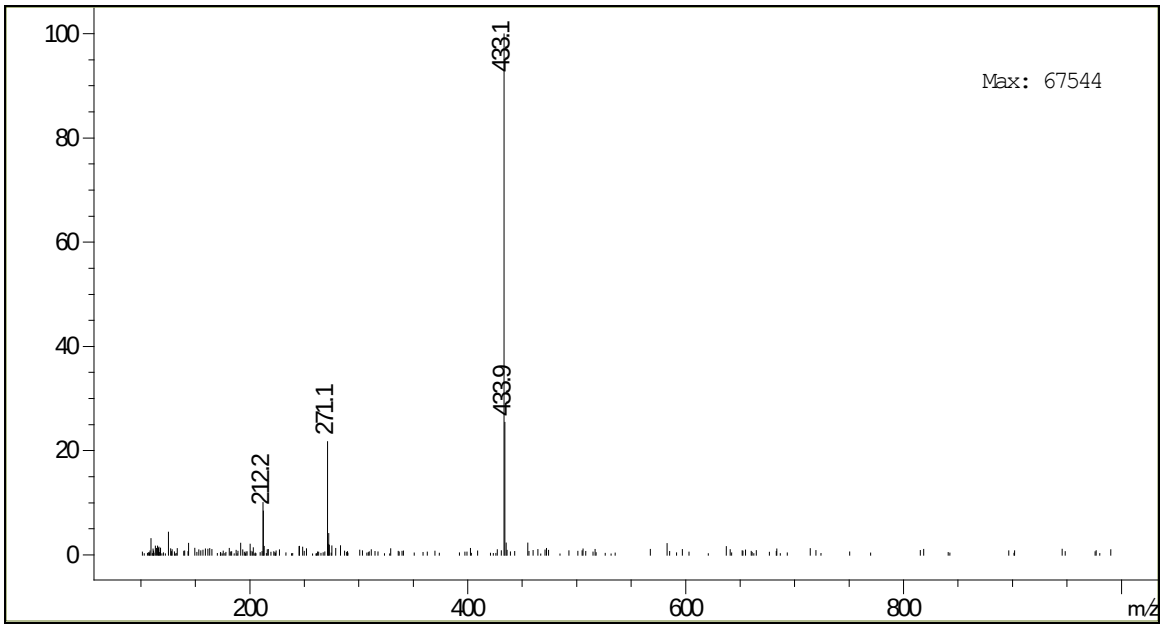
Şekil 4.45. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



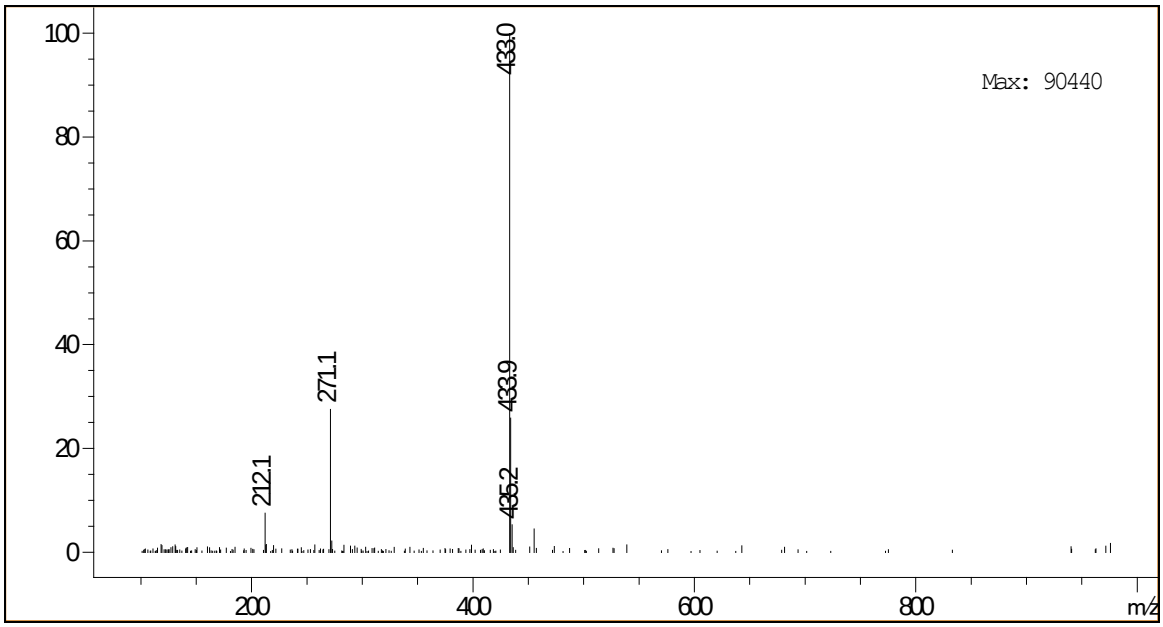
Şekil 4.46. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



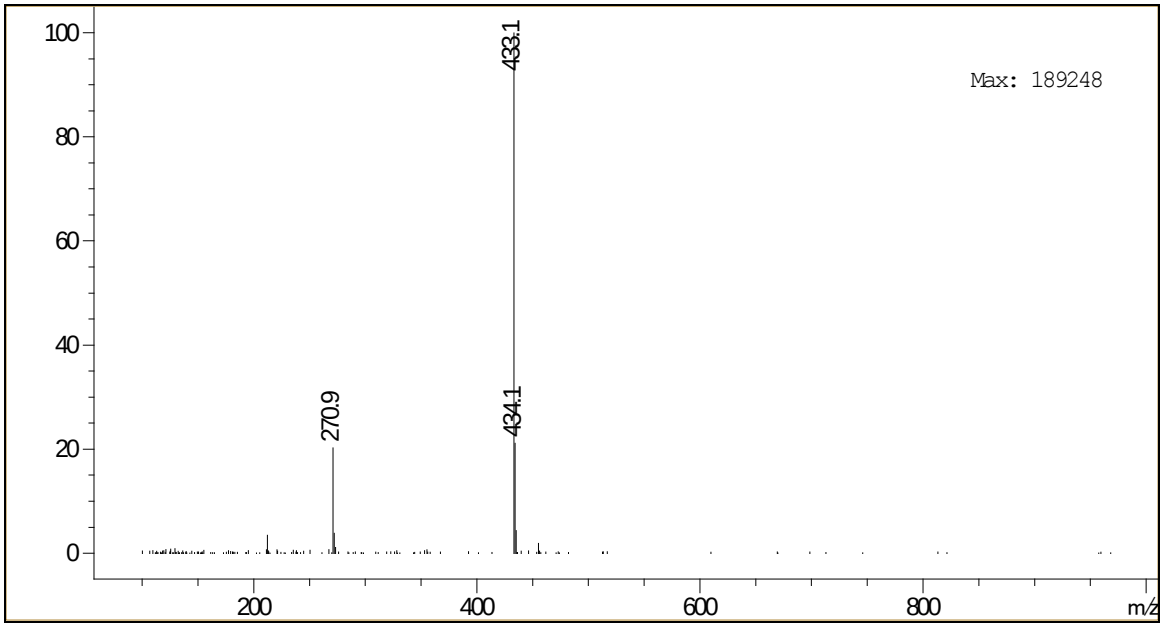
Şekil 4.47. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



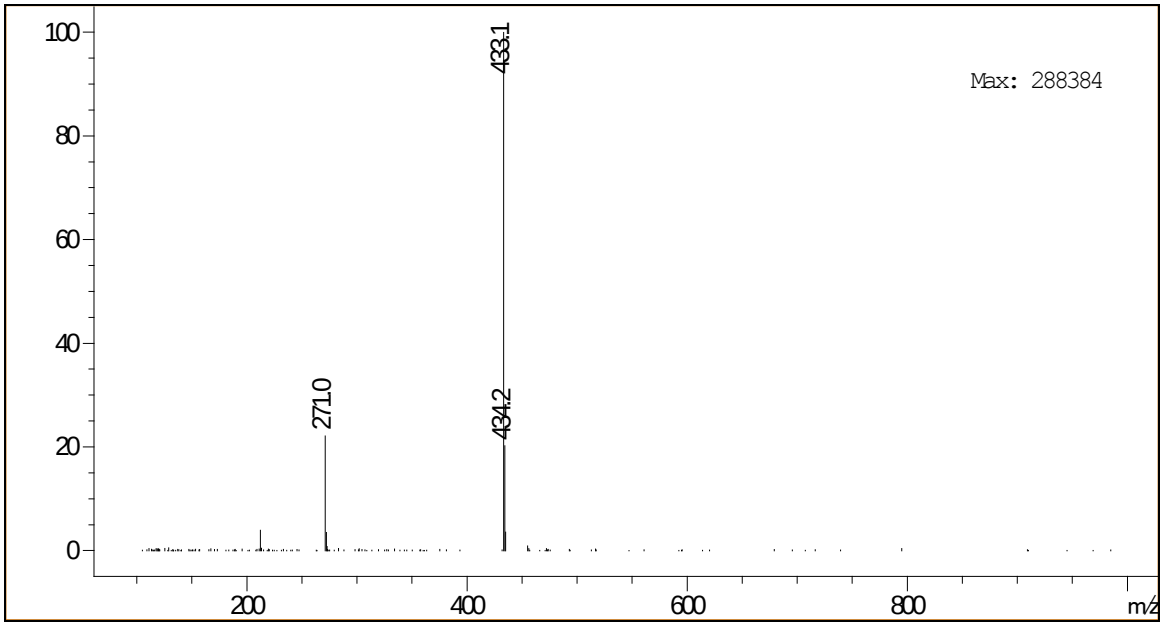
Şekil 4.48. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



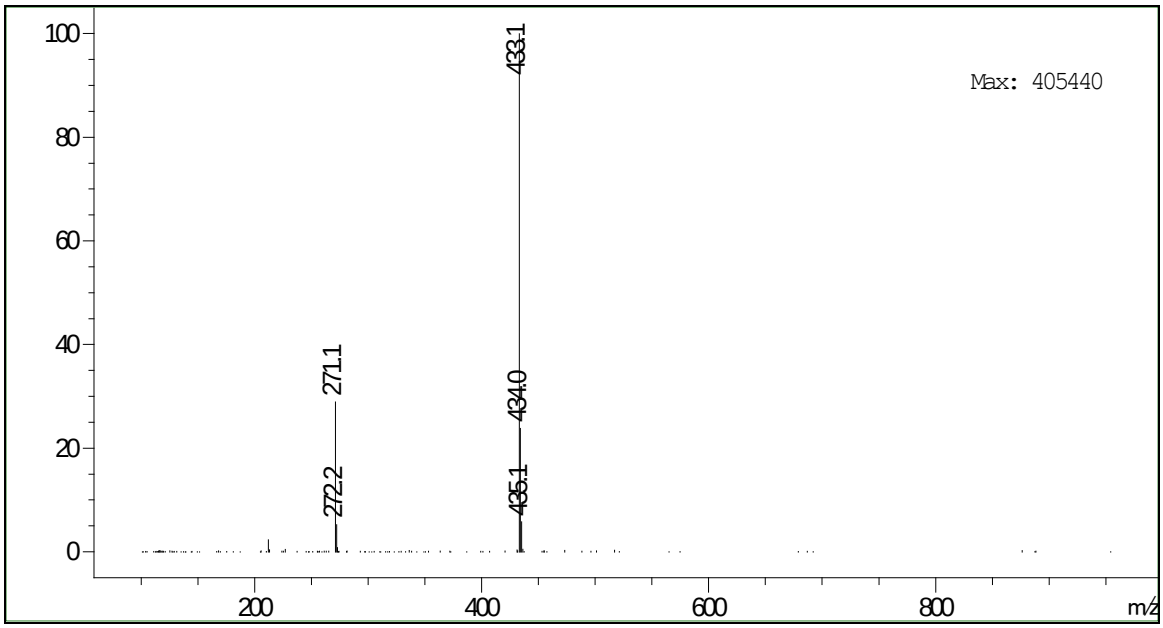
Şekil 4.49. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (25 ppm için) ait kütle spektrumu



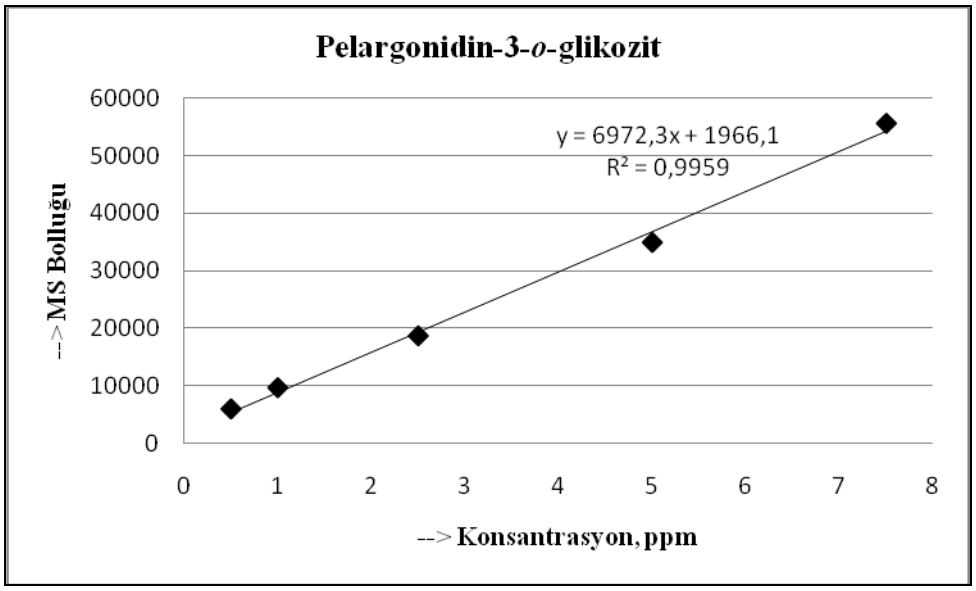
Şekil 4.50. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (50 ppm için) ait kütle spektrumu



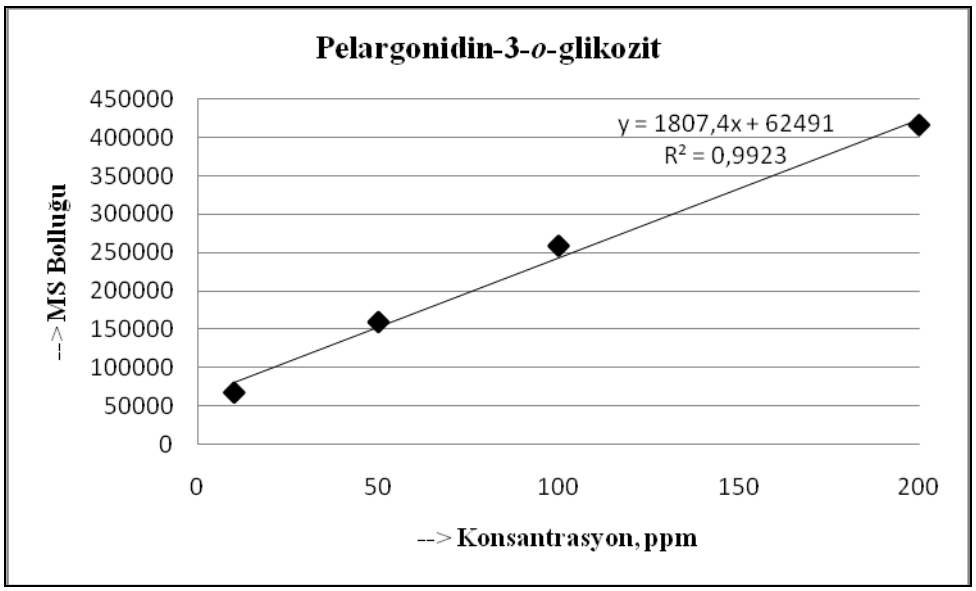
Şekil 4.51. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.52. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (200 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.53. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-7.5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.54. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 10-200 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği

4.4.4. Malvidin-3-*o*-glikozit Bileşiğinin HPLC-ESI-MS İle Tayini İçin Optimum Çalışma Koşullarının Belirlenmesi

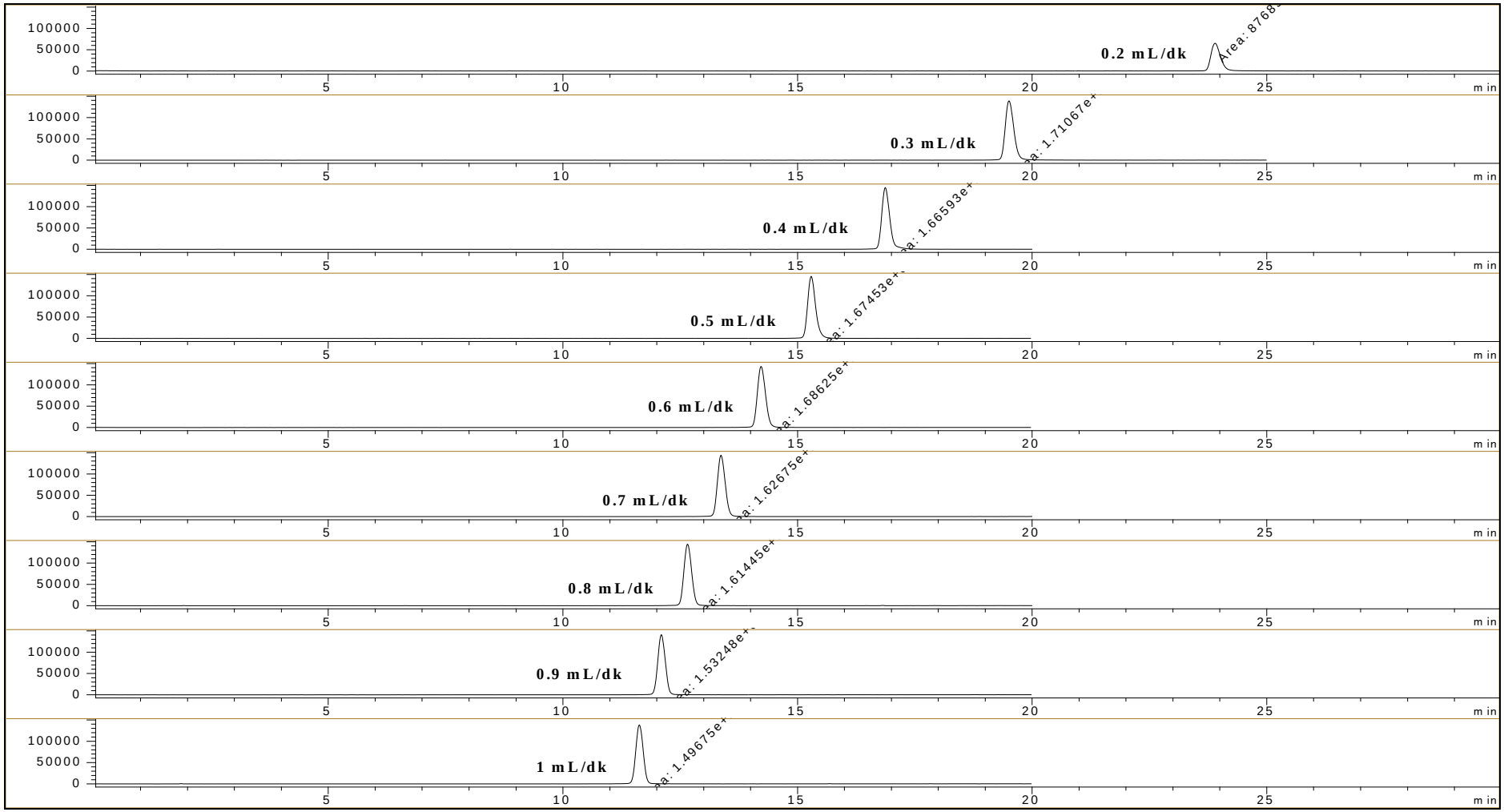
Hazırlanan 50 ppm' lik malvidin-3-*o*-glikozit standart çözeltisi kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Öncelikle optimum mobil faz akış hızı tespit edildi. Bu amaçla, 0.2-1.0 mL/dk akış aralığında yapılan deneysel çalışmalarda elde edilen kromatogramların pik simetrileri, alan değerleri ve kolondan çıkış süresi dikkate alınarak karşılaştırıldı. Elde edilen kromatogramlardan (Şekil 4.55**)** 0.5 mL/dk' lık akış hızının optimum olduğu sonucuna varıldı.

En iyi fragmentasyon (parçalayıcı) voltajını belirlemek için yapılan deneysel çalışmalarda, 10-190 V aralığında kromatogramlar alındı. Pik simetrisi ve alan dikkate alındığında, malvidin-3-*o*-glikozit için en uygun fragmentorün 110 V olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.56).

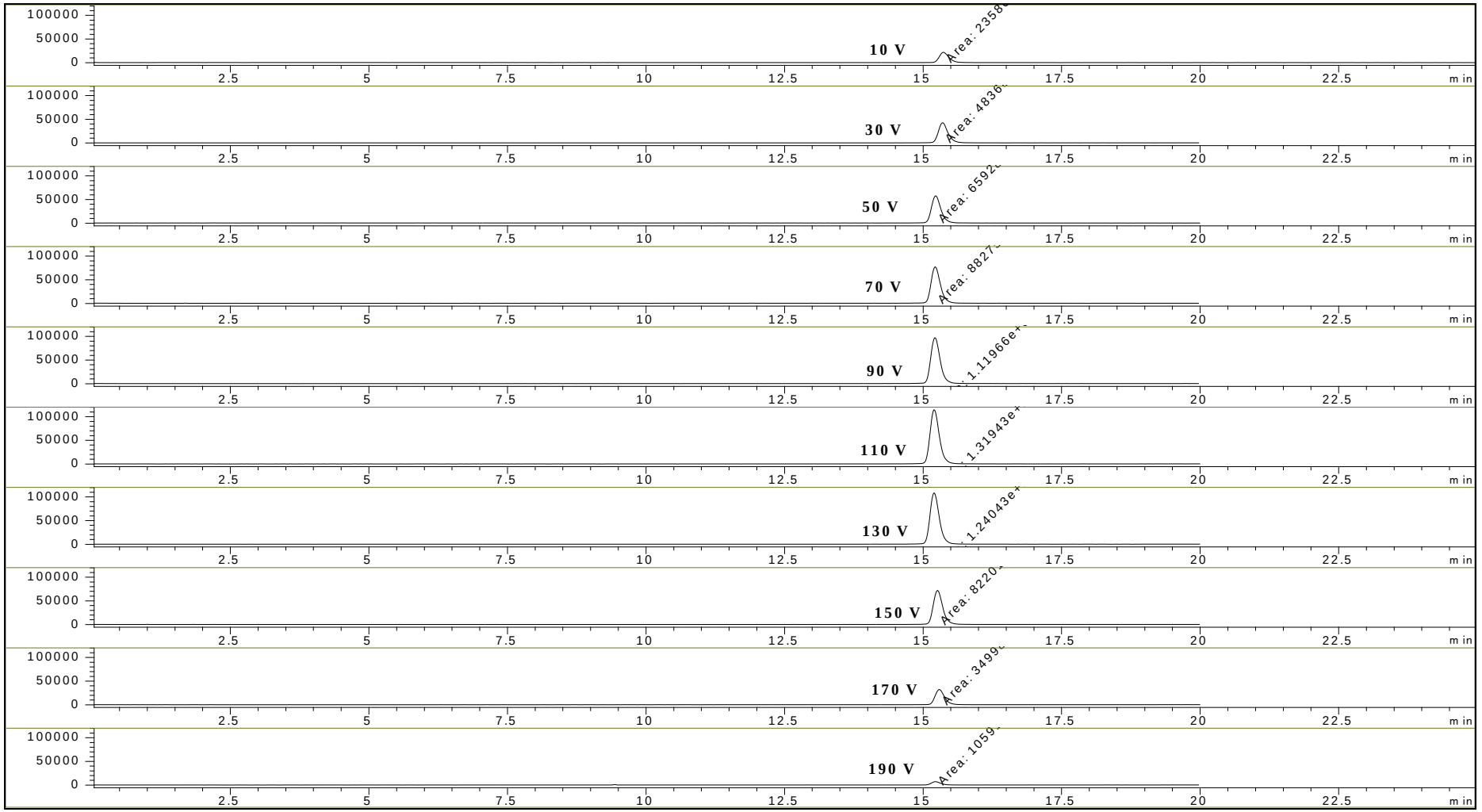
En iyi enjeksiyon hacmini belirlemek için yapılan çalışmada, 1–45 μL aralığında örnek hacimleri denendi. Enjekte edilen örnek hacminde 5 μL' den sonra piklerde belirgin bir bozulma olduğu gözlendi. Pik alanı ve simetrisi dikkate alındığında enjeksiyon hacmi 5 μL olarak belirlendi (Şekil 4.57).

Uygun kolon sıcaklığının tayini için 20-50 °C aralığında malvidin-3-*o*-glikozite ait kromatogram ve spektrumlar alındı (Şekil 4.58). Pik alanı, pik simetrisi ve kolon çıkış süresi dikkate alındığında kolon sıcaklığı 30 ºC olarak belirlendi.

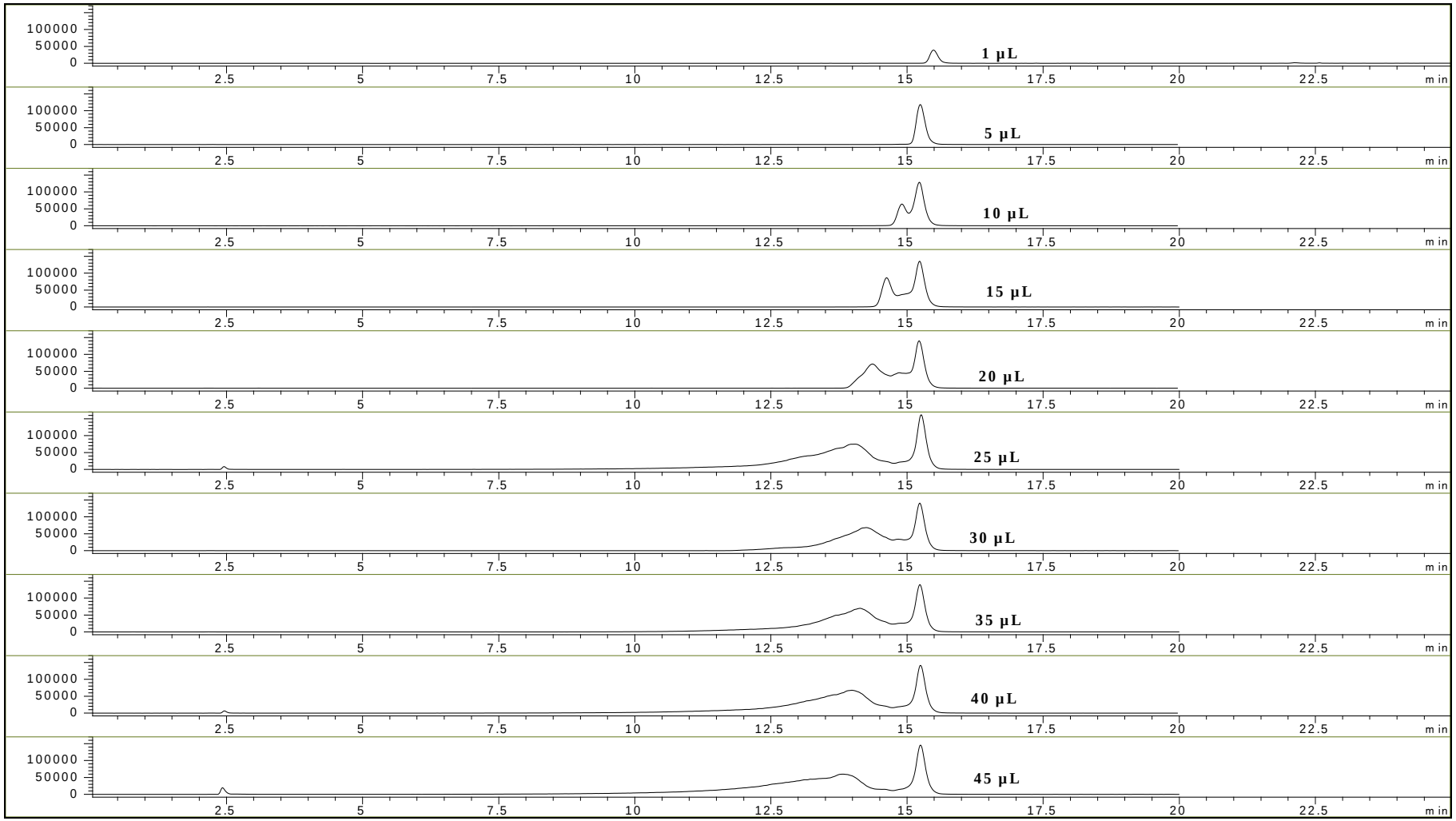
Şekil 4.59-4.60' da 0.1-5 ppm arasındaki standartların kromatogramları görülmektedir. Şekil 4.61' de 0.1-5 ppm aralığındaki kalibrasyon grafiği verildi. Şekil 4.62-4.65' de 0.5-5 ppm arasındaki standartların kütle spektrumları görülmektedir. Şekil 4.66' da 0.5-5 ppm aralığındaki MS spektrumlarına ait kalibrasyon grafiği verildi. Kütle spektrumları incelendiğinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış hali olan 493.1 m/z $(M)^+$ temel piki, 494.1 m/z $(M+1)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan malvidin bileşiğine karşılık gelen 331.0 m/z piki görülmektedir.



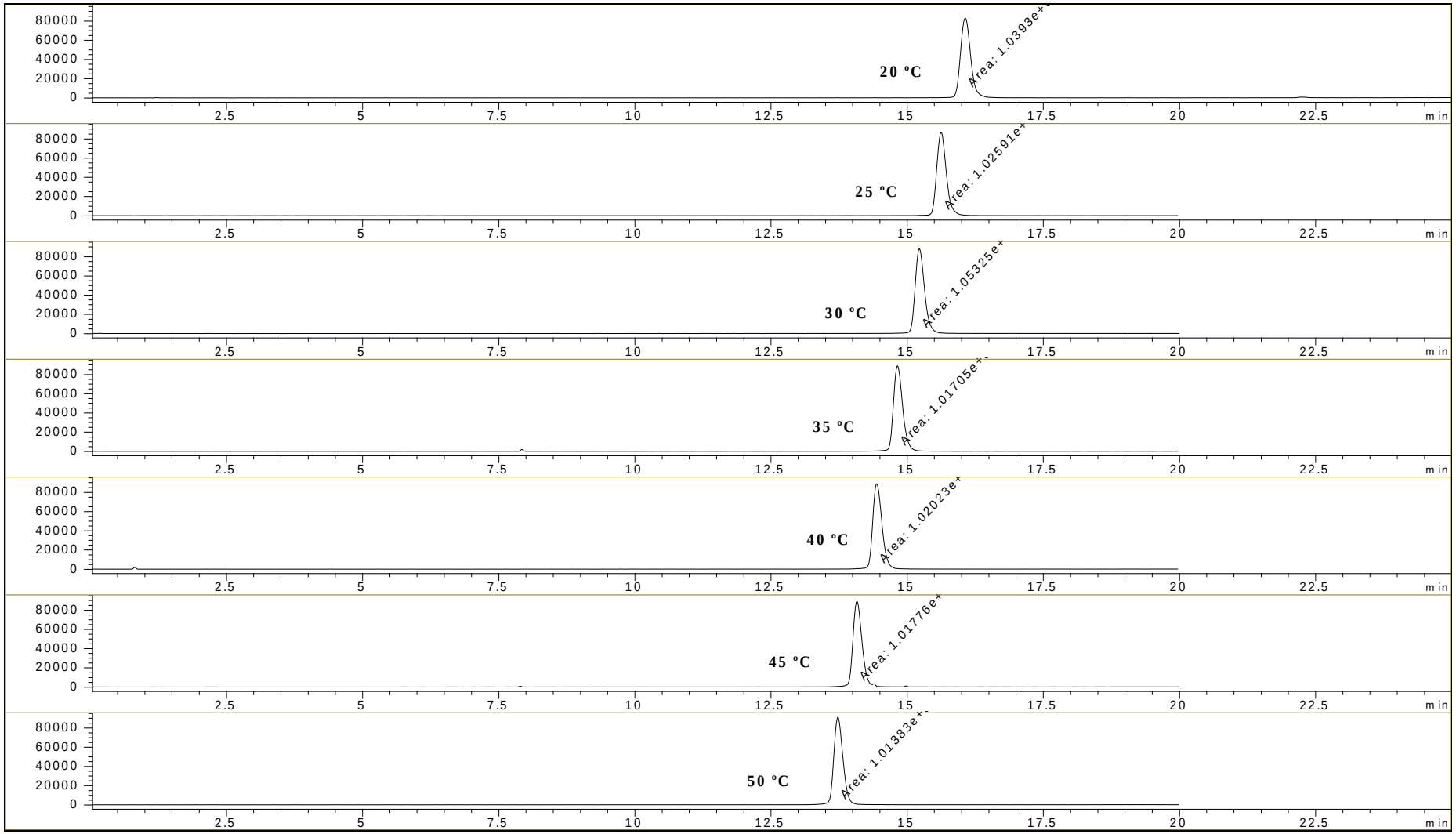
Şekil 4.55. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun akış hızının bulunmasına ait kromatogramlar



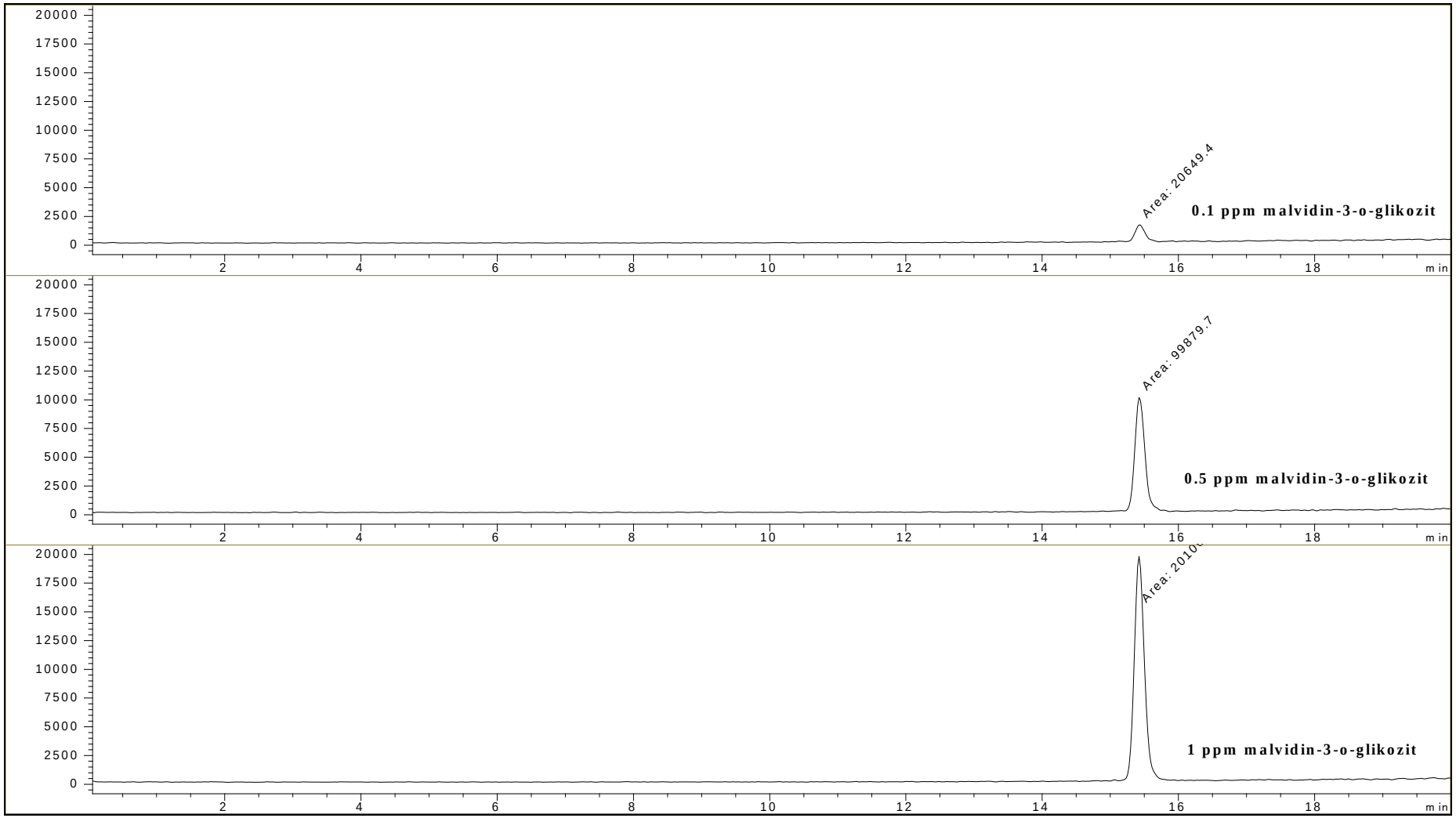
Şekil 4.56. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun fragmentasyon (parçalayıcı) voltajının bulunmasına ait kromatogramlar



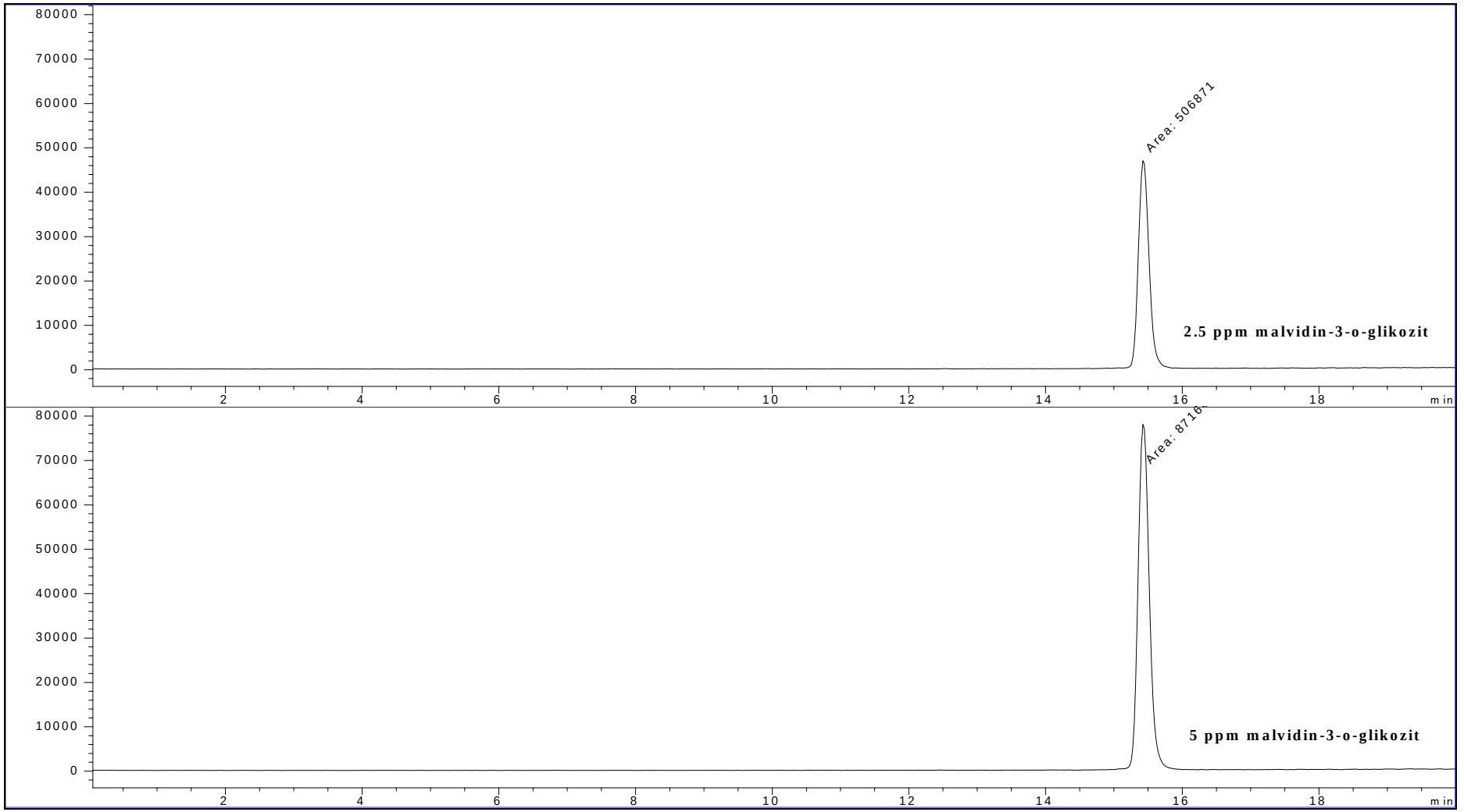
Şekil 4.57. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun enjeksiyon hacminin bulunmasına ait kromatogramlar



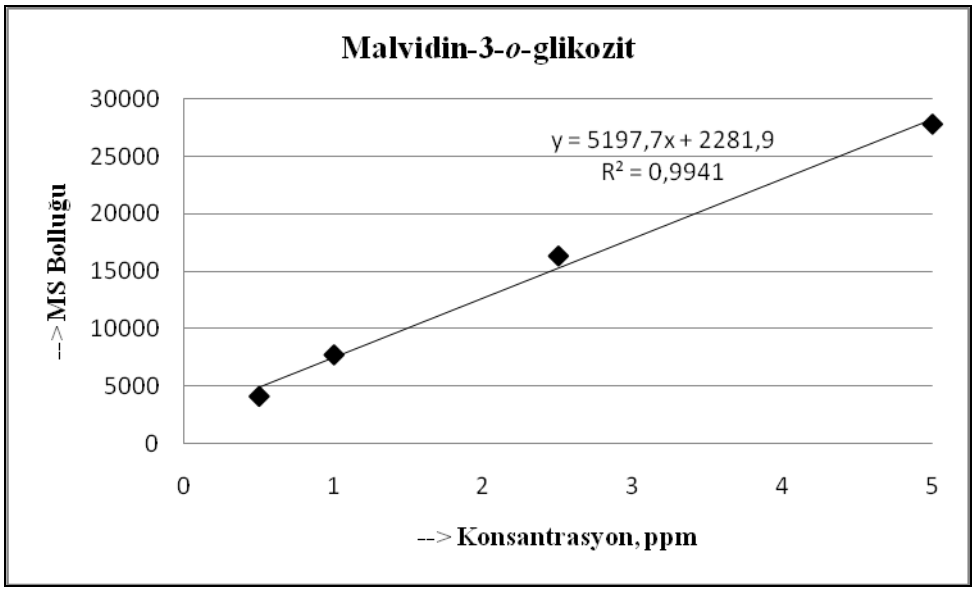
Şekil 4.58. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için en uygun kolon sıcaklığının bulunmasına ait kromatogramlar



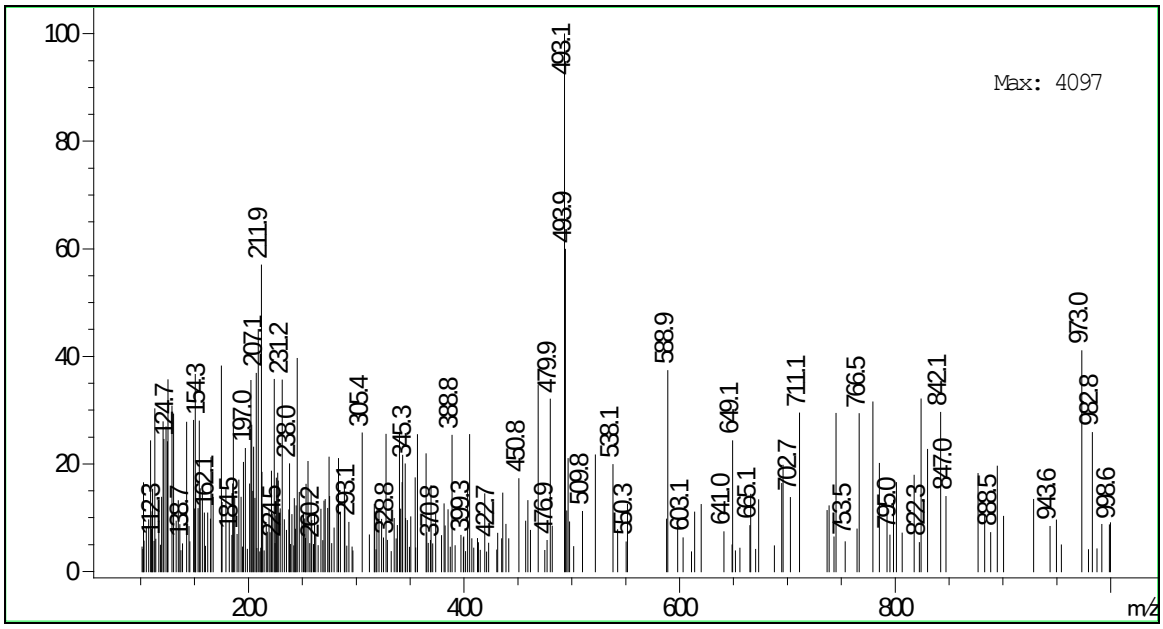
Şekil 4.59. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar



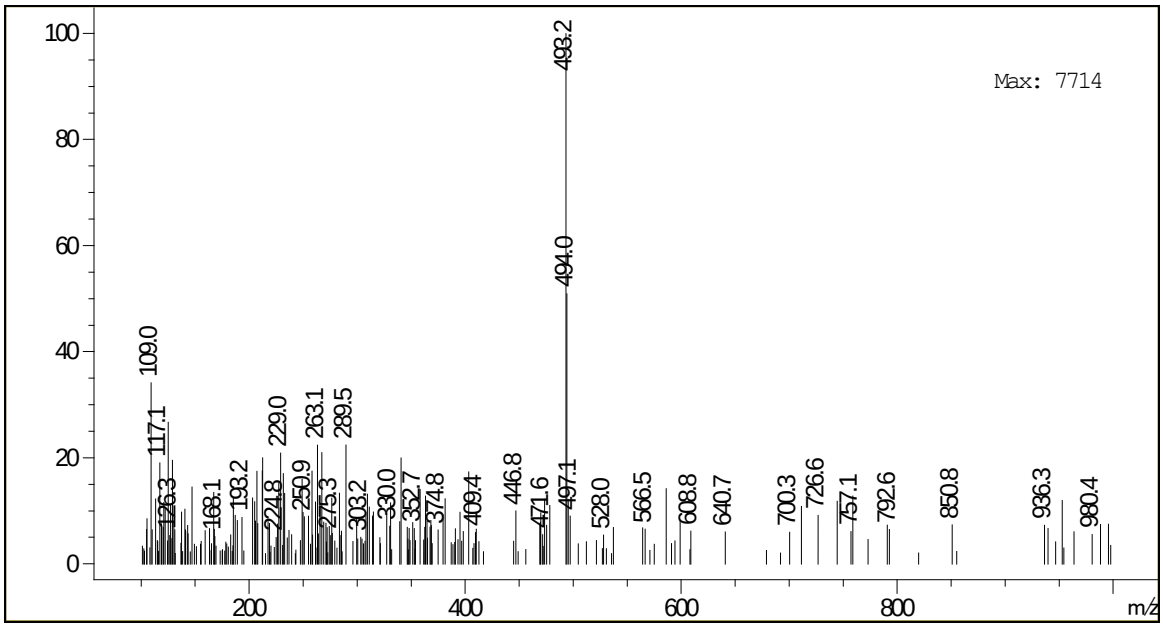
Şekil 4.60. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ve 5 ppm için) ait kromatogramlar



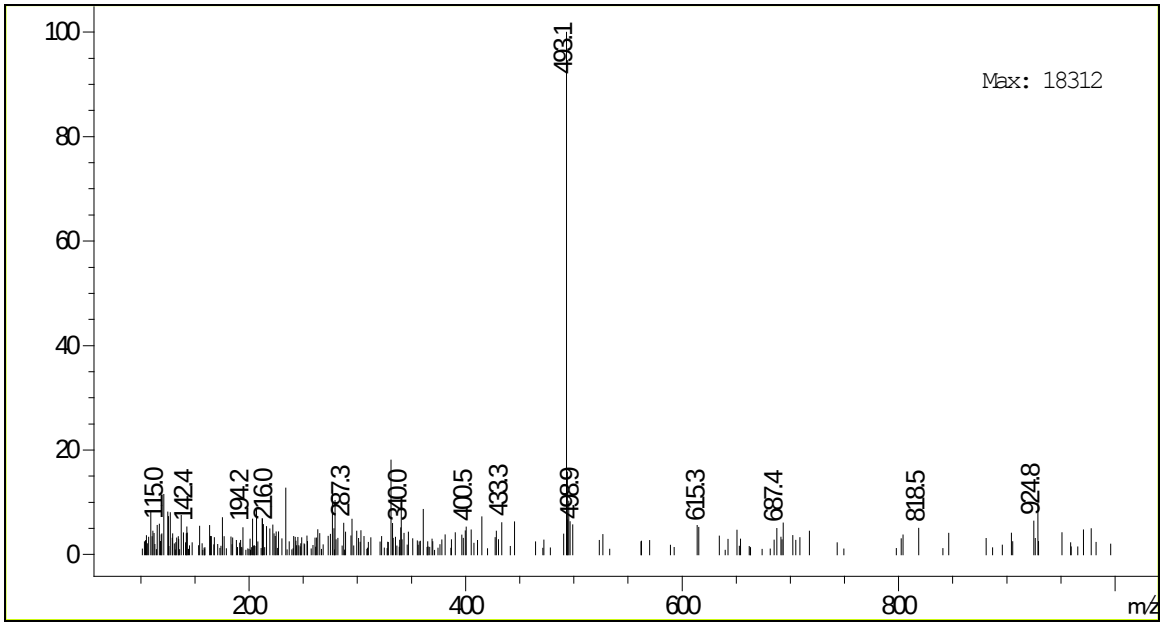
Şekil 4.61. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ile elde edilen 0.1-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği



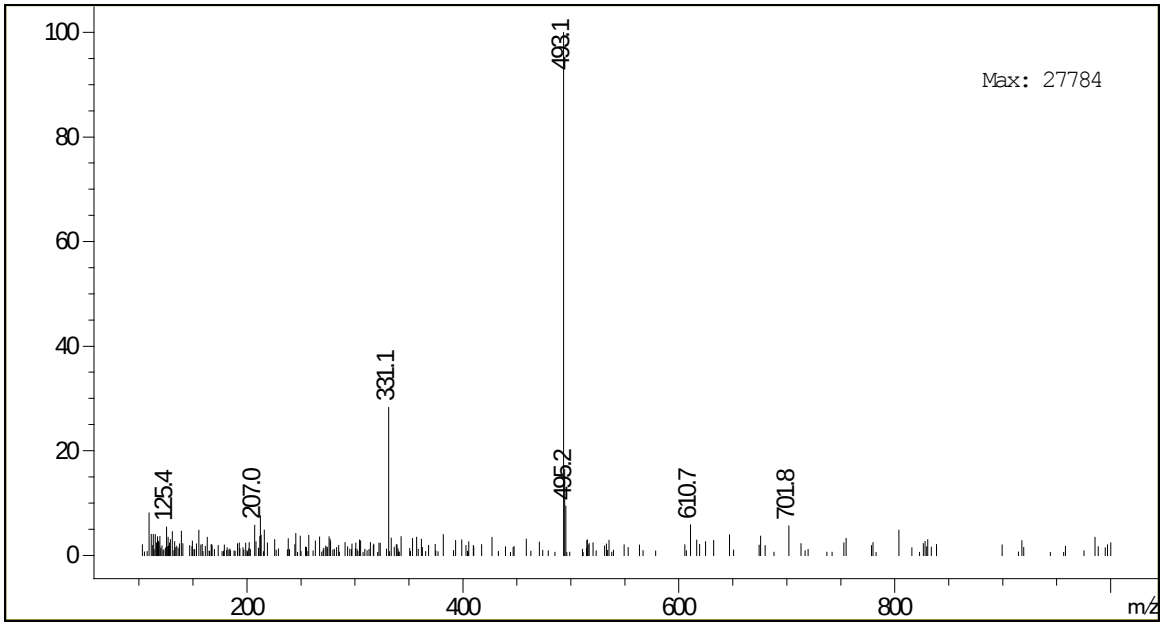
Şekil 4.62. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.5 ppm için) ait kütle spektrumu



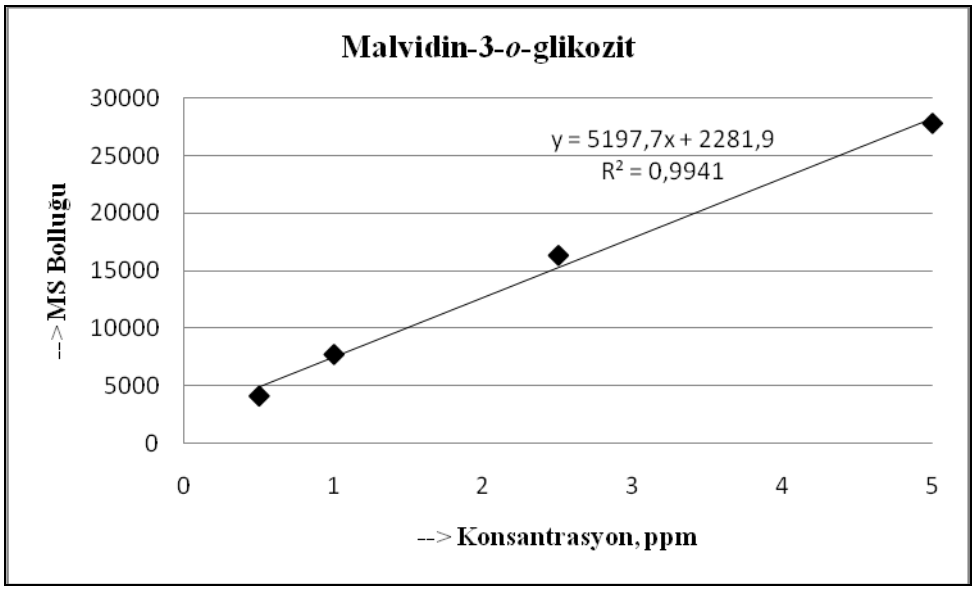
Şekil 4.63. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.64. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 4.65. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu

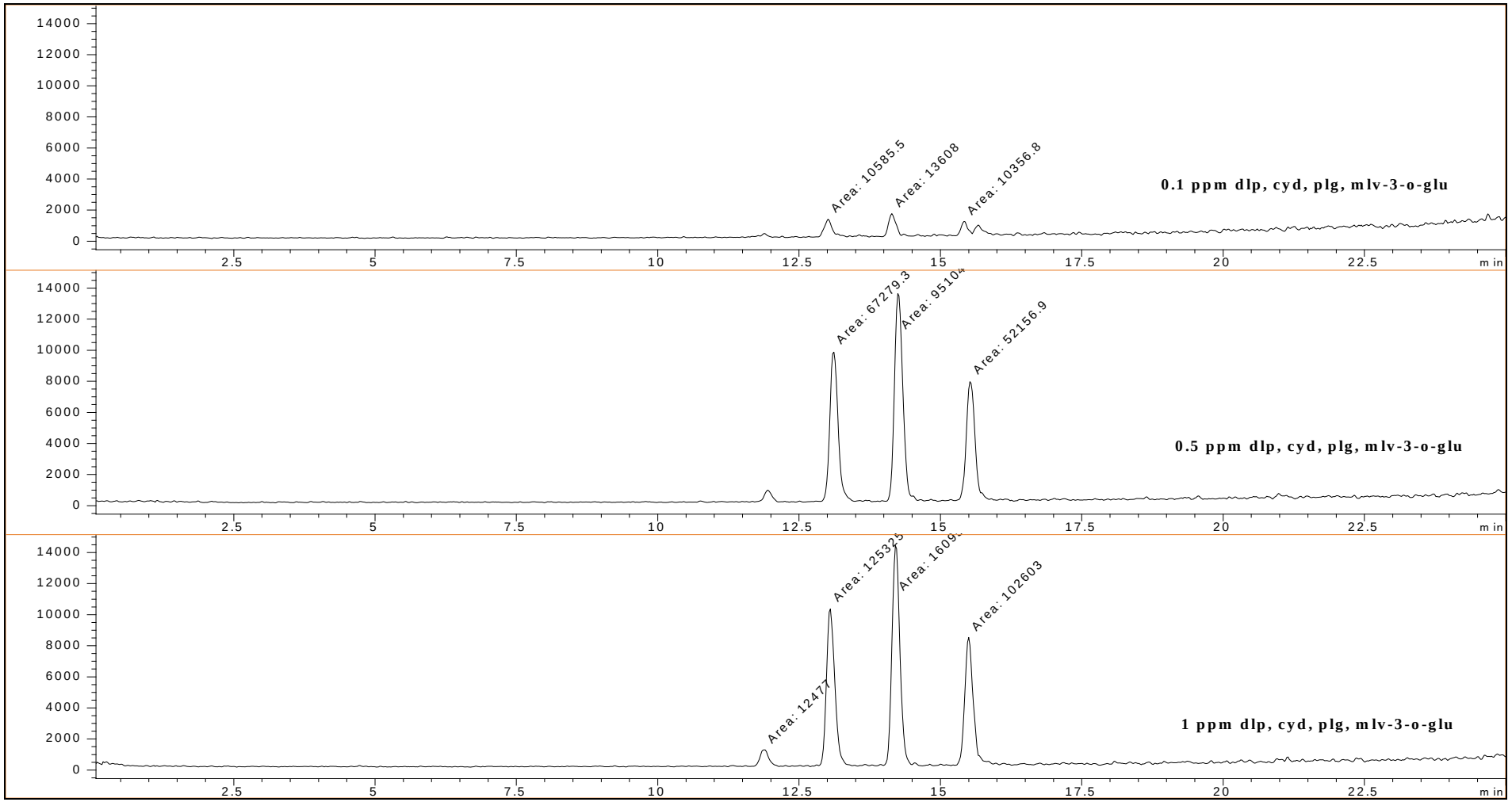


Şekil 4.66. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin MS bolluğu ile elde edilen 0.5-5 ppm aralığına ait kalibrasyon grafiği

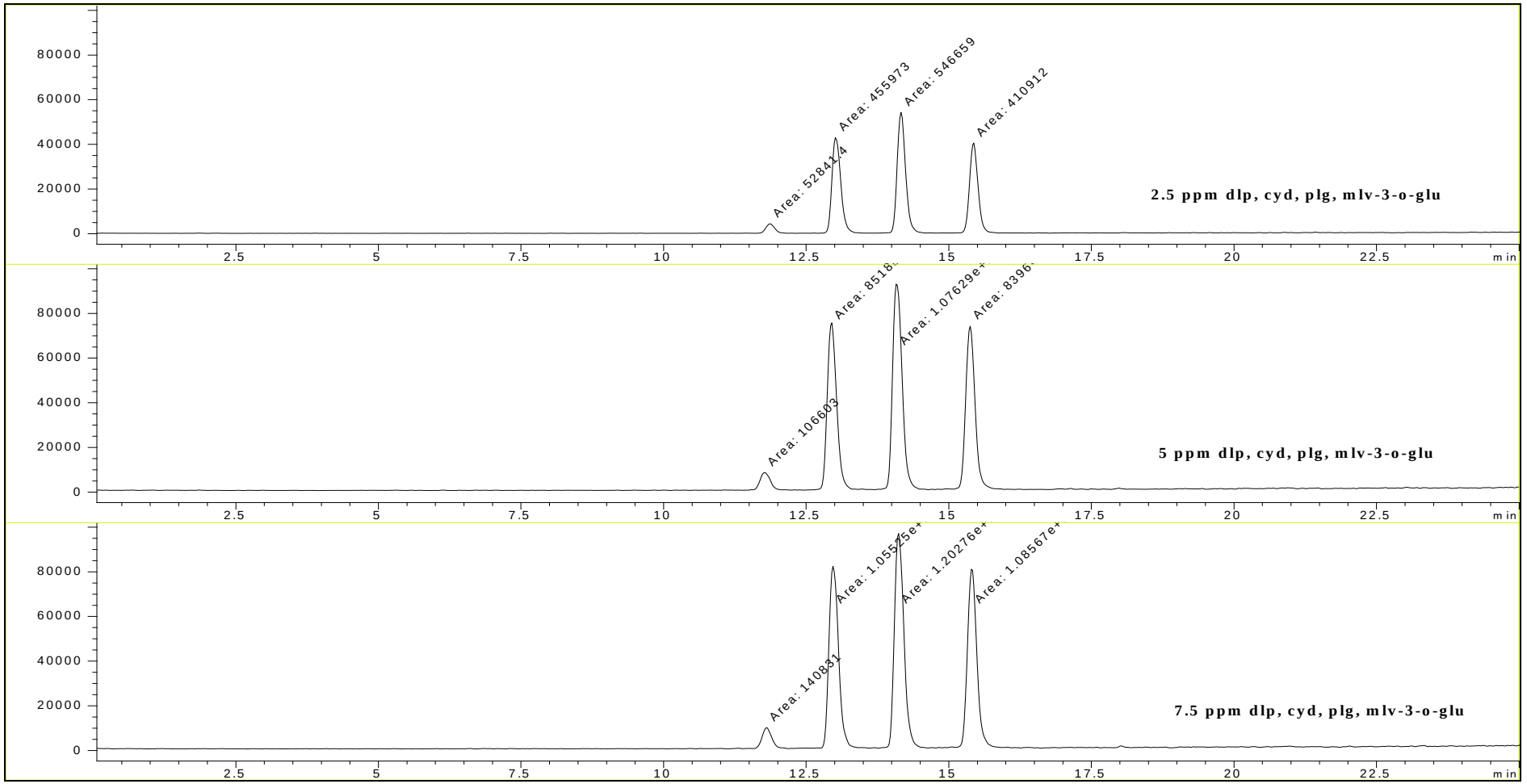
4.4.5. Delfinidin-3-*o*-glikozit, Siyanidin-3-*o*-glikozit, Pelargonidin-3-*o*-glikozit ve Malvidin-3-*o*-glikozit Bileşiklerini Birlikte İçeren Kromatogramların Elde Edilmesi

Bu amaçla, delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile ilgili optimum çalışma şartlarının aynı olmasından yararlanıldı. Yukarıda verilen kromatogramlardan dört bileşik için bulunan optimum değerler; akış hızı 0.5 mL/dk, fragmentasyon voltajı 110 V, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 30 ºC olarak uygulandı. Dört bileşiği içeren standart çözeltiler hazırlanarak optimum çalışma şartlarındaki parametreler uygulanarak bir analizde dört bileşik analiz edildi. Şekil 4.67-4.70' de 0.1-200 ppm aralığında dört bileşiği de içeren kromatogramlar görülmektedir.

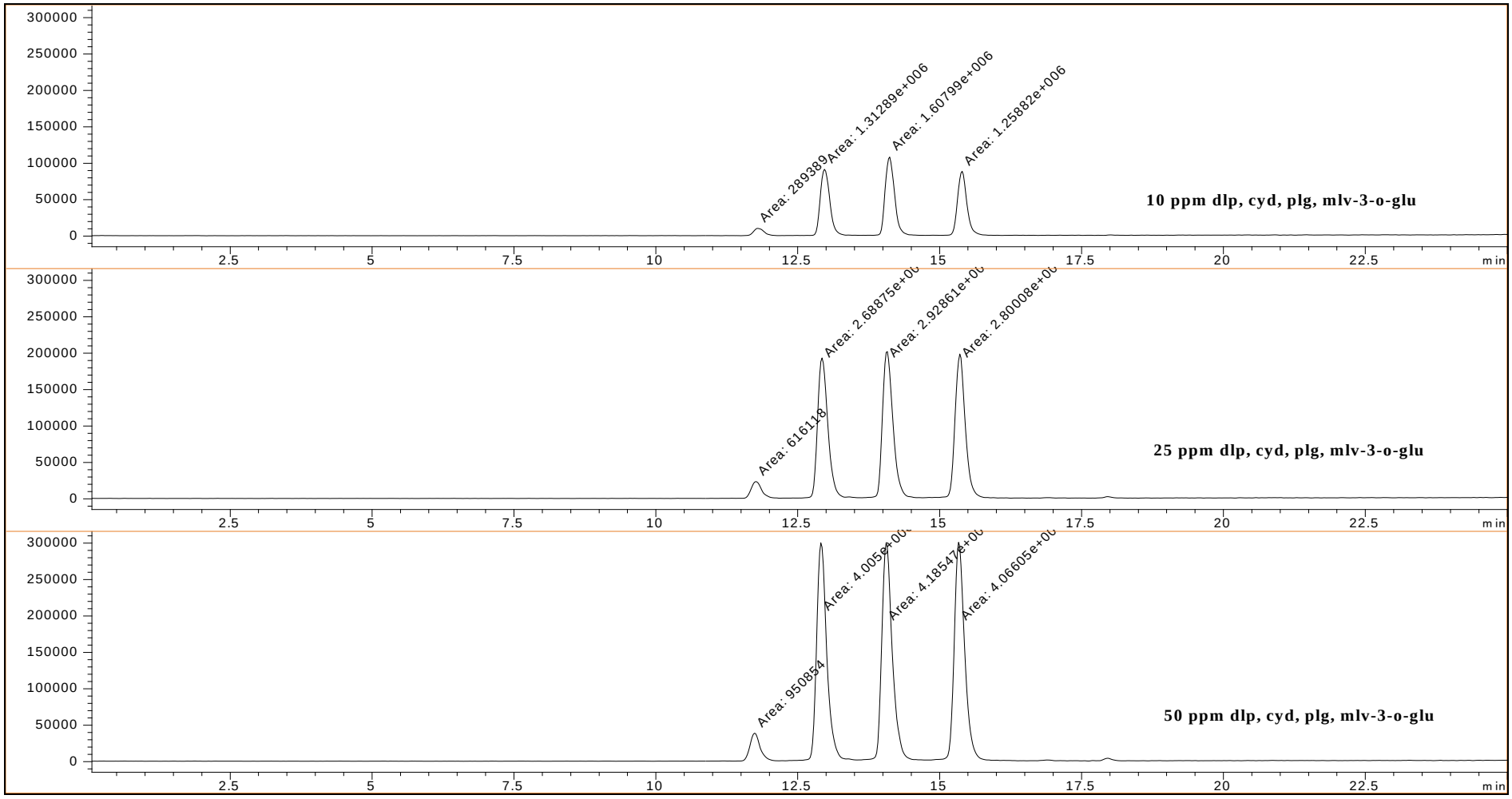
Bu şekillerdeki kromatogramlarda görüldüğü gibi çalışılan her bir bileşik birbirinden farklı alıkonma süresinde pik vermektedir. Yine bu kromatogramlardan delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için 0.1 ppm için piki gözlenmedi, diğer bileşikler için 0.1-200 ppm aralığında değerlendirilebilir pikler elde edildi. Bu bileşiklerden pelargonidin-3-*o*-glikozitin en yüksek duyarlılıkta tayin edilebildiği bulundu.



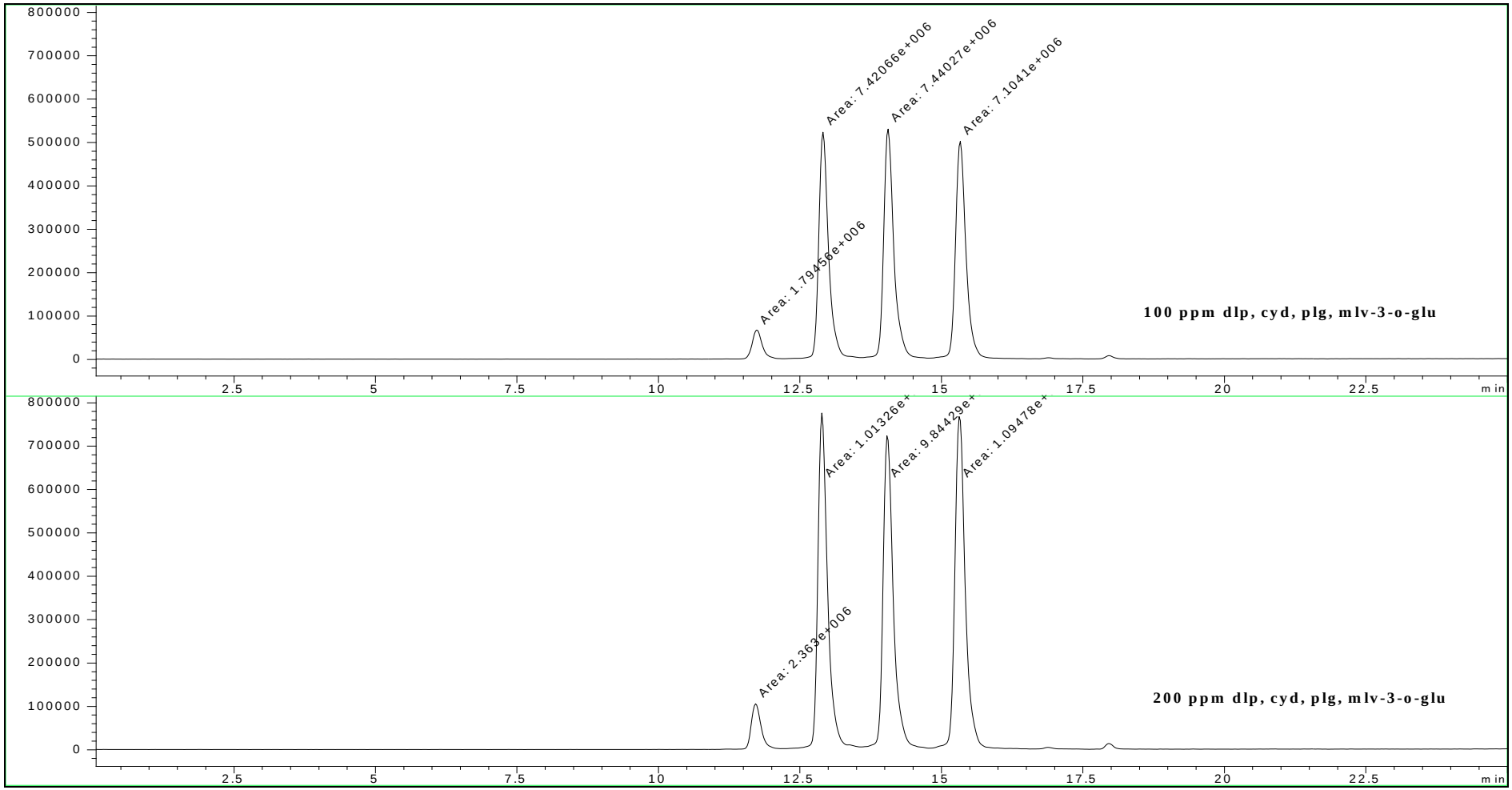
Şekil 4.67. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 0.5 ve 1 ppm için) ait kromatogramlar



Şekil 4.68. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5, 5 ve 7.5 ppm için) ait kromatogramlar



Şekil 4.69. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10, 25 ve 50 ppm için) ait kromatogramlar



Şekil 4.70. HPLC-ESI-MS ile delfinidin, siyanidin, pelargonidin, malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (100 ve 200 ppm için) ait kromatogramlar

4.5. Toplam Antosiyanin Tayini

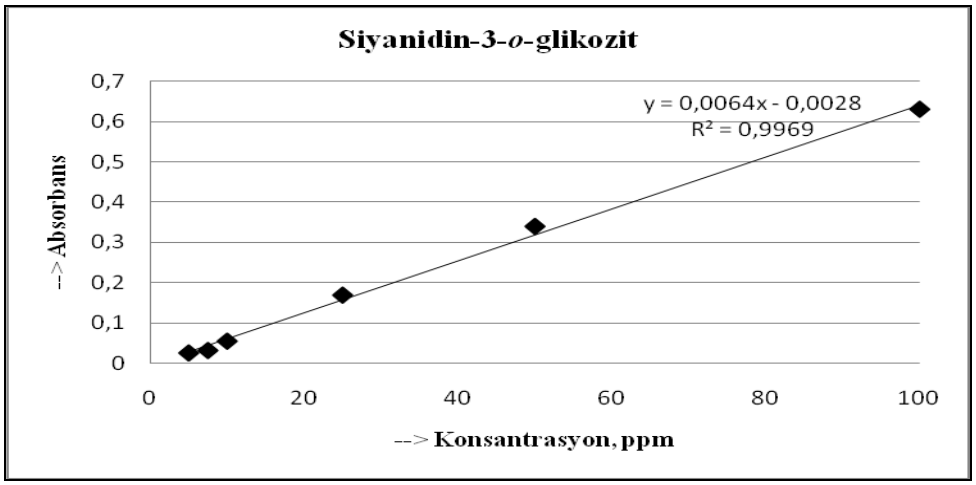
Meyve ekstraklarında bulunan toplam antosiyanin miktarı pH farkı metodu kullanılarak yapıldı [55]. Bu metot için iki ayrı çözelti hazırlandı. Birinci çözelti, 0,025 mol/L potasyum klorür (KCl) çözeltisine HCl eklenerek pH=1,0' e ayarlandı. İkinci çözelti ise 0,4 mol/L sodyum asetat (CH_3COONa) içeren pH=4,5' taki tampon çözeltisi (CH_3COONa/CH_3COOH) hazırlandı. Her bir x mL meyve ekstaktının pH değeri 1,0 ve 4,5 olacak şekilde hazırlanan çözeltiler kullanılarak ayarlandı. Harcanan çözelti hacmi dikkate alınarak ekstraktlar için seyrelme faktörü olarak kaydedildi ve 30 dk beklendi. Bu süre sonunda hazırlanan herbir örnek için 510 ve 700 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Okunan absorbans değerleri;

$$A= (A_{510}-A_{700})_{pH1.0} - (A_{510}-A_{700})_{pH4.5}$$

$$\text{mg siyanidin-3-glikozit/1000 g} = AxSFx1000xM/\varepsilon x1$$

eşitliğinde yerine konarak herbir ekstrakt için absorbans değeri bulundu. Siyanidin-3-*o*-glikozit için molekül ağırlığı 448.4 g/mol, molar soğurum katsayısı 34400, küvet genişliği 1 cm olarak alındı. Elde edilen değerler eşitlitlikte yerine konarak meyve ekstraktları için toplam antosiyanin değeri mg siyanidin-3-glikozit/1000 g örnek olarak bulundu.

Ayrıca, toplam antosiyanin miktarı tayini için standart çözeltilere de aynı işlemler uygulandı ve kalibrasyon grafiği elde edildi. Şekil 4.71' de 5-100 ppm aralığında çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanarak meyve örneklerindeki toplam antosiyanin miktarı hesaplandı.



Şekil 4.71. Toplam antosiyanin tayini için elde edilen kalibrasyon grafiği

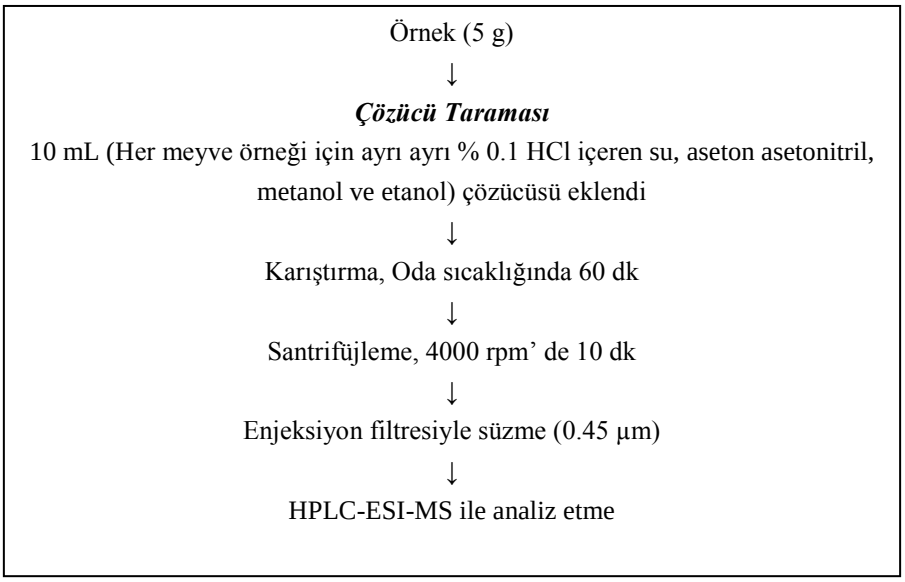
4.6. Örneklerin Analize Hazırlanması

Elazığ ve yöresinden mevsiminde temin edilen kiraz (*Prunus avium* L.*)*, çilek (*Fragaria vesca* L.*)* ve kızılcık (*Cornus mas* L.) uygun şekilde temizlendikten sonra -20 ºC' de analiz edilinceye kadar muhafaza edildi. Örnekler analiz edileceği zaman derin dondurucudan çıkartılıp blender ile homojenize edildi ve daha sonra ekstraksiyon işlemleri uygulandı. Ekstraksiyon işleminde her bir meyve örneği için farklı çözücü taraması, ekstraksiyon süresi, çözücü/katı oranı taraması gibi parametreler optimize edildi. Ekstraksiyon çalışmalarında bir parametre değiştirilirken, diğer parametrelerin optimum şartları dikkate alınarak ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ekstraksiyon parametreleri taramasında her bir taramada elde edilen meyve ekstraktlarındaki dört antosiyanin bileşiği HPLC-ESI-MS ile daha önceden optimize edilen şartlar dikkate alınarak tayin edildi. Ayrıca meyve ekstraktlarındaki toplam antosiyanin miktarı ise pH farkı metodundan yararlanılarak UV spektrofometresi ile tayin edildi.

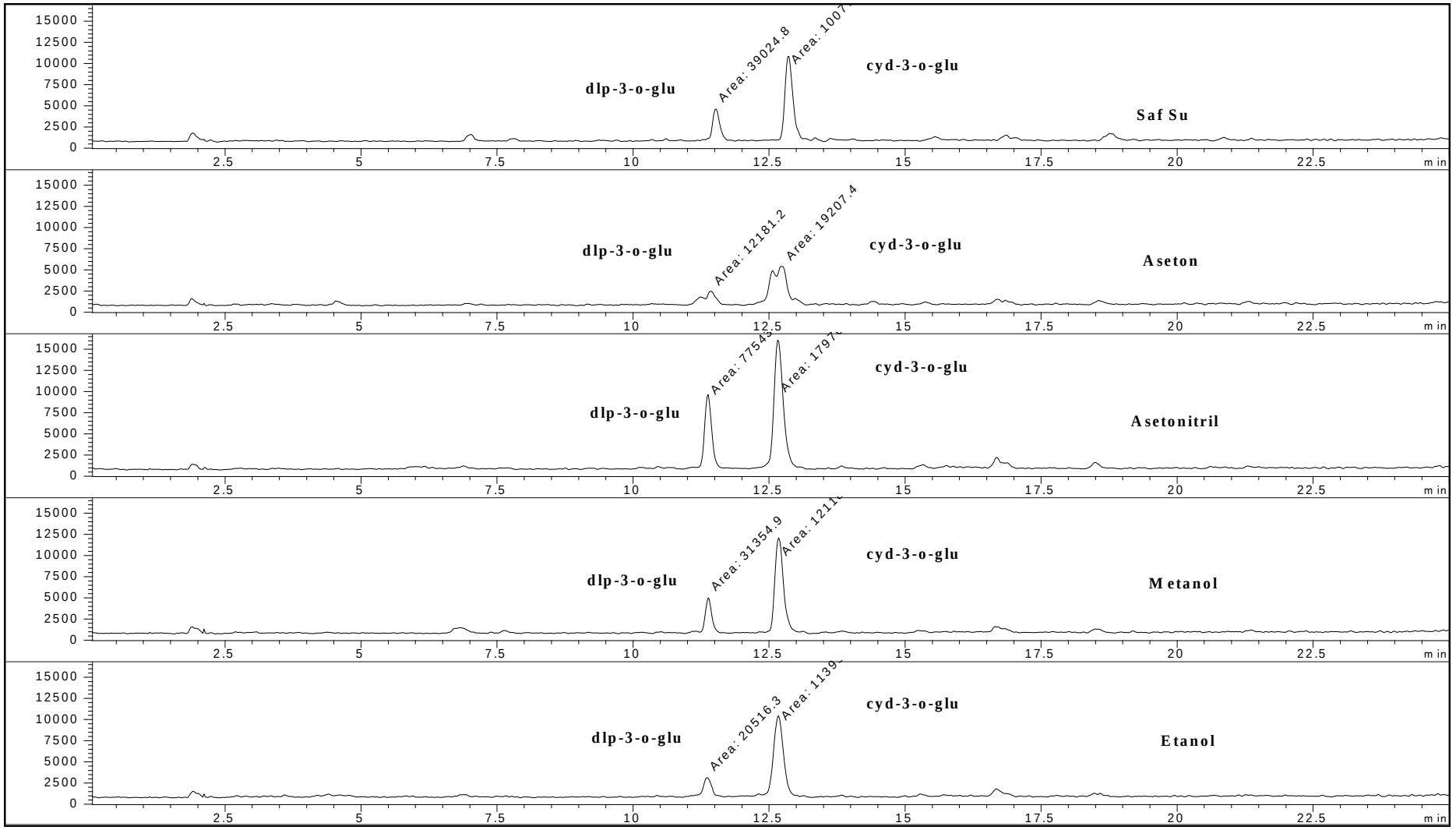
4.6.1. Meyve Örneklerinin Ekstraksiyonu

4.6.1.1. Çözücü Taraması

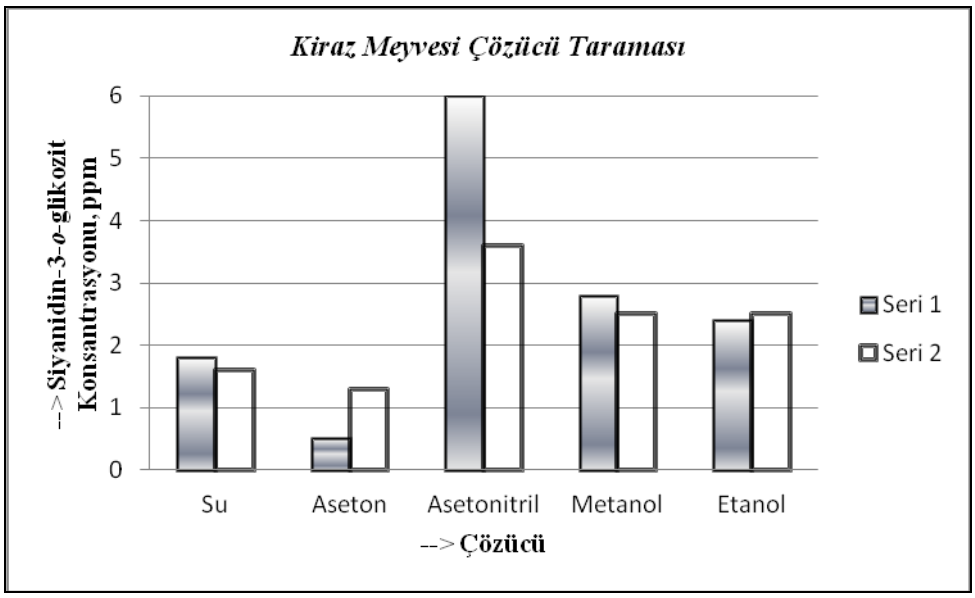
Çalışılan antosiyanin bileşiklerinin polar özelliklerinin baskın olması nedeniyle 5 polar çözücü denendi. Ekstraksiyon esnasında ve ölçümün sonuna kadar oksidasyonu önlemek için çözücülere seyreltik HCL eklendi. Homojenize edilmiş olan kiraz, çilek ve kızılcık meyvelerinden 5 g' lık örnekler tartıldı. Her bir tartıma % 0.1 HCl içeren su, aseton, asetonitril, metanol ve etanol çözücülerinden 10' ar mL ayrı ayrı eklenerek oda sıcaklığında 60 dk karıştırıldı ve ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar 4000 rpm' de 10 dk santrifüjlendi. Çözelti kısmı alındı ve 0.45 μm' lik enjeksiyon filtresinden geçirildikten sonra HPLC-ESI-MS cihazında analiz edildi. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 4.72' de verildi. Elde edilen kromatogramlar kiraz için Şekil 4.73-4.74, çilek için Şekil 4.75-4.77 ve kızılcık için Şekil 4.78-4.80' de verildi. Bu kromatogramların pik simetrisi, alanı ve örneklerdeki konsantrasyon dikkate alındığında kiraz ve kızılcık örnekleri için en iyi çözücünün asitlendirilmiş asetonitril olduğu, çilek için ise asitlendirilmiş metanol olduğu bulundu.



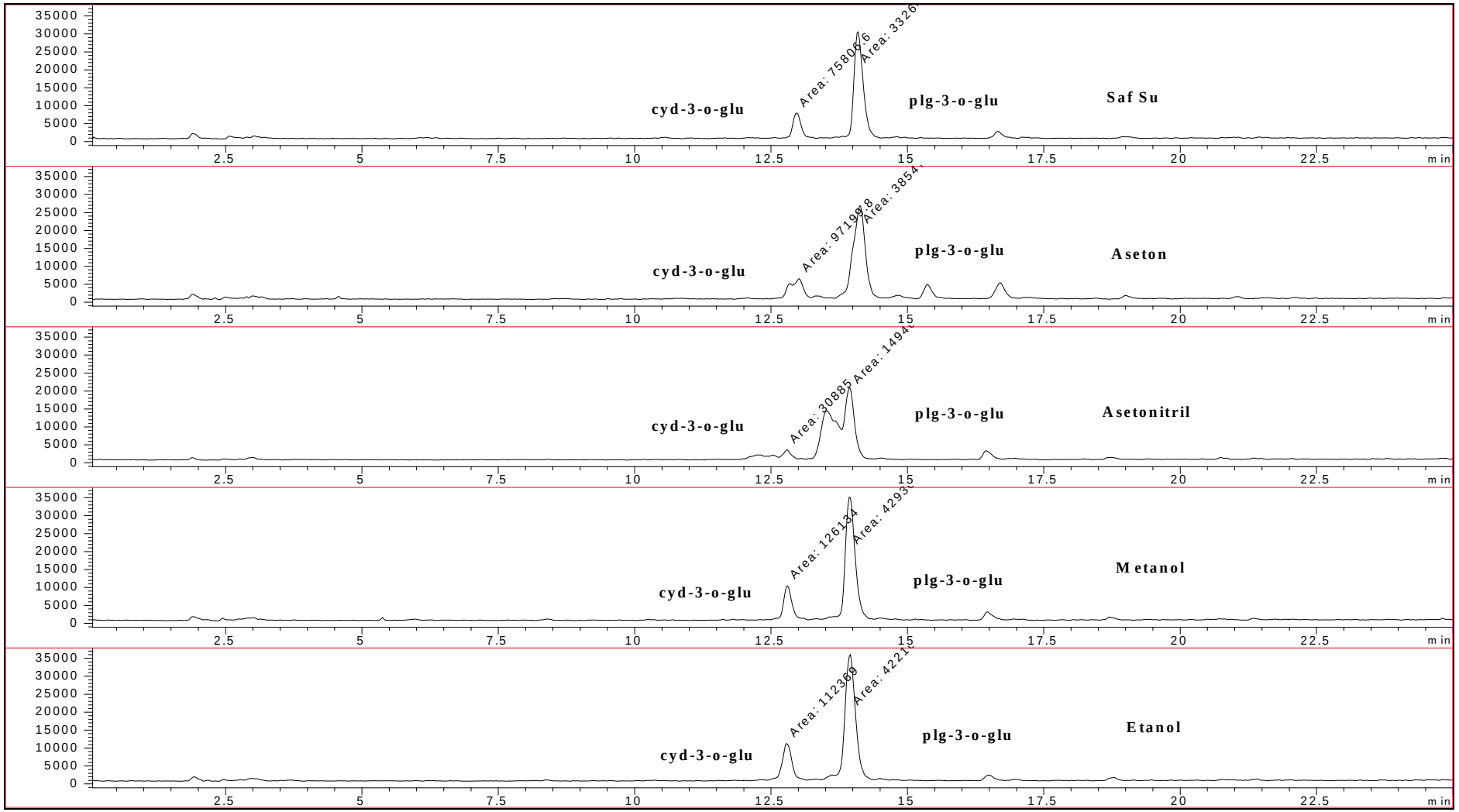
Şekil 4.72. Çözücü optimizasyonu işleminin basamakları



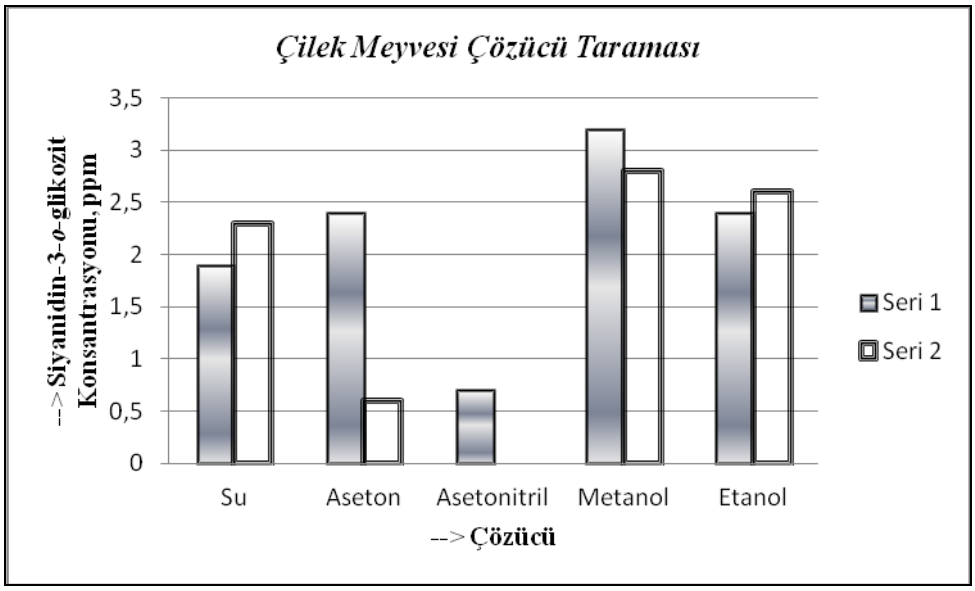
Şekil 4.73. Kiraz meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



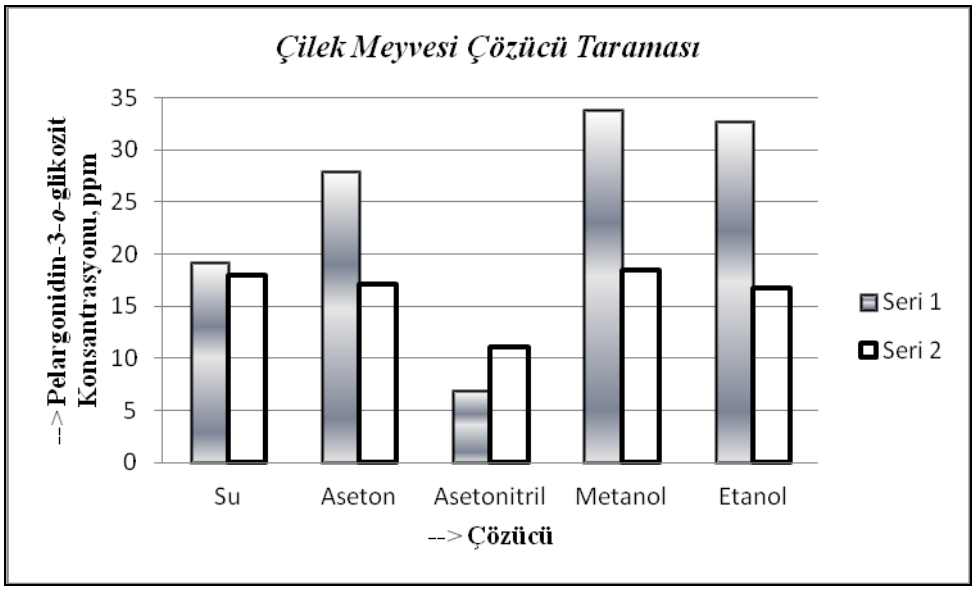
Şekil 4.74. Çözücü taraması sonucu kiraz meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



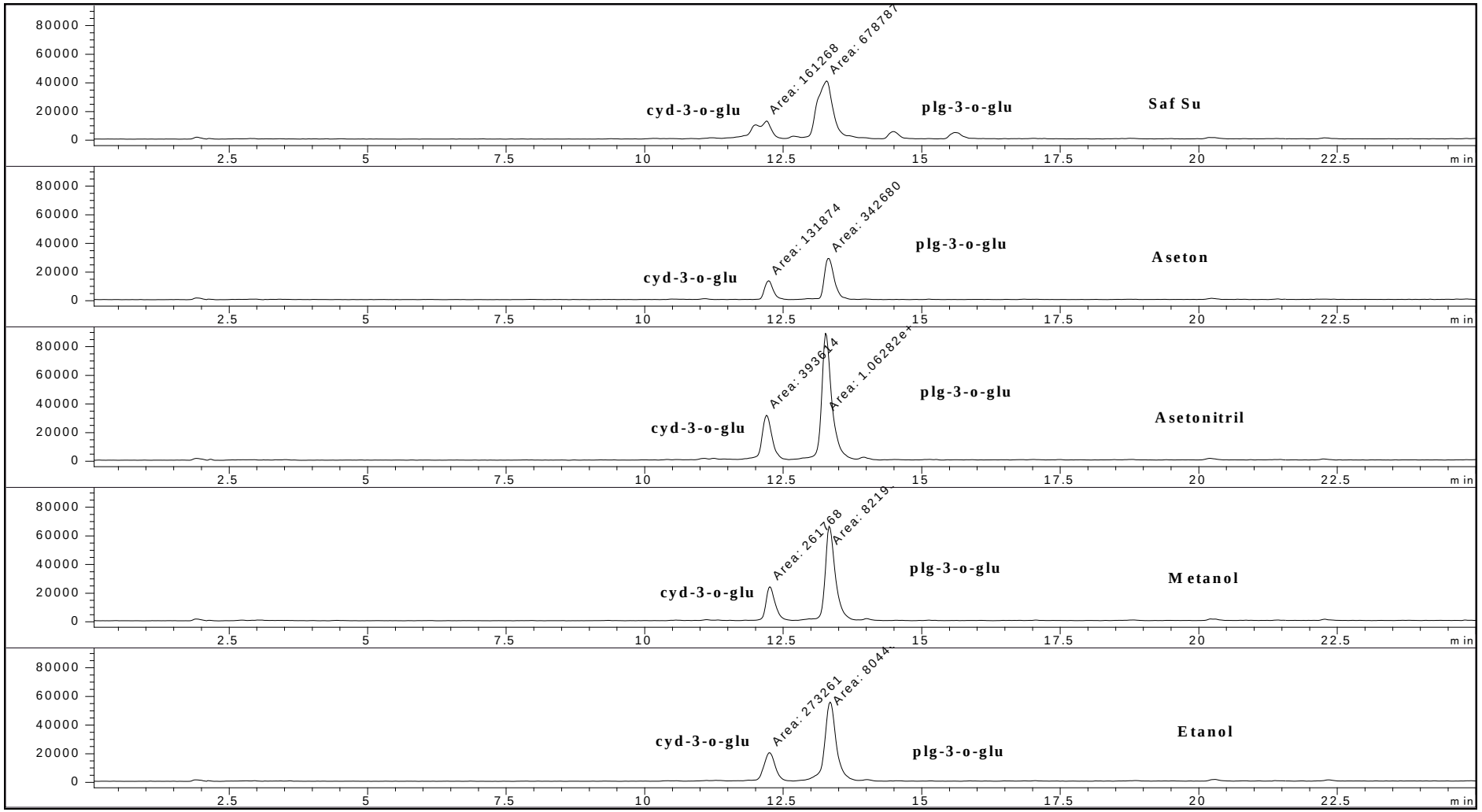
Şekil 4.75. Çilek meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



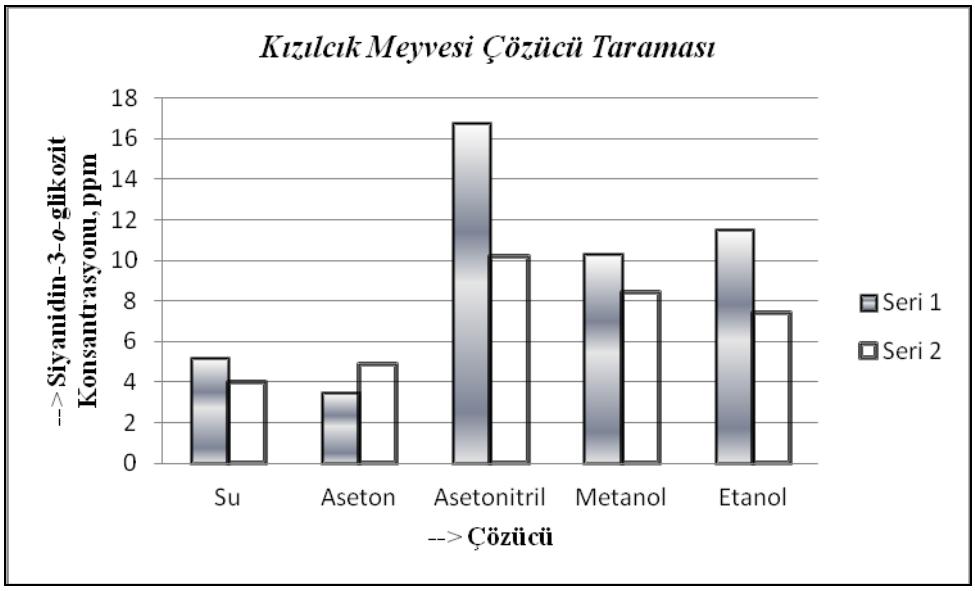
Şekil 4.76. Çözücü taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



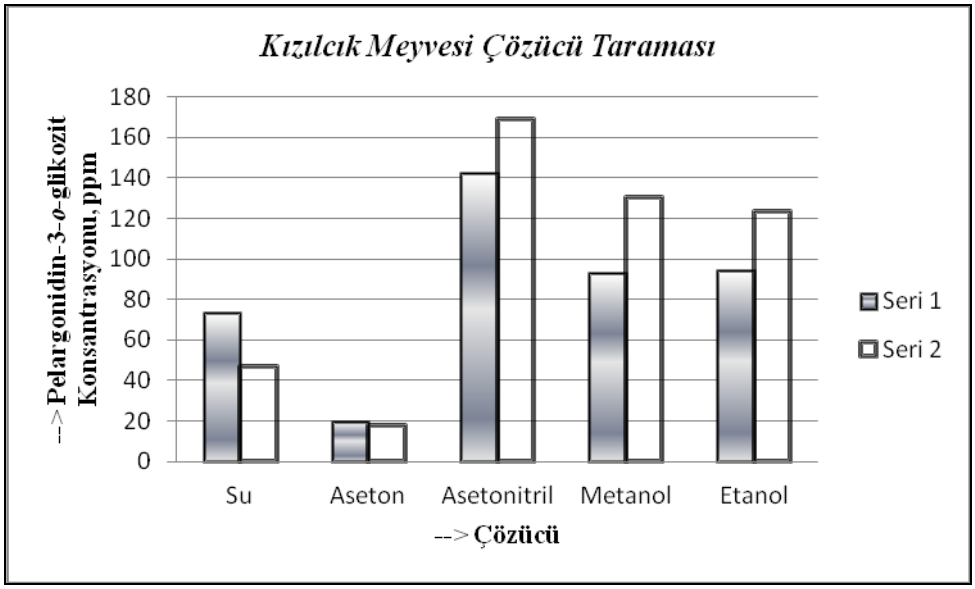
Şekil 4.77. Çözücü taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



Şekil 4.78. Kızılcık meyvesine ilişkin çözücü taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



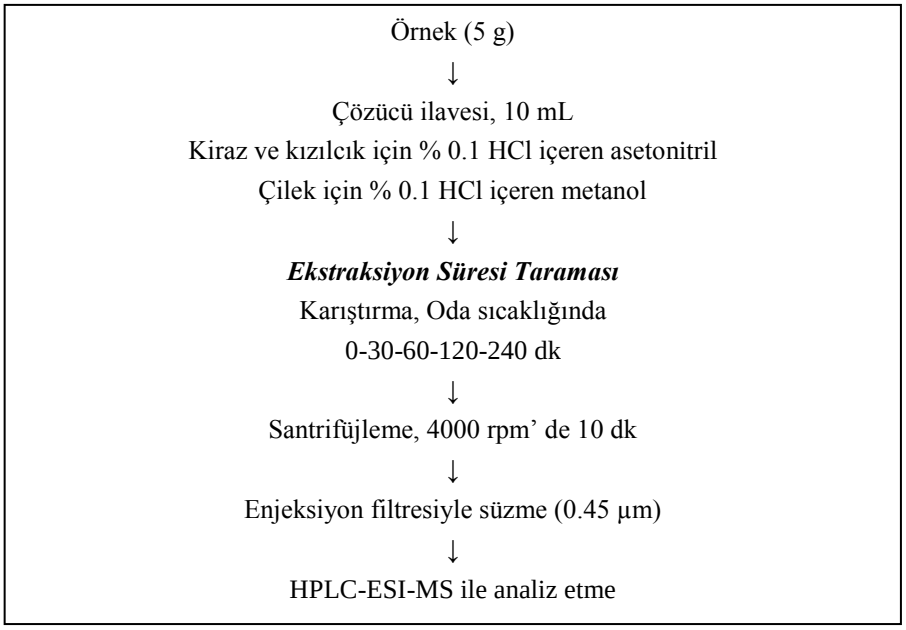
Şekil 4.79. Çözücü taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



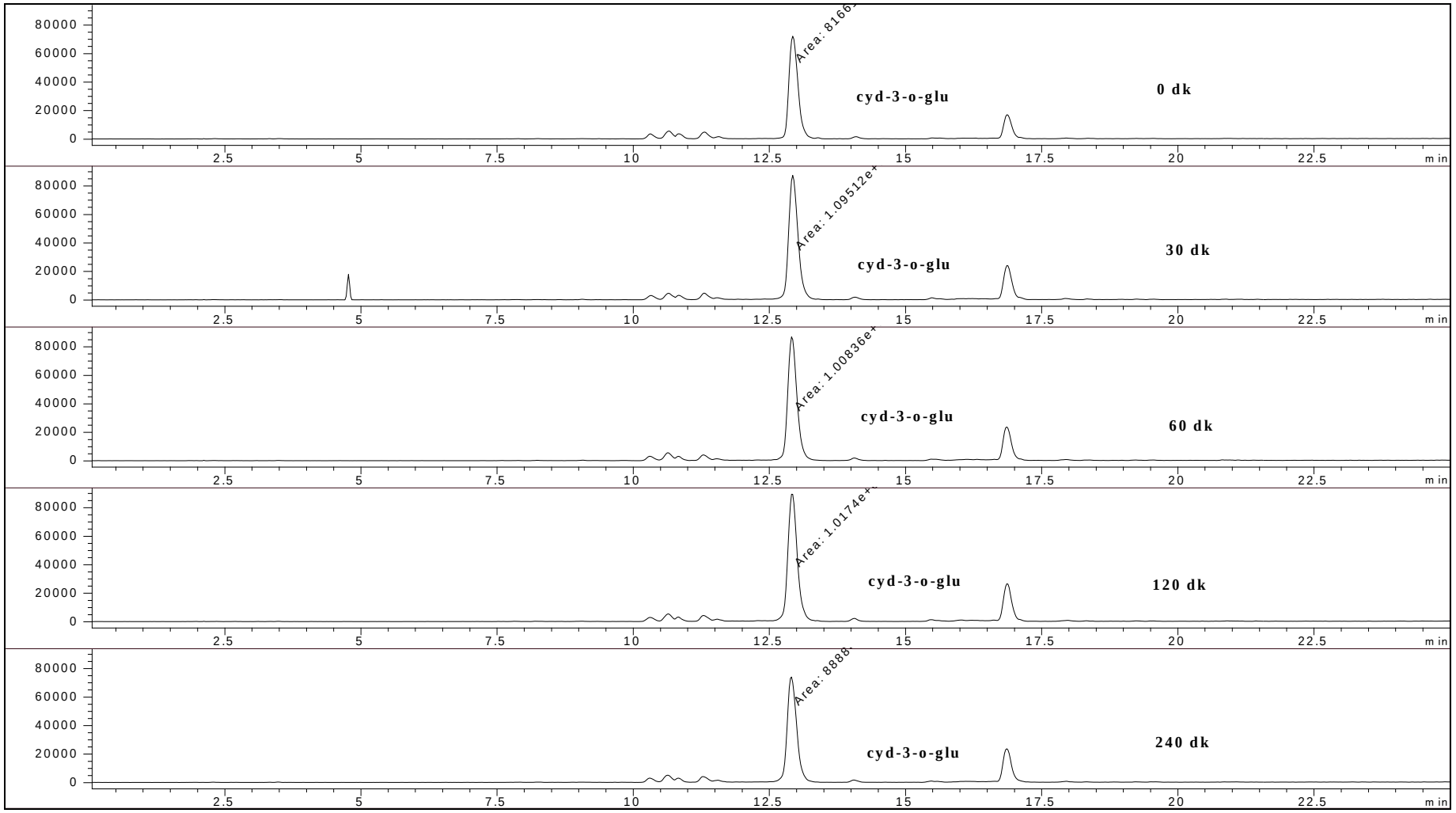
Şekil 4.80. Çözücü taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu

4.6.1.2. Ekstraksiyon Süresi Taraması

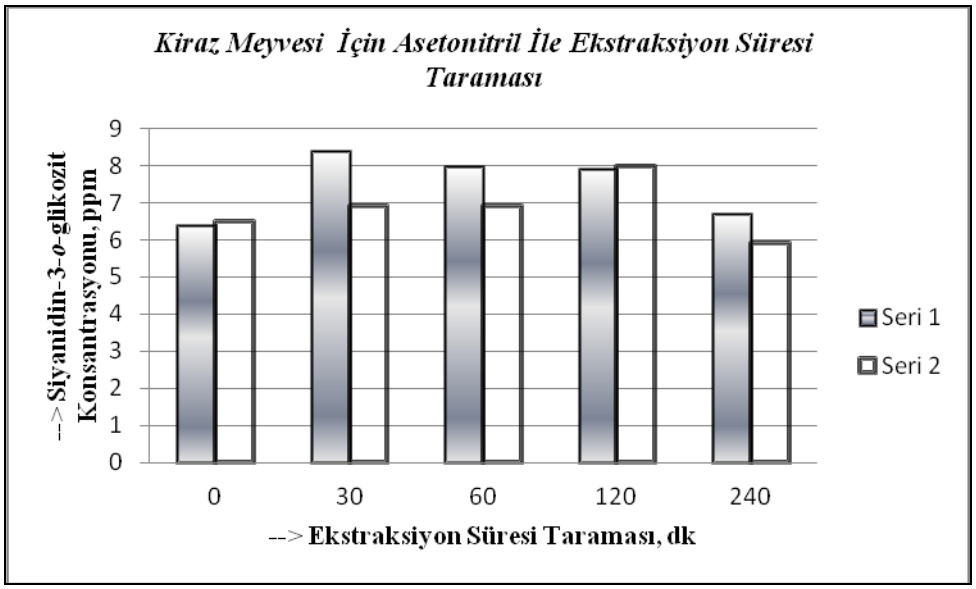
Kiraz, çilek ve kızılcık meyvelerine uygulanan çözücü taramasında her meyve için elde edilen çözücü dikkate alınarak farklı ekstraksiyon süresi taraması uygulandı. Homojenize edilmiş olan meyvelerden 5 g' lık örnekler tartıldı. Kiraz ve kızılcık (% 0.1 HCl içeren asetonitril), çilek (% 0.1 HCl içeren metanol) meyvelerine kendi çözücülerinden 10' ar mL eklendi ve 0-30-60-120 ve 240 dakika arasında ekstraksiyon süresi tarandı. Elde edilen ekstraktlar 4000 rpm' de 10 dk santrifüjlendi. Çözelti kısmı alındı ve 0.45 µm' lik enjeksiyon filtresinden geçirildikten sonra HPLC-ESI-MS cihazında analiz edildi. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 4.81' de verildi. Elde edilen kromatogramlar kiraz için Şekil 4.82-4.83, çilek için Şekil 4.84-4.86 ve kızılcık için Şekil 4.87-4.89' da verildi. Elde edilen kromatogramların pik simetrisi, alanı ve örneklerdeki konsantrasyon dikkate alındığında kiraz, çilek ve kızılcık meyveleri için en iyi ekstraksiyon süresinin 30 dk olduğu bulundu.



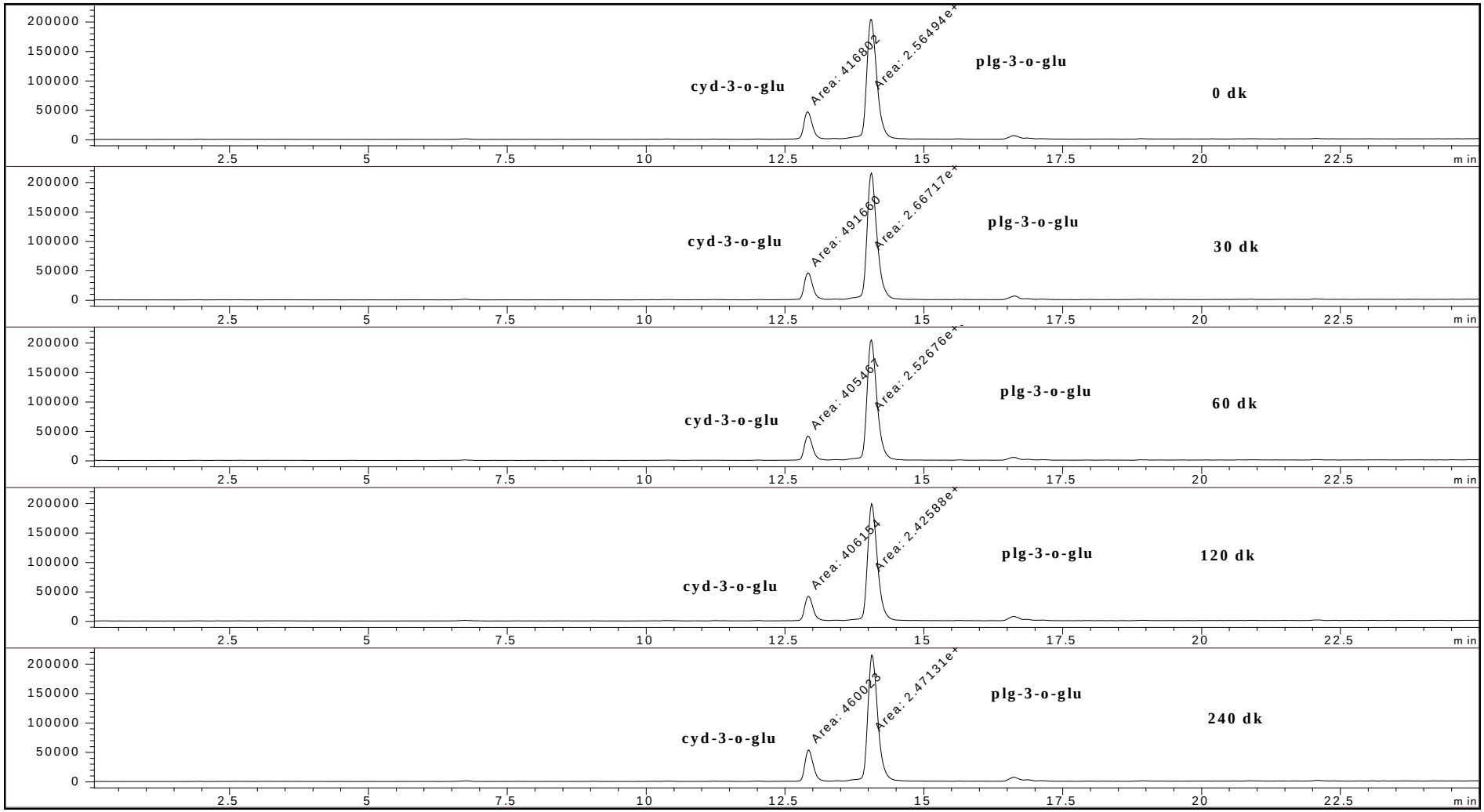
Şekil 4.81. Ekstraksiyon süresi optimizasyonu işleminin basamakları



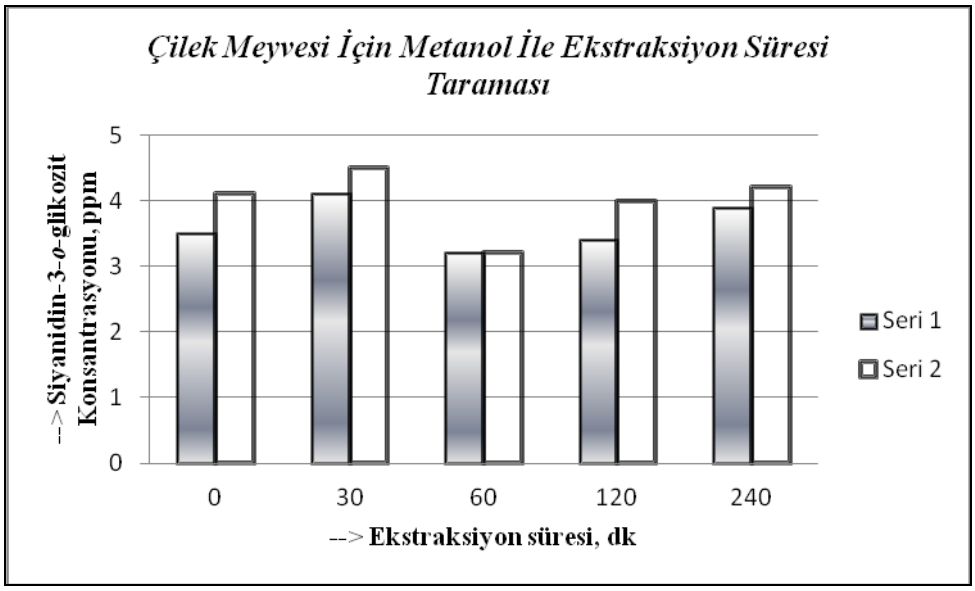
Şekil 4.82. Kiraz meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



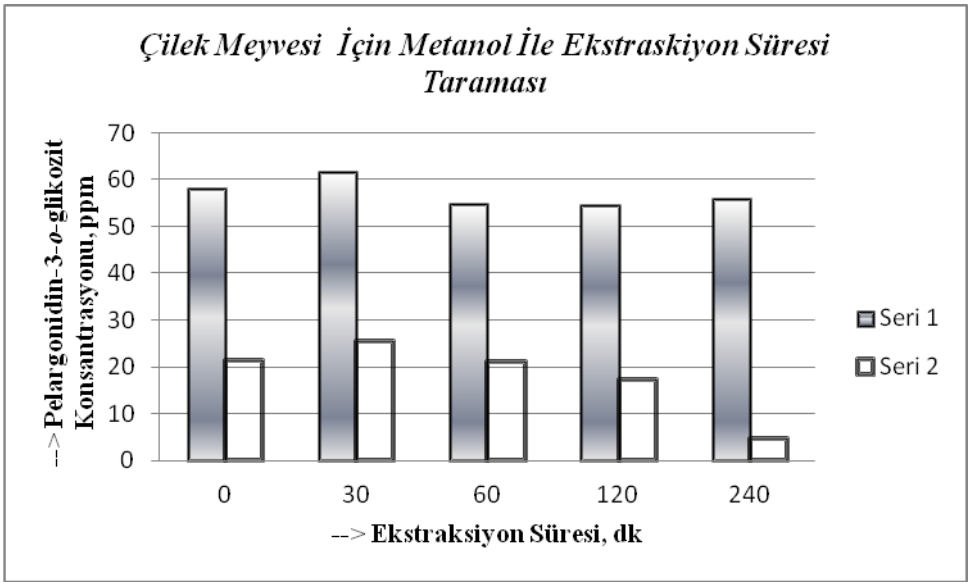
Şekil 4.83. Ekstraksiyon taraması sonucu kiraz meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



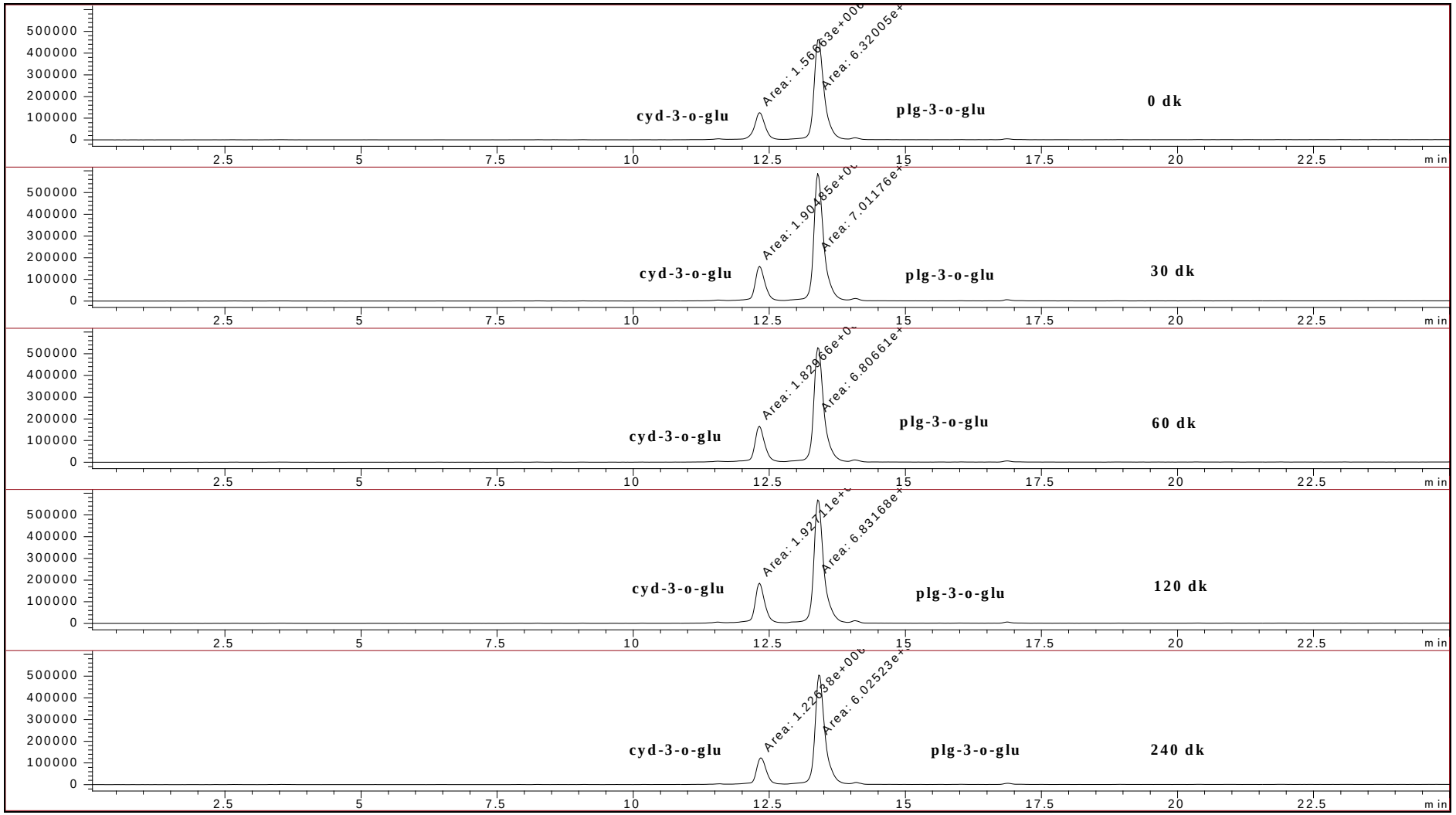
Şekil 4.84. Çilek meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



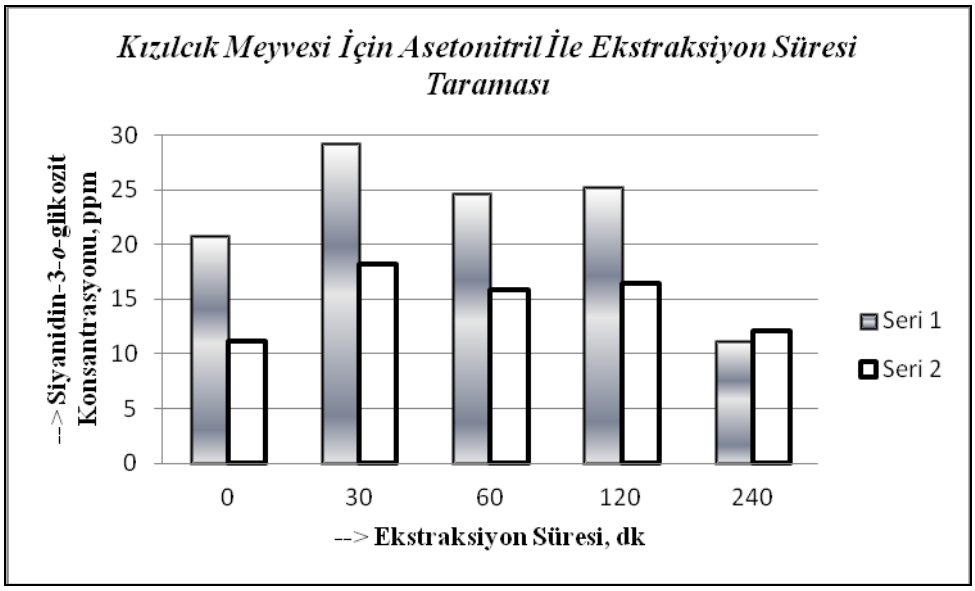
Şekil 4.85 Ekstraksiyon taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



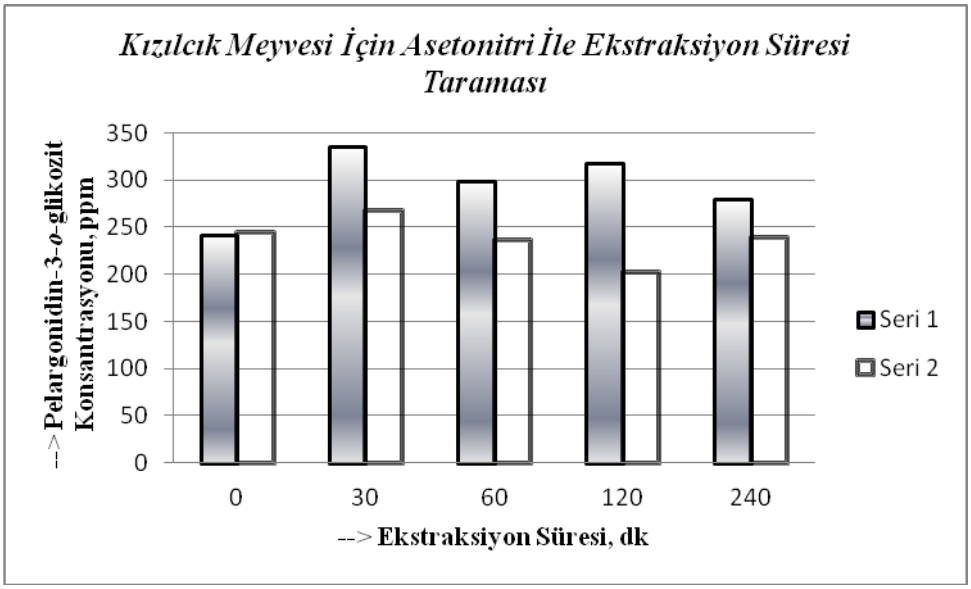
Şekil 4.86. Ekstraksiyon taraması sonucu çilek meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu



Şekil 4.87. Kızılcık meyvesine ilişkin ekstraksiyon süresi taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



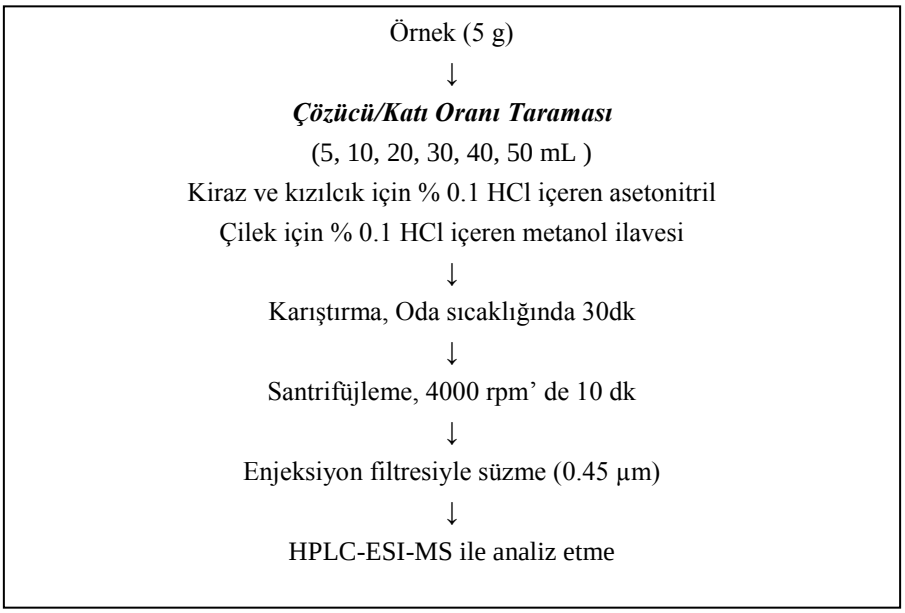
Şekil 4.88. Ekstraksiyon taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu.



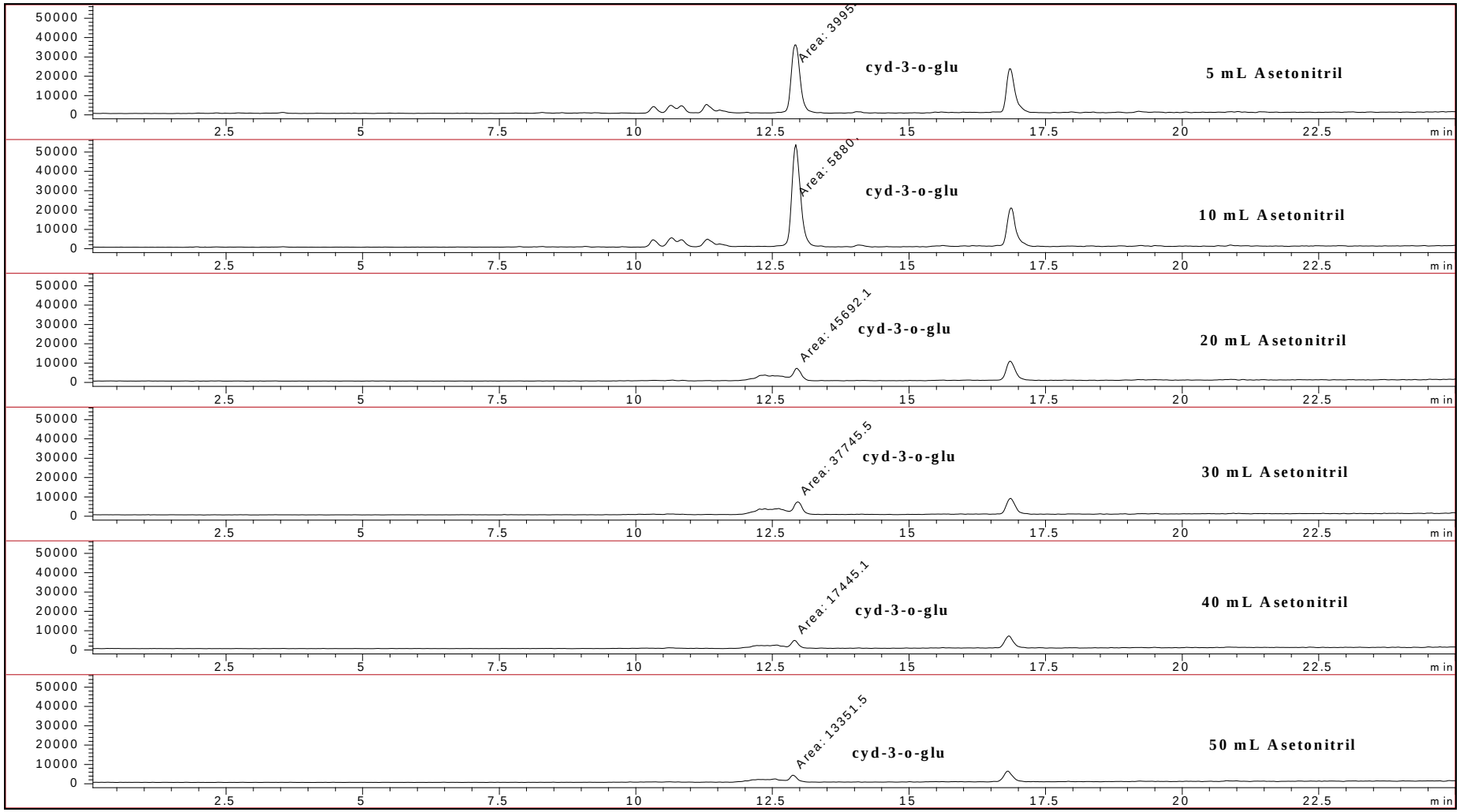
Şekil 4.89. Ekstraksiyon taraması sonucu kızılcık meyvesinde bulunan pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin kromatogram alanları ve MS bolluğu ile elde edilen konsantrasyonu

4.6.1.3. Çözücü/Katı Oranı Taraması

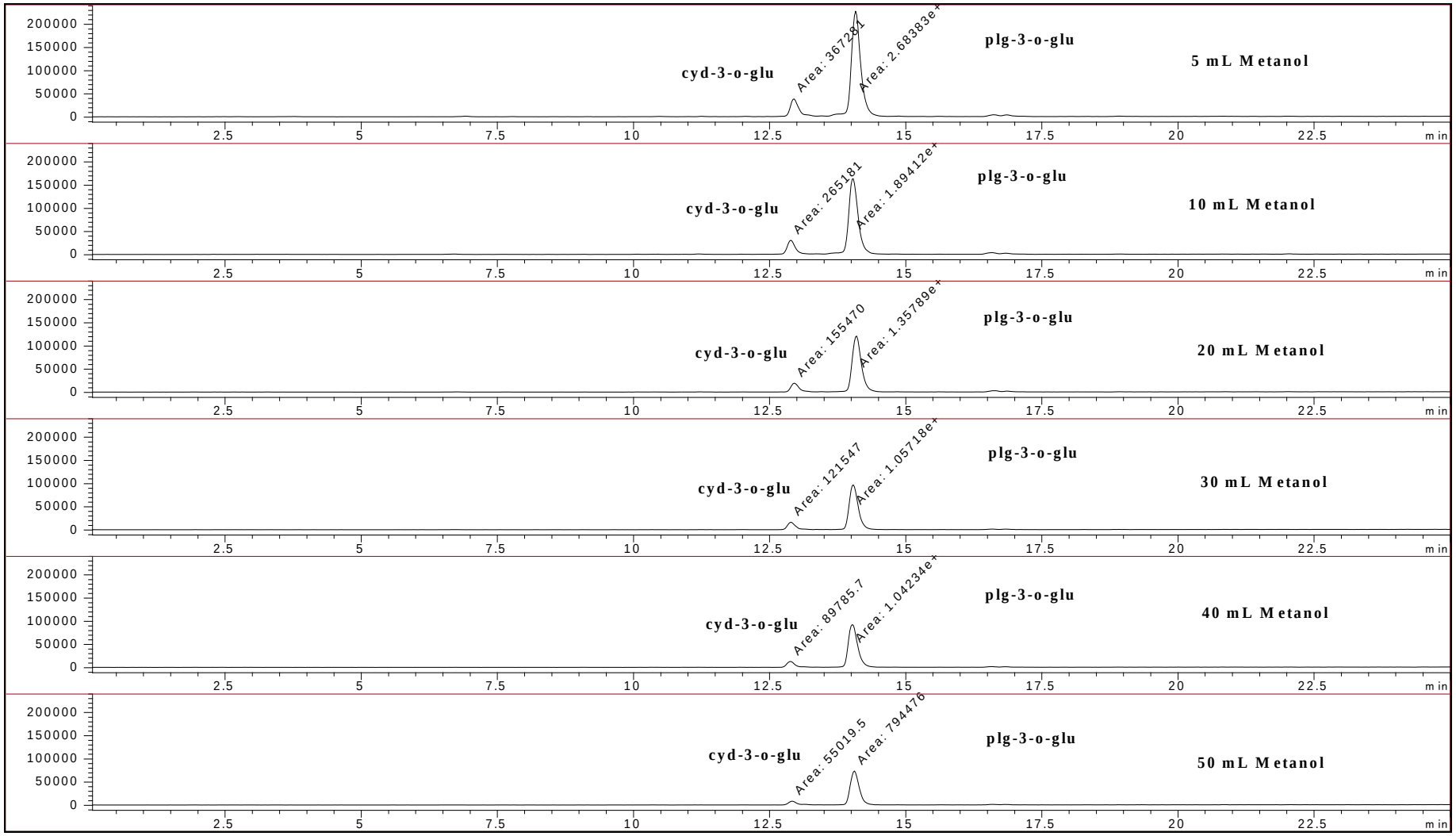
Kiraz, çilek ve kızılcık meyvelerine uygulanan daha önce uygulanan çözücü taraması ve ekstraksiyon süresi dikkate alınarak çözücü/katı oranı taraması gerçekleştirildi. Homojenize edilmiş olan meyvelerden 5 g' lık örnekler tartıldı. Kiraz, kızılcık (% 0.1 HCl içeren asetonitril) ve çilek (% 0.1 HCl içeren metanol) meyvelerine kendi çözücülerinden 5-50 mL arasında eklendi ve 30 dk karıştırıldı ve ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar 4000 rpm' de 10 dk santrifüjlendi. Çözelti kısmı alındı ve 0.45 μm' lik enjeksiyon filtresinden geçirildikten sonra HPLC-ESI-MS cihazında analiz edildi. Uygulanan ekstraksiyon basamakları Şekil 4.90' da verildi. Elde edilen kromatogramlar kiraz için Şekil 4.91, çilek için Şekil 4.92 ve kızılcık Şekil 4.93' de verildi. Elde edilen kromatogramların pik simetrisi, alanı ve örneklerdeki konsantrasyon dikkate alındığında kiraz ve kızılcık örnekleri için çözücü/katı oranı 2/1 (v/w), çilek için ise çözücü/katı oranı 5/1 (v/w) olarak bulundu.



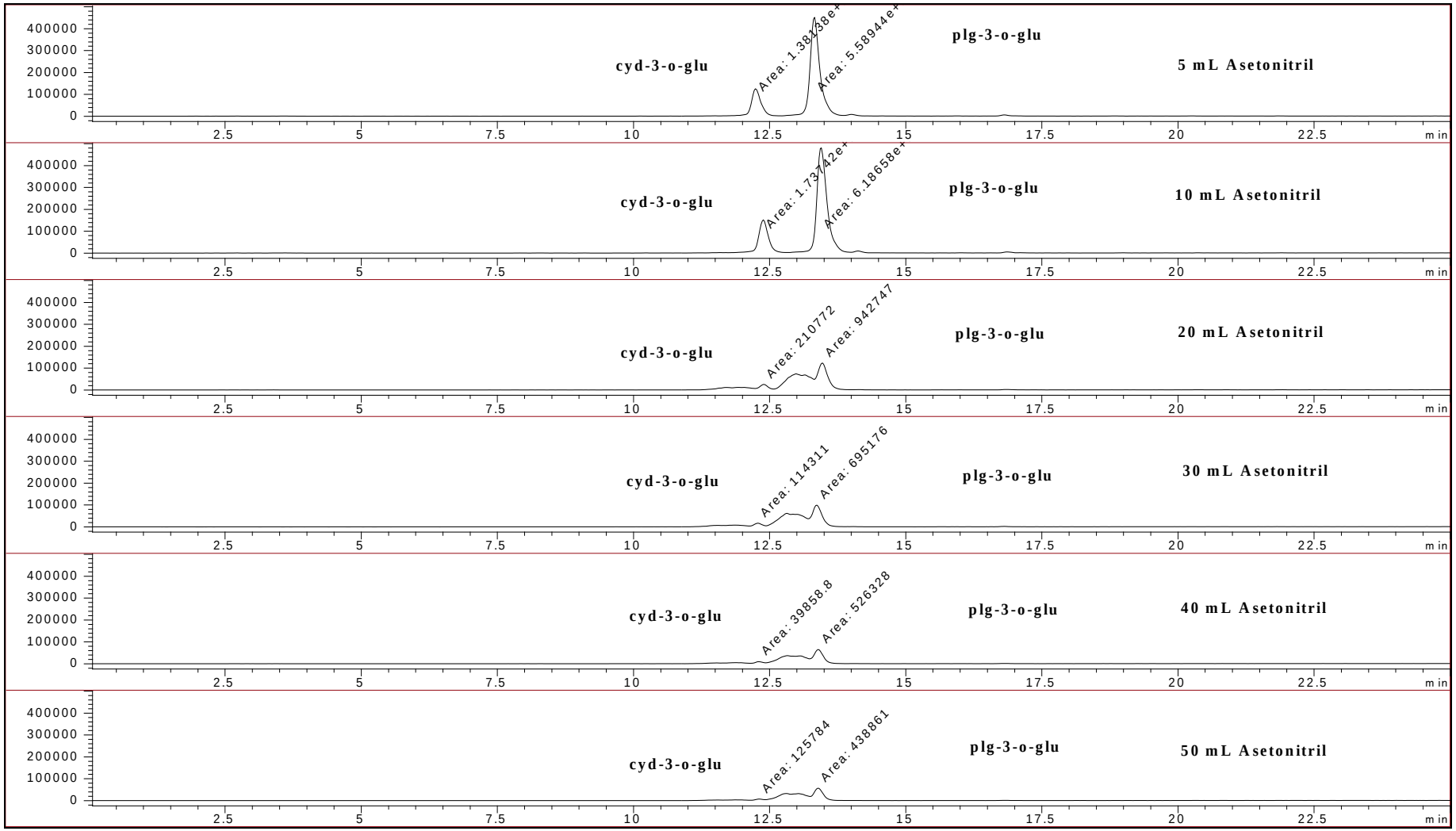
Şekil 4.90. Çözücü/katı oranı optimizasyonu işleminin basamakları



Şekil 4.91. Kiraz meyvesine ilişkin çözücü/katı oranı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



Şekil 4.92. Çilek meyvesine ilişkin çözücü/katı oranı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



Şekil 4.93. Kızılcık meyvesine ilişkin çözücü/katı oranı taraması sonucu elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları

5. BULGULAR

5.1. Antosiyanin Bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile Tayini İçin Bulunan Optimum Çalışma Sonuçları

Delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile optimum çalışma şartları belirlendi. Dört bileşiği içeren standart çözeltiler hazırlanarak ve optimum şartlar kullanılarak bir analizde dört bileşiğin tayini yapıldı.

Delfinidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.1), siyanidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.14), pelargonidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.33) ve malvidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.55) bileşikleri için 0.2-1 mL/dk aralığında akış hızı taraması yapıldı. Bileşiklere ait olan kromatogramların pik simetrileri, alıkonma süreleri ve alan değerleri de dikkate alındığında akış hızının 0.5 mL/dk olduğu bulundu.

Delfinidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.2), siyanidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.15), pelargonidin-3-*o*-glikozit (4.34) ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri (Şekil 4.56) için 10-190 V aralığında fragmentasyon voltajı taraması yapıldı. Bileşiklere ait olan kromatogramların pik simetrileri ve alan değerleri de dikkate alındığında fragmentasyon voltajının 110 V olduğu bulundu.

Delfinidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.3), siyanidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.16), pelargonidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.35) ve malvidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.57) bileşikleri için 1-45 µL aralığında enjeksiyon hacmi taraması yapıldı. 5 µL' den sonra pik simetrilerinin belirgin bir şekilde bozulduğu görüldü. Bileşiklere ait olan kromatogramların pik simetrileri ve alan değerleri de dikkate alındığında enjeksiyon hacminin 5 µL olduğu bulundu.

Delfinidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.4), siyanidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.17), pelargonidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.36) ve malvidin-3-*o*-glikozit (Şekil 4.58) bileşikleri için 20-50 ºC aralığında kolon sıcaklığı taraması yapıldı. Bileşiklere ait olan kromatogramların pik simetrileri, alıkonma süreleri ve alan değerleri de dikkate alındığında kolon sıcaklığının 30 ºC olduğu bulundu.

Sonuç olarak, antosiyanin bileşiklerinin HPLC-ESI-MS cihazı ile tayini için bulunan optimum çalışma koşulları Tablo 5.1' de verilmiştir.

Tablo 5.1. Antosiyanin bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile elde edilen optimum çalışma koşulları

HPLC-ESI-MS' de Çalışma Şartları	Delfinidin-3-o-glikozit	Siyanidin-3-o-glikozit	Pelargonidin-3-o-glikozit	Malvidin-3-o-glikozit
Akış Hızı (mL/dk)	0.5	0.5	0.5	0.5
Fragmentasyon (parçalayıcı) Voltajı (V)	110	110	110	110
Enjeksiyon Hacmi (µL)	5	5	5	5
Kolon Sıcaklığı (°C)	30	30	30	30
Alıkonma Süresi, t (dk)	11,32-11,78	12,74-13,07	13,93-14,23	15,27-15,57
Kolon Özellikleri	4x150 mm, 3µm Inertsil ODS-3	4x150 mm, 3µm Inertsil ODS-3	4x150 mm, 3µm Inertsil ODS-3	4x150 mm, 3µm Inertsil ODS-3

5.2 Meyve Örneklerine Uygulanan Ekstraksiyon Şartlarının Değerlendirilmesi

Elazığ ve yöresinden temin edilen kiraz *(Prunus avium* L.*)*, çilek (*Fragaria vesca* L.) ve kızılcık (*Cornus mas* L.) meyvelerine farklı ekstraksiyon işlemleri uygulandı. Ekstraksiyon işleminde her bir meyve örneği için farklı çözücü taraması, ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı gibi parametreler optimize edildi. Ekstraksiyon çalışmalarında bir parametre değiştirilirken, diğer parametrelerin optimum şartları dikkate alınarak ekstraksiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Ekstraksiyon parametreleri taramasında her bir taramada elde edilen meyve ekstraktlarındaki dört antosiyanin bileşiği HPLC-ESI-MS ile daha önceden optimize edilen şartlar dikkate alınarak tayin edildi. Ayrıca meyve ekstraktlarındaki toplam antosiyanin miktarı ise pH farkı metodundan yararlanılarak UV spektrofometresi ile tayin edildi.

Kiraz örneğinde optimum ekstraksiyon şartları belirlemede elde edilen kromatogramlar incelendi. Farklı çözücü taramasında; % 0.1 HCl içeren su, aseton,

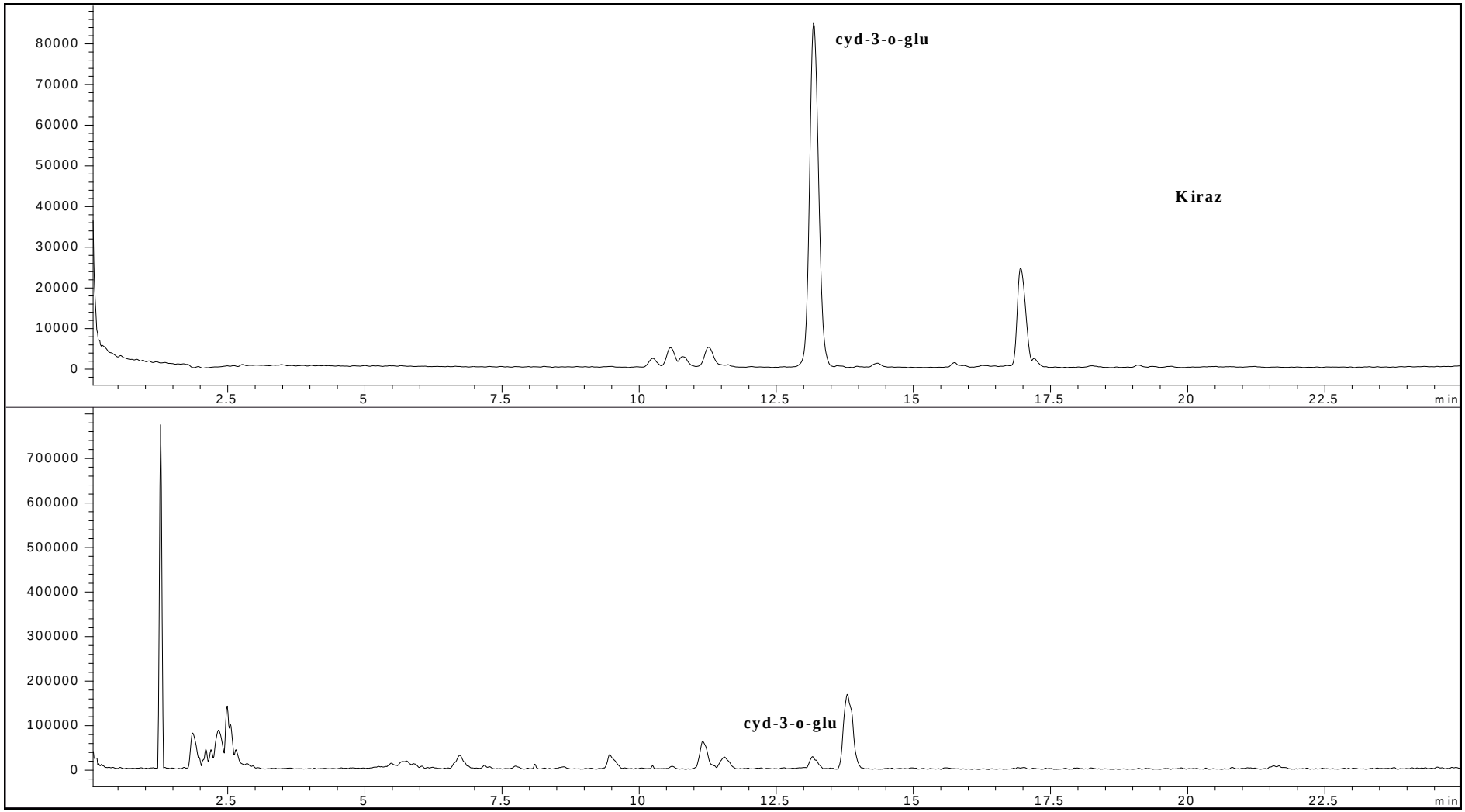
asetonitril, metanol ve etanol çözücüleri ile ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.73-4.74' deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde, siyanidin-3-*o*-glikozit için en iyi çözücünün asitlendirilmiş asetonitril olduğu bulundu. Ekstraksiyon süresi taramasında; 0, 30, 60, 120 ve 240 dk' da ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.82-4.83' deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit için ekstraksiyon süresi 30 dk olarak bulundu. Çözücü/katı oranı taramasında aynı miktardaki kiraz örneklerine sırasıyla; 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 mL asitlendirilmiş asetonitril çözücüsü eklenerek ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.91' deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit için optimum çözücü/katı oranı 2/1 (v/w) olarak bulundu.

Çilek örneğinde optimum ekstraksiyon şartları belirlemede elde edilen kromatogramlar incelendi. Farklı çözücü taramasında; % 0.1 HCl içeren su, aseton, asetonitril, metanol ve etanol çözücüleri ile ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.75-4.77' deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için en iyi çözücünün % 0.1 HCl içeren metanol olduğu bulundu. Ekstraksiyon süresi taramasında; 0 ile 240 dk arasındaki sürelerde ekstraksiyonlar uygulandı. Böylece elde edilen Şekil 4.84-4.86' daki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için optimum ekstraksiyon süresi 30 dk olarak bulundu. Çözücü/katı oranı taramasında aynı miktardaki çilek örneklerine; 5-50 mL aralığında asitlendirilmiş metanol çözücüsü ile ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.92' deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-o-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için optimum çözücü/katı oranı 5/1 (v/w) olarak bulundu.

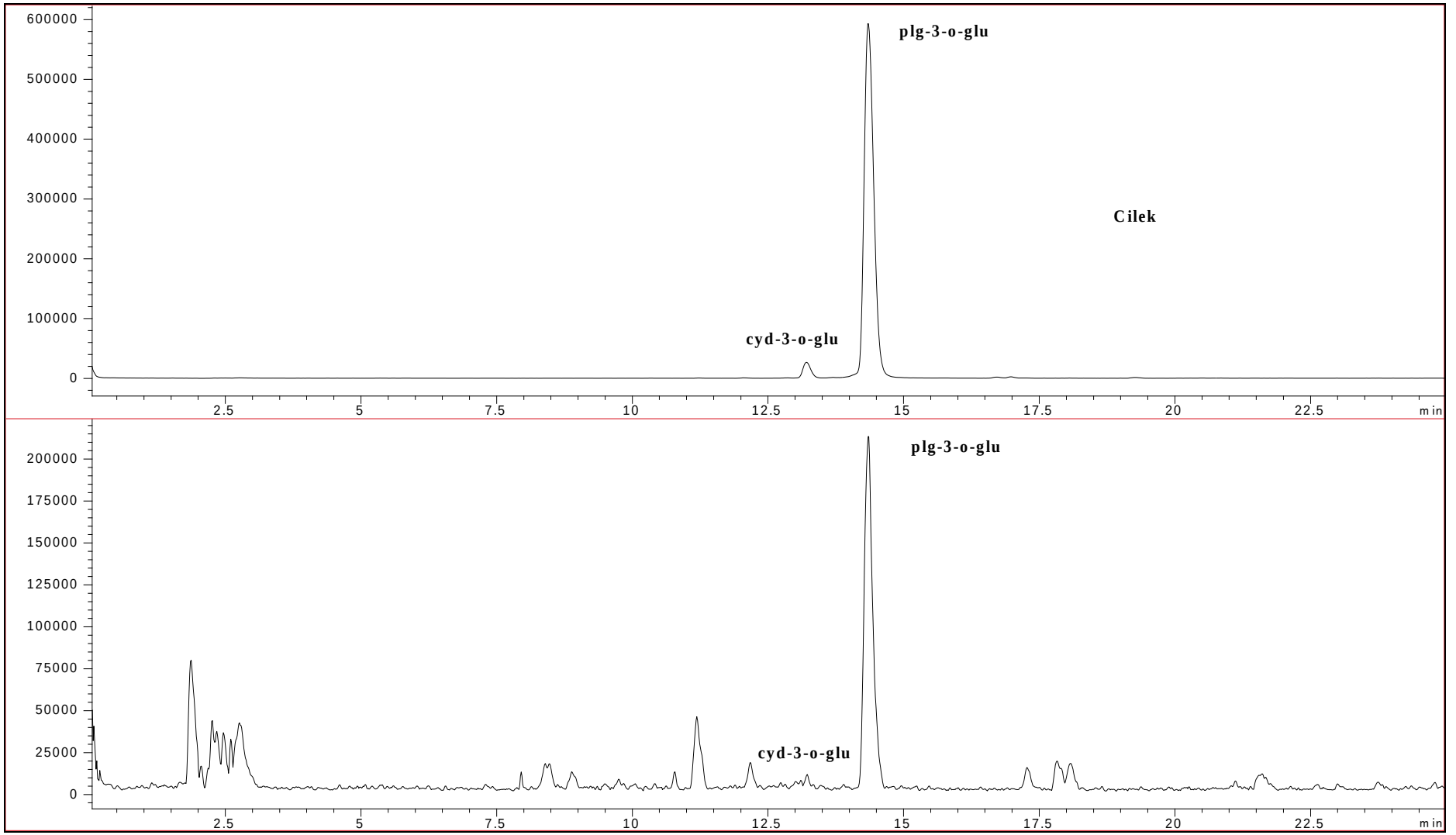
Kızılcık örneğinde optimum ekstraksiyon şartları belirlemede elde edilen kromatogramlar incelendi. Farklı çözücü taramasında; % 0.1 HCl içeren su, aseton, asetonitril, metanol ve etanol çözücüleri ile ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen

Şekil 4.78-4.80’ deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için en iyi çözücünün asitlendirilmiş asetonitril olduğu bulundu. Ekstraksiyon süresi taramasında; 0-240 dk aralığında ekstraksiyonlar yapıldı. Böylece elde edilen Şekil 4.84-4.86’ daki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde sırasıyla siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit için optimum ekstraksiyon süresi 30 dk olarak bulundu. Çözücü/katı oranı taramasında aynı miktarda kızılcık örneklerine; 5-50 mL aralığında asitlendirilmiş asetonitril çözücüsü ile ekstraksiyonlar gerçekleştirildi. Böylece elde edilen Şekil 4.93’ deki kromatogramlar ve MS spektrumları aynı anda elde edilen kalibrasyon grafikleriyle birlikte değerlendirildiğinde siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit için optimum çözücü/katı oranı 2/1 (v/w) olarak bulundu.

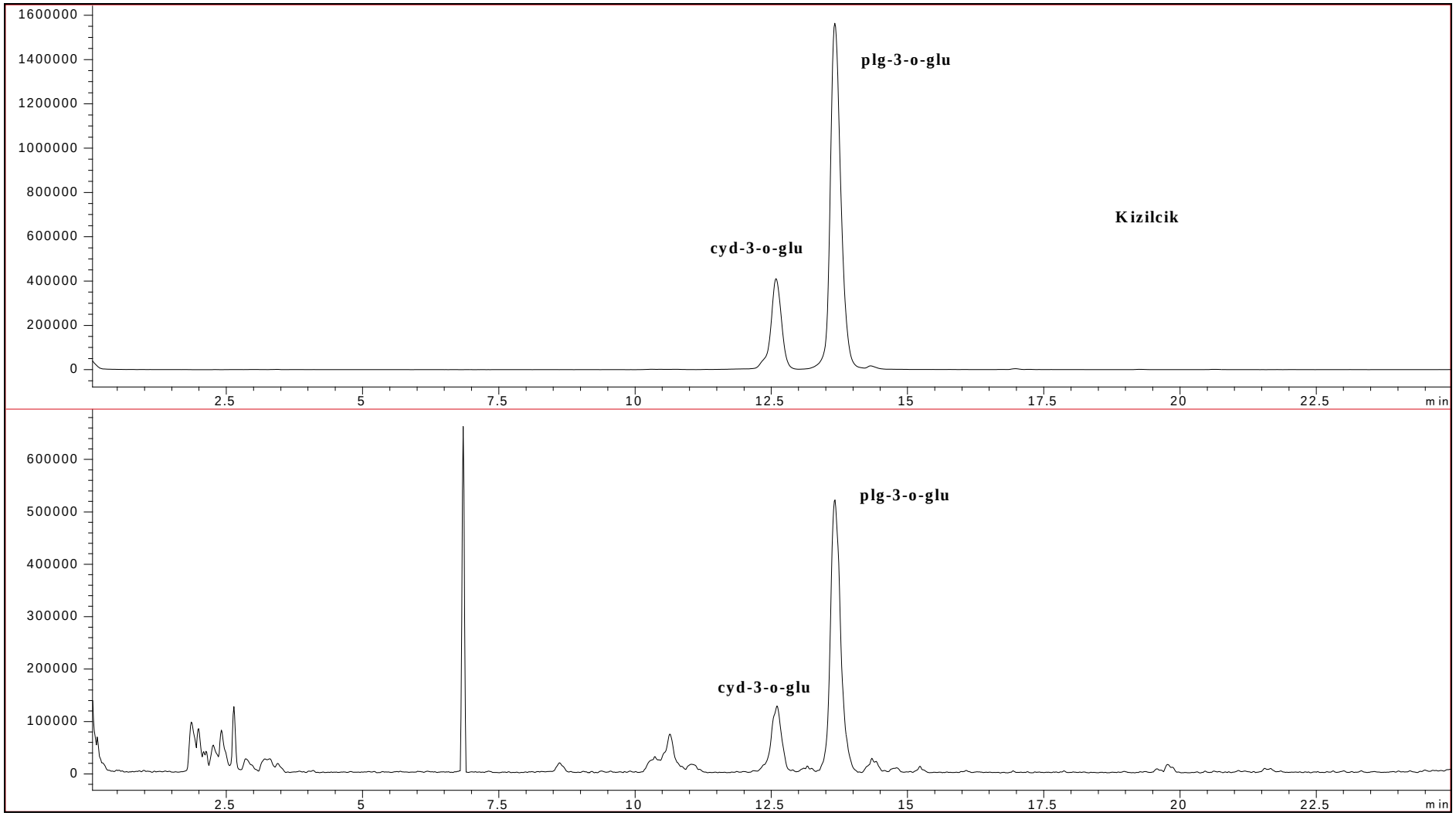
Optimum şartlar kullanılarak her üç meyve için elde edilen tipik bir SIM (seçilmiş iyon taraması) ve SCAN (tam iyon taraması) kromatogramları Şekil 5.1-5.3’ de verilmiştir. SIM taramada meyvelerde çalışılan dört bileşiğin tayini yapılırken, SCAN taramada 100-1000 m/z aralığındaki bileşikler tarandı. Şekil 5.1’ de SIM, SCAN kromatogramları ve MS spektrumları incelendiğinde kirazda siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği, Şekil 5.2-5.3’ de SIM, SCAN kromatogramları ve MS spektrumları incelendiğinde çilek ve kızılcıkta siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri tespit edildi. Üç meyveye ait SIM ve SCAN kromatogramlarında bulunan diğer piklerin ise çalışılan bileşikler dışındaki fenolik bileşikler olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 5.1. Kiraz meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları



Şekil 5.2. Çilek meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları



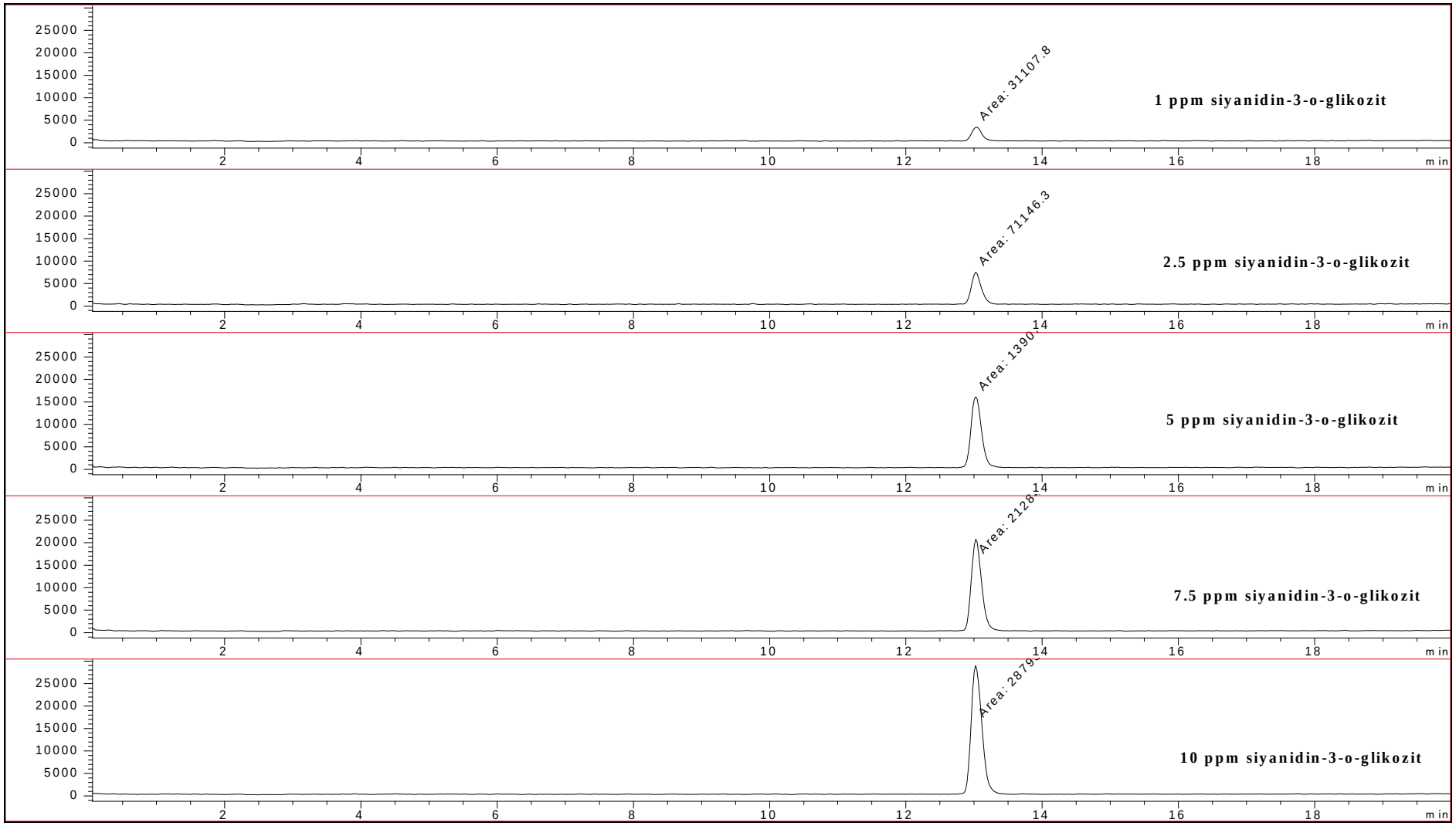
Şekil 5.3. Kızılcık meyvesinin optimum şartlarda elde edilen SIM ve SCAN kromatogramları

5.3. Kiraz *(Prunus avium* L.*)* Meyvesinde Bulunan Antosiyanin Bileşiklerinin Konsantrasyonları

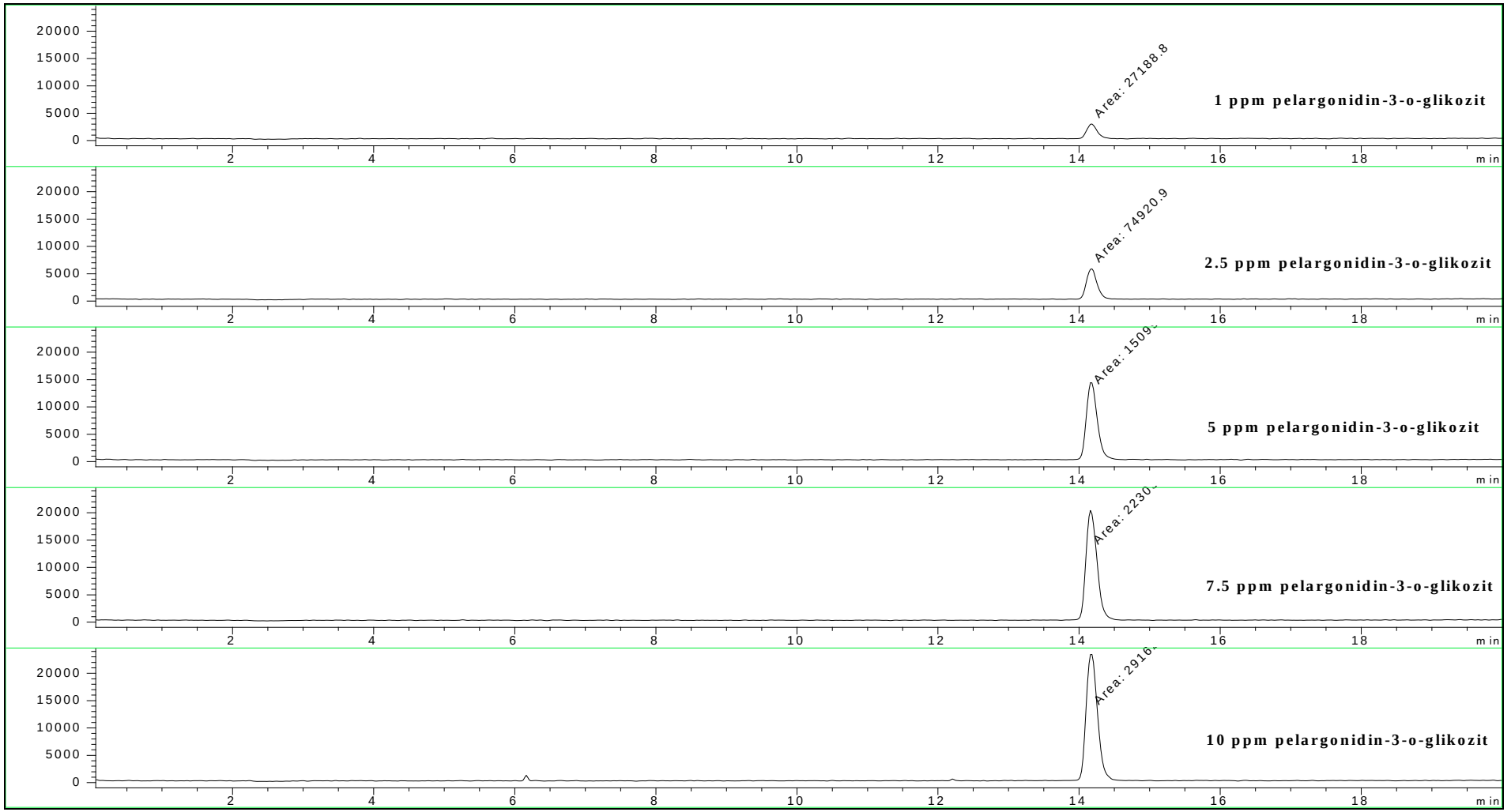
Bu amaçla, hem kalibrasyon hem de standart ekleme metodu uygulandı. Farklı yerlerden alınmış kiraz örnekleri optimum ekstraksiyon şartlarında ekstrakte edildi. Örneklere standart ekleme metodu uygulandı. Bu amaçla aynı örneğe ait yine aynı hacimdeki beş ayrı ekstrakta bilinen konsantrasyonlarda antosiyanin çözeltileri eklendi. Böylece elde edilen çözeltiler ve standart çözeltilerin optimum HPLC-MS şartlarında kromatogram ve MS spektrumları alınarak kalibrasyon ve standart ekleme grafikleri elde edildi (Şekil 5.4-5.35).

Siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 448.7 m/z $(M)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 449.8 m/z $(M+1)^+$ piki, 450.8 m/z $(M+2)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomerleri, 286.8 m/z piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan siyanidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 432.8 m/z $(M)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 433.8 m/z $(M+1)^+$ piki, 434.8 m/z $(M+2)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomerleri, 270.8 m/z piki pelargonidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan pelargonidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 492.6 m/z $(M)^+$piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 493.7 m/z $(M+1)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 330.9 m/z piki malvidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan malvidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Bu MS spektrumlarının yorumlanmasıyla kiraz meyvesindeki antosiyanin bileşiklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

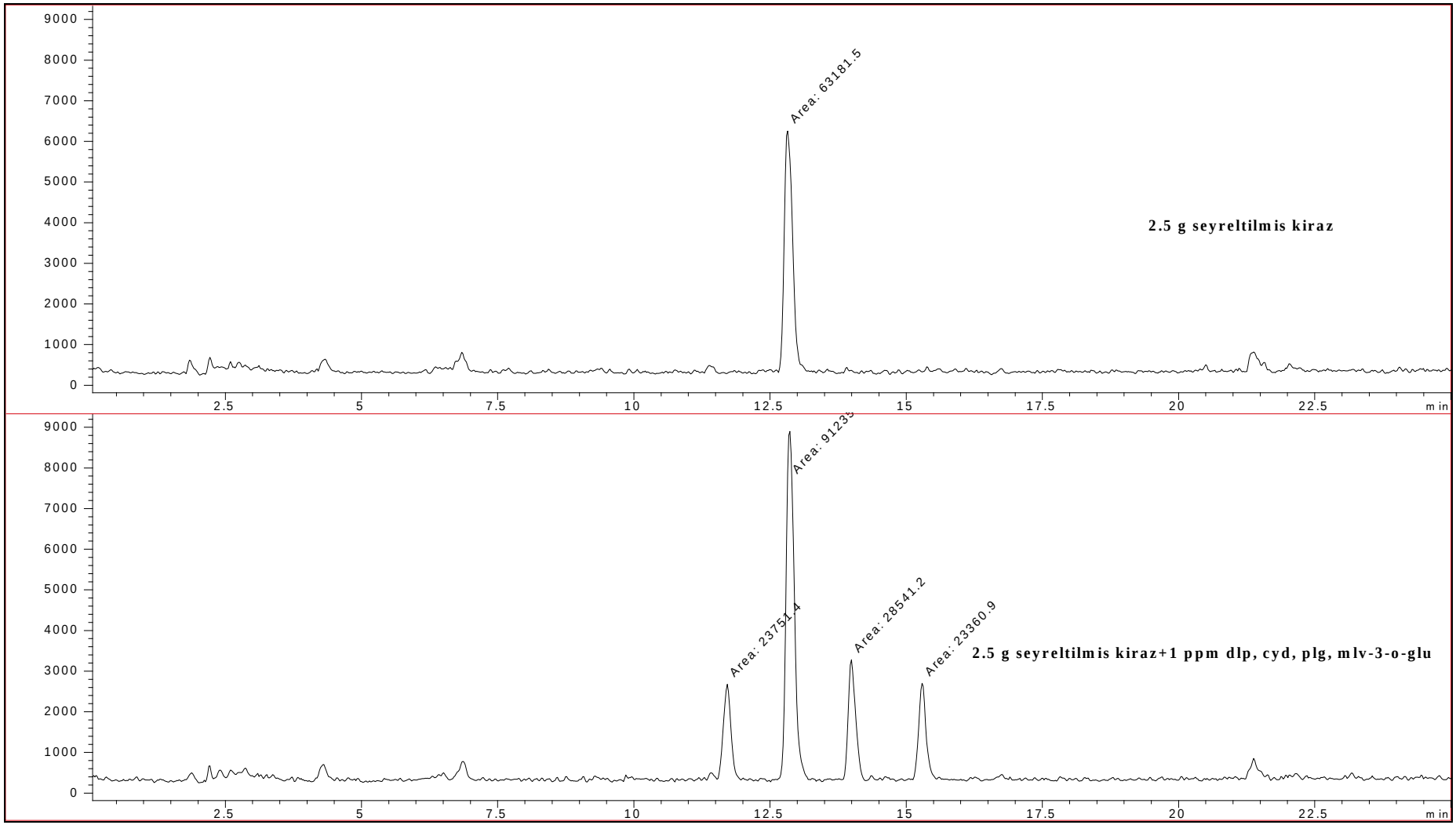
Görüldüğü gibi, bu şekillerdeki (Şekil 5.10, 5.34 ve 5.35) kromatogram alanları ile elde edilenler için paralel olmadığı, MS spektrumlarıyla elde edilenler için bir paralellik vardır. Böylece, kromatogram alanlarının kullanılmasıyla nicel analizde kimyasal girişim olduğu, MS spektrumlarının bolluklarının kullanılmasıyla nicel analizde kimyasal girişim olmadığı sonucuna varıldı. Tablo 5.2' de verilen değerler kromatogramlar için standart ekleme grafiklerinden bulunan konsantrasyonlardır. MS bolluklarından bulunan değerler ise kalibrasyon grafiklerinden elde edilen konsantrasyonlardır.



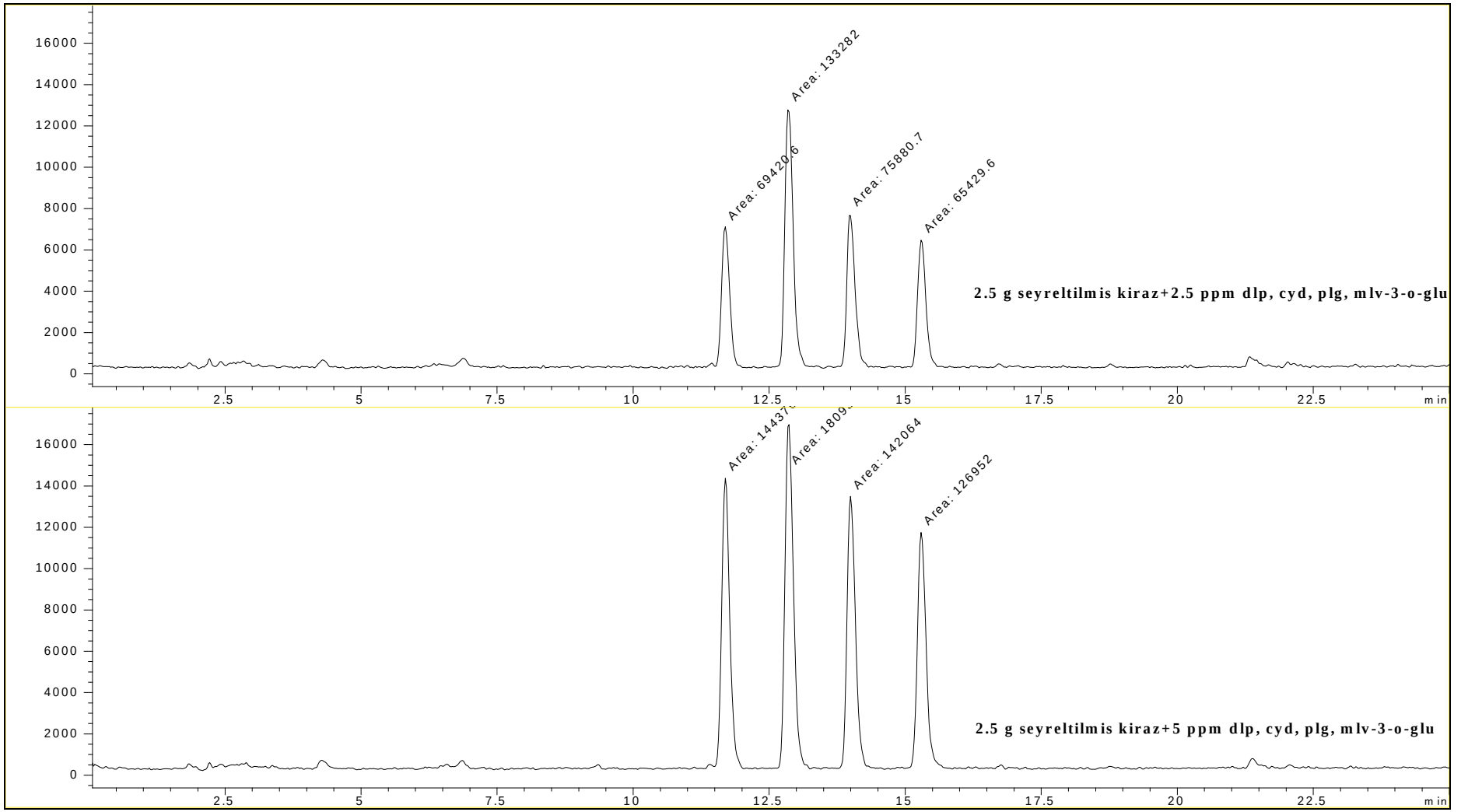
Şekil 5.4. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 ppm için) ait kromatogramlar



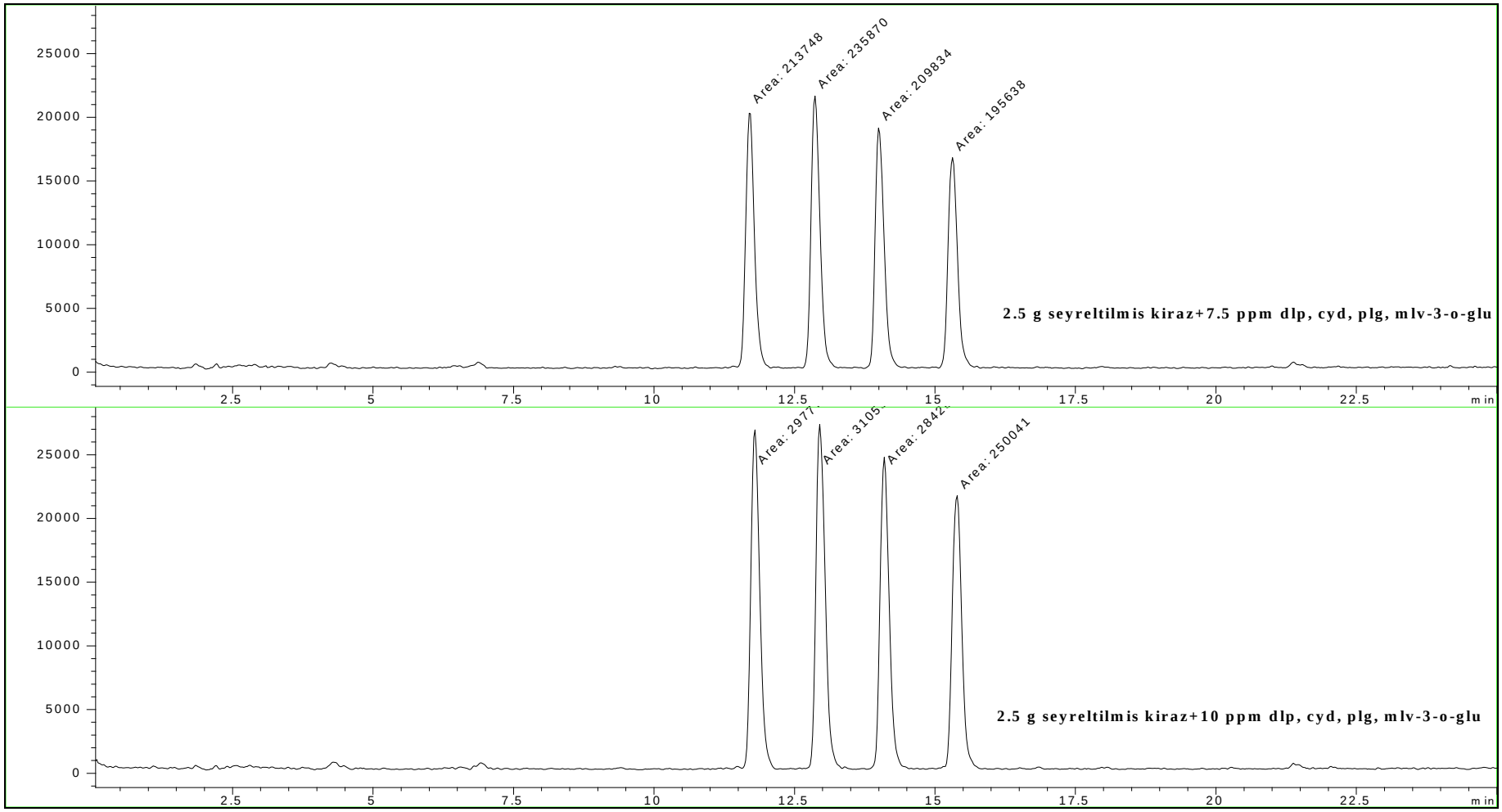
Şekil 5.5. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde kalibrasyon çözeltilerine (0.1, 2.5, 5, 7.5 ve 10 ppm için) ait kromatogramlar



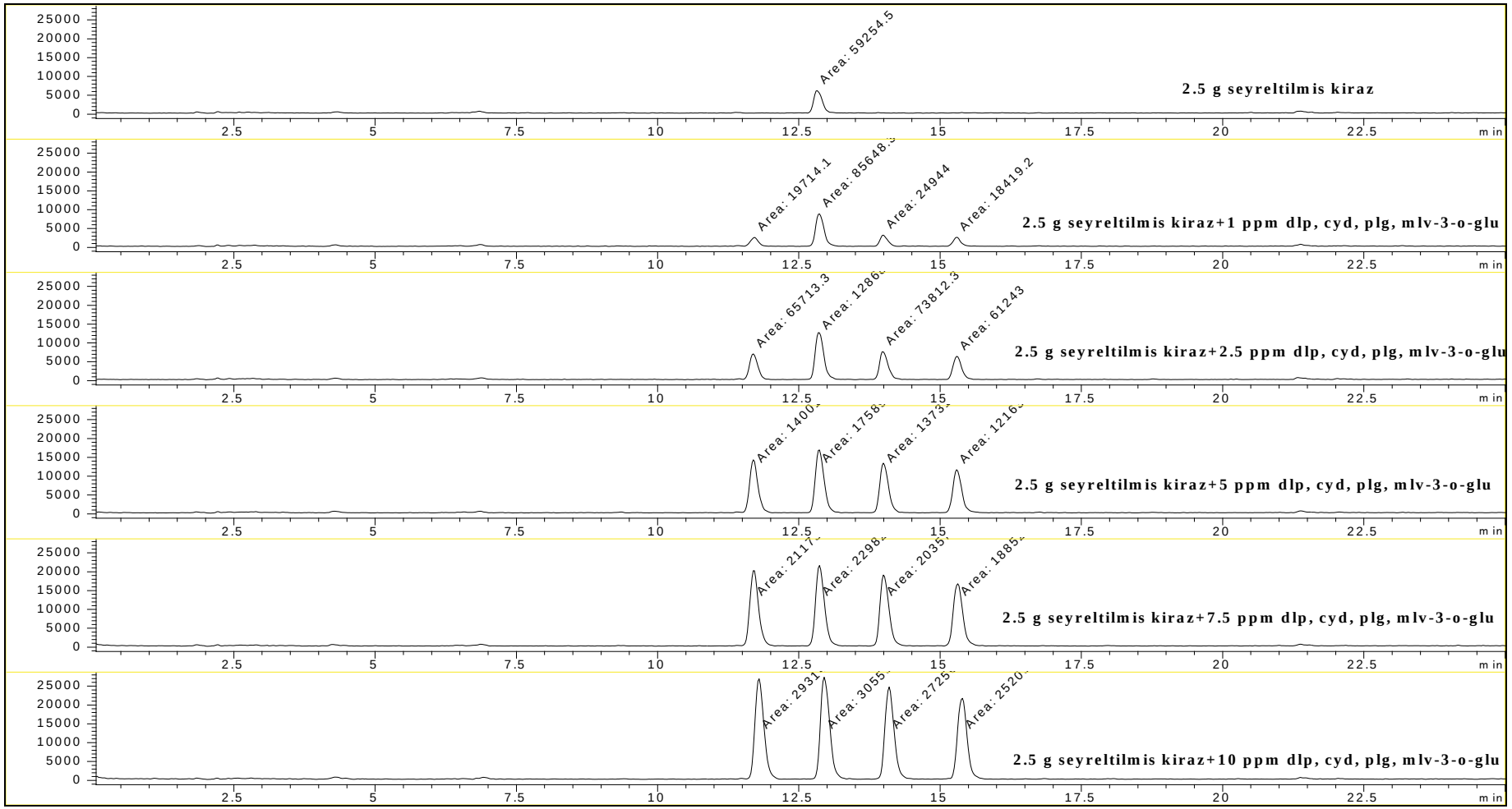
Şekil 5.6. Kiraz meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



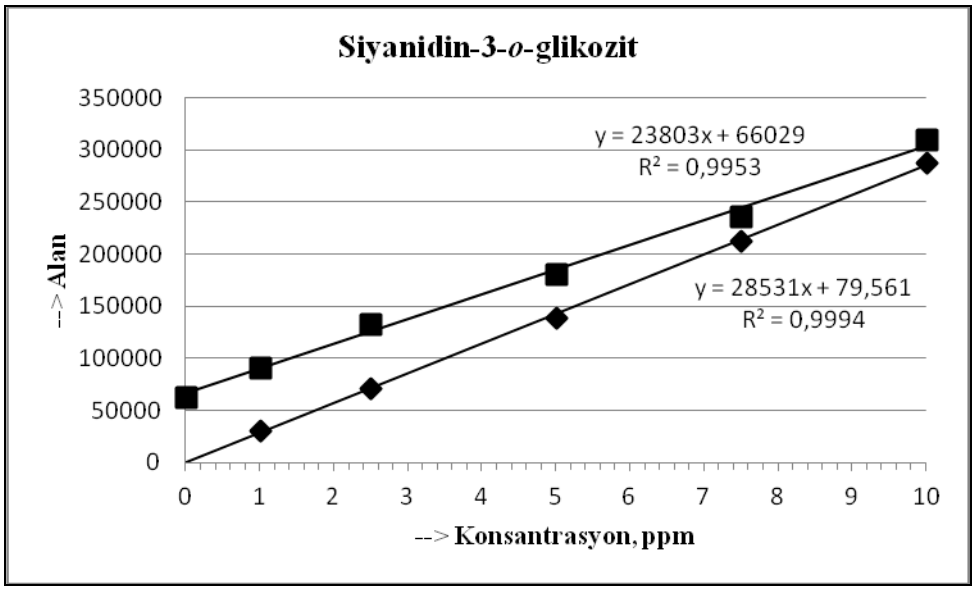
Şekil 5.7. Kiraz meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



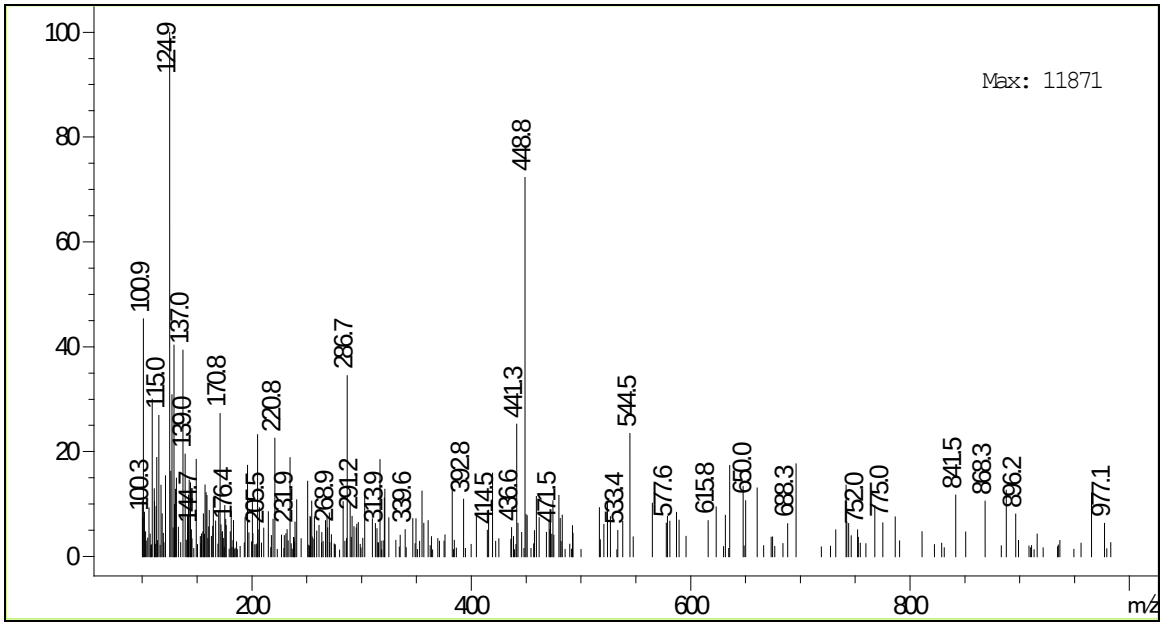
Şekil 5.8. Kiraz meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



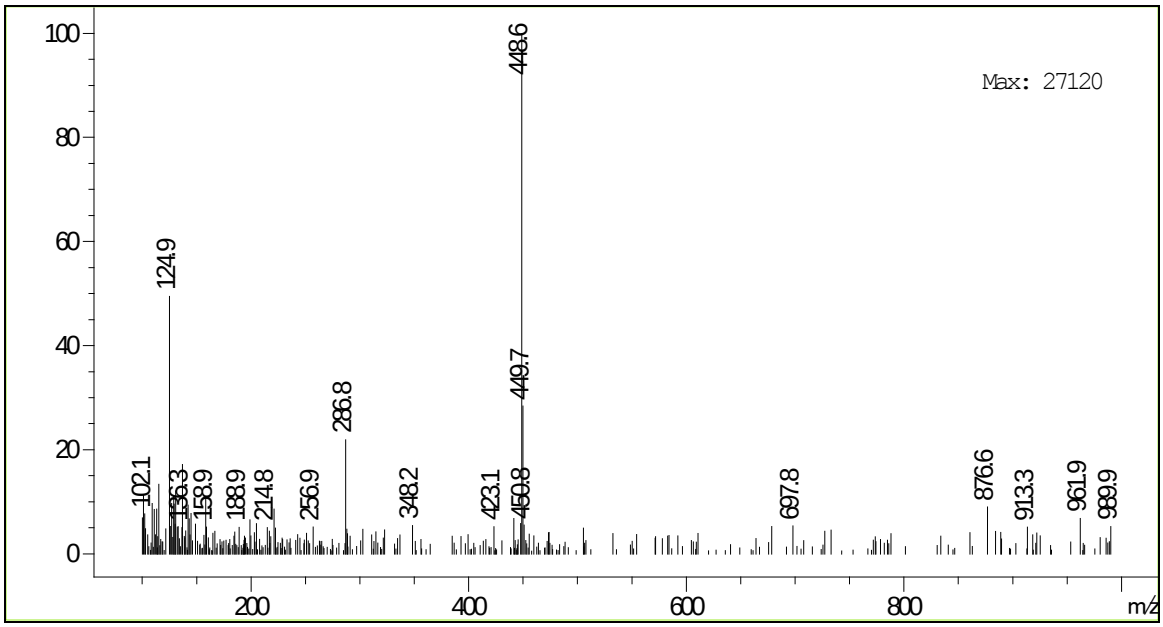
Şekil 5.9. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



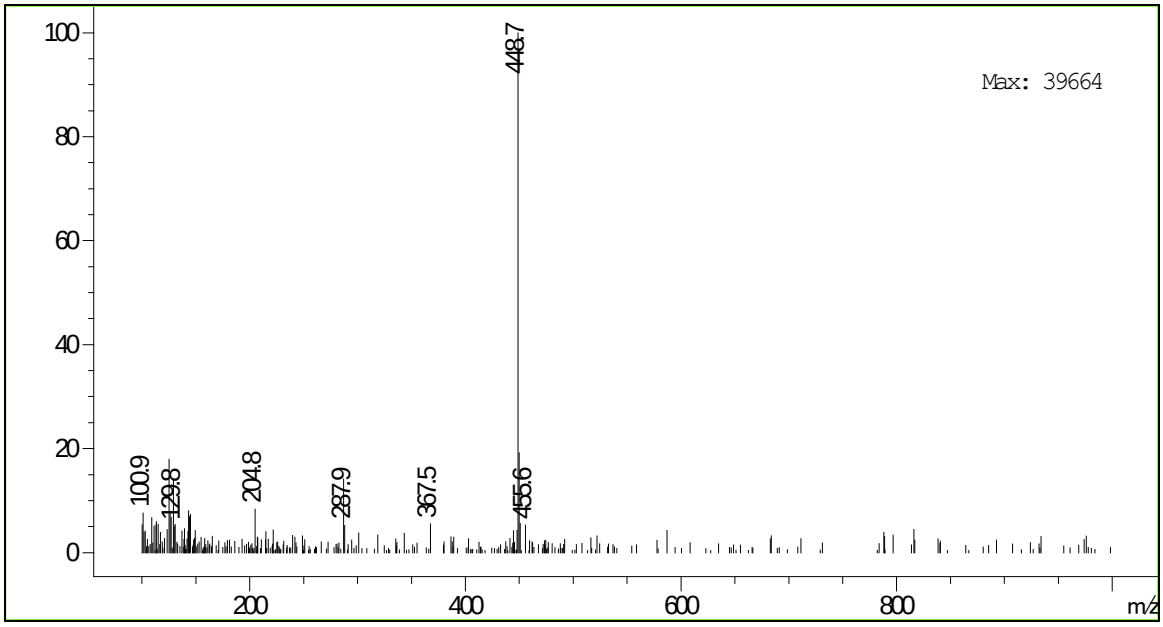
Şekil 5.10. Kiraz meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



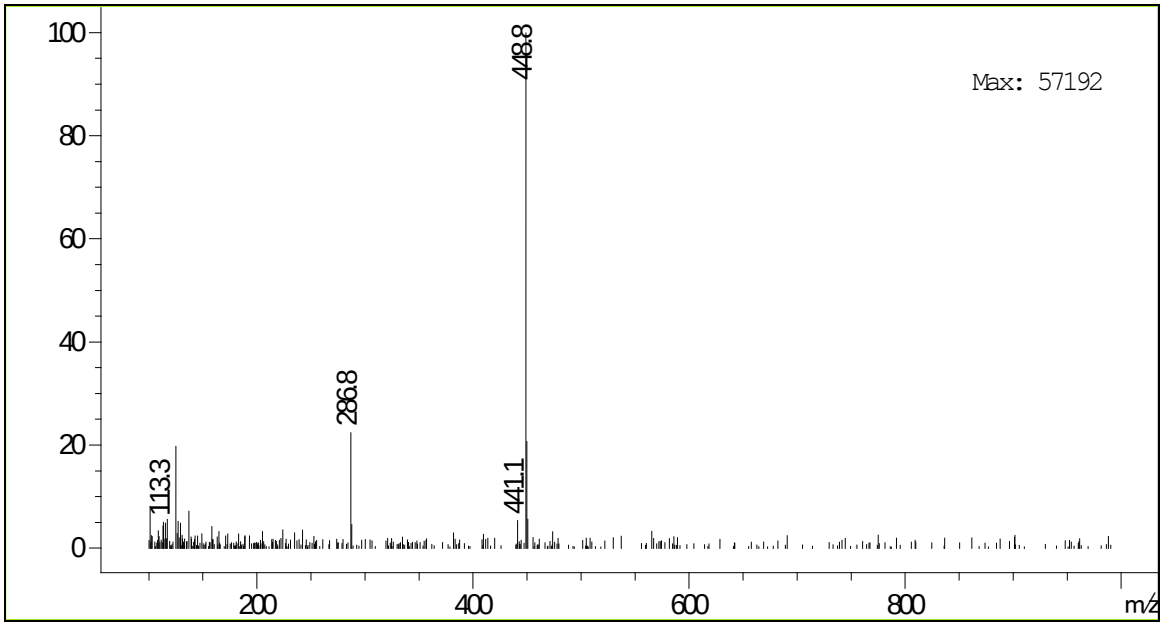
Şekil 5.11. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



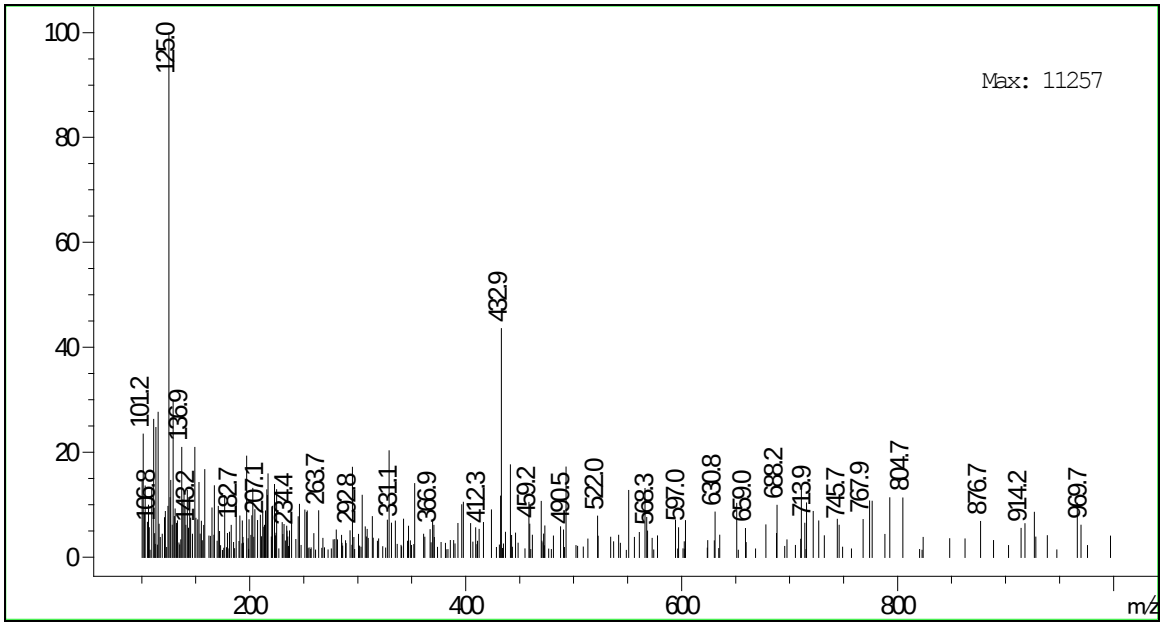
Şekil 5.12. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



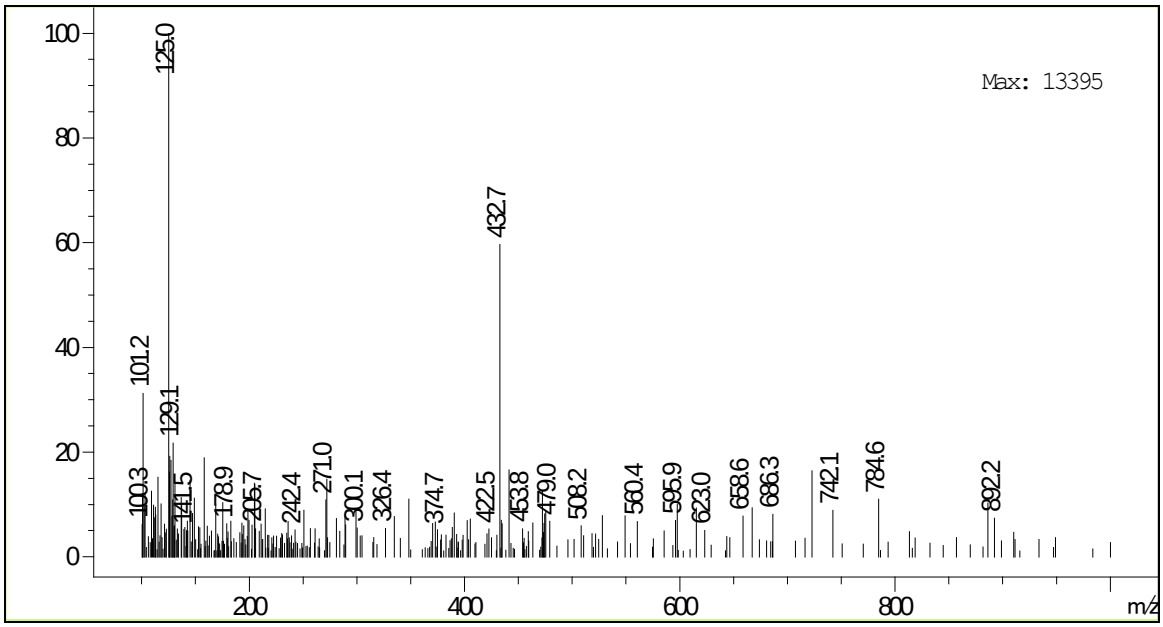
Şekil 5.13. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



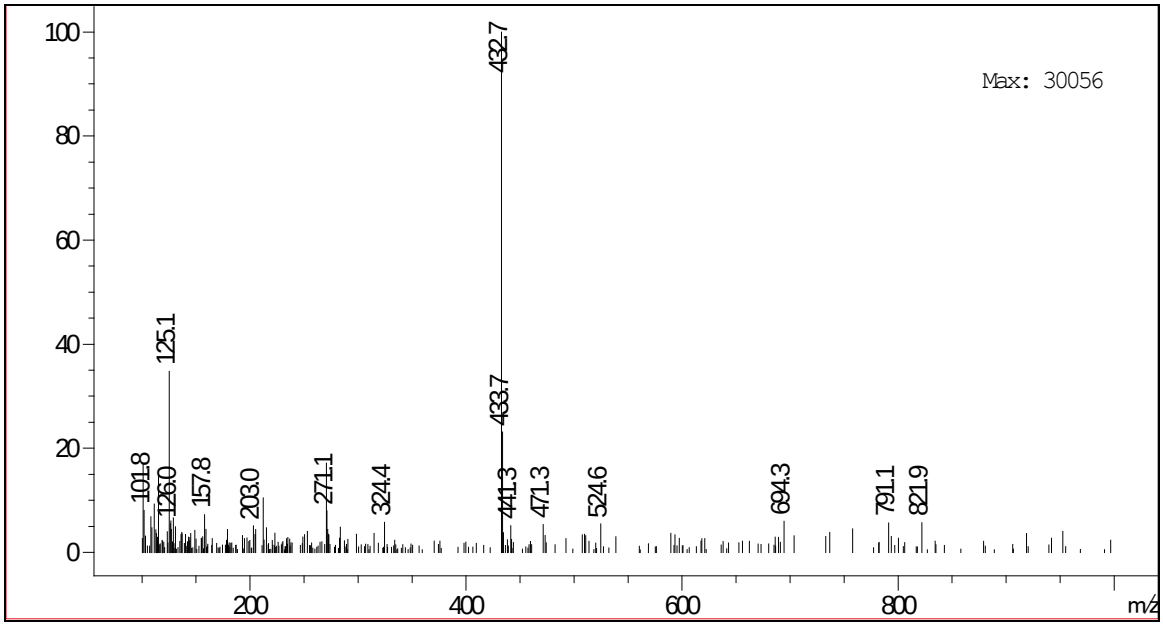
Şekil 5.14. HPLC-ESI-MS ile siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



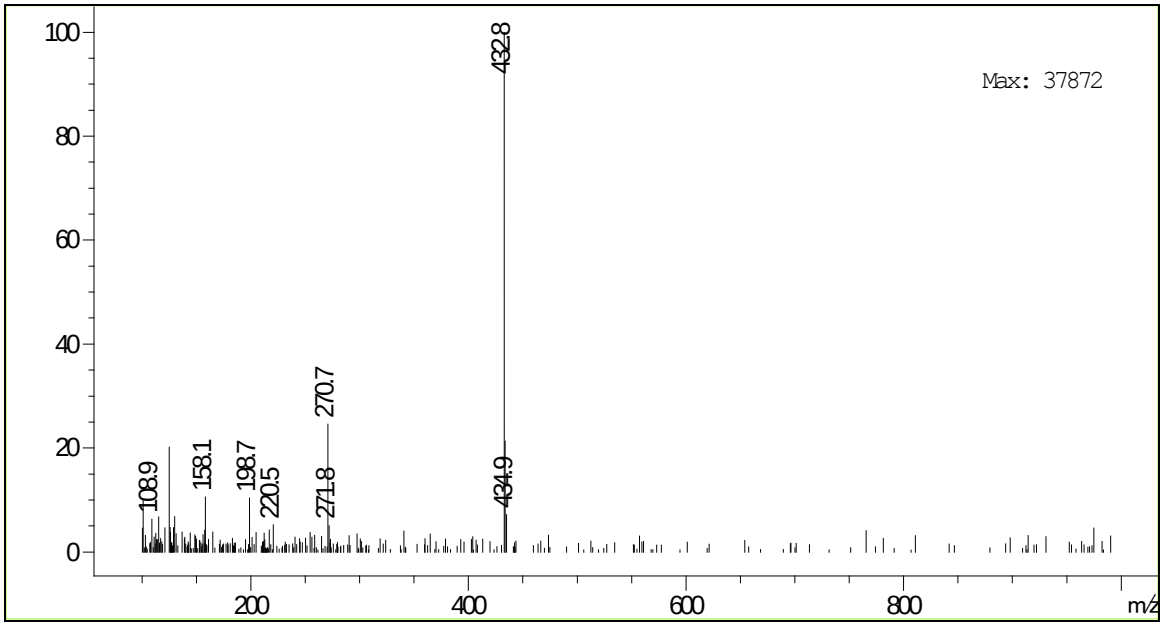
Şekil 5.15. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



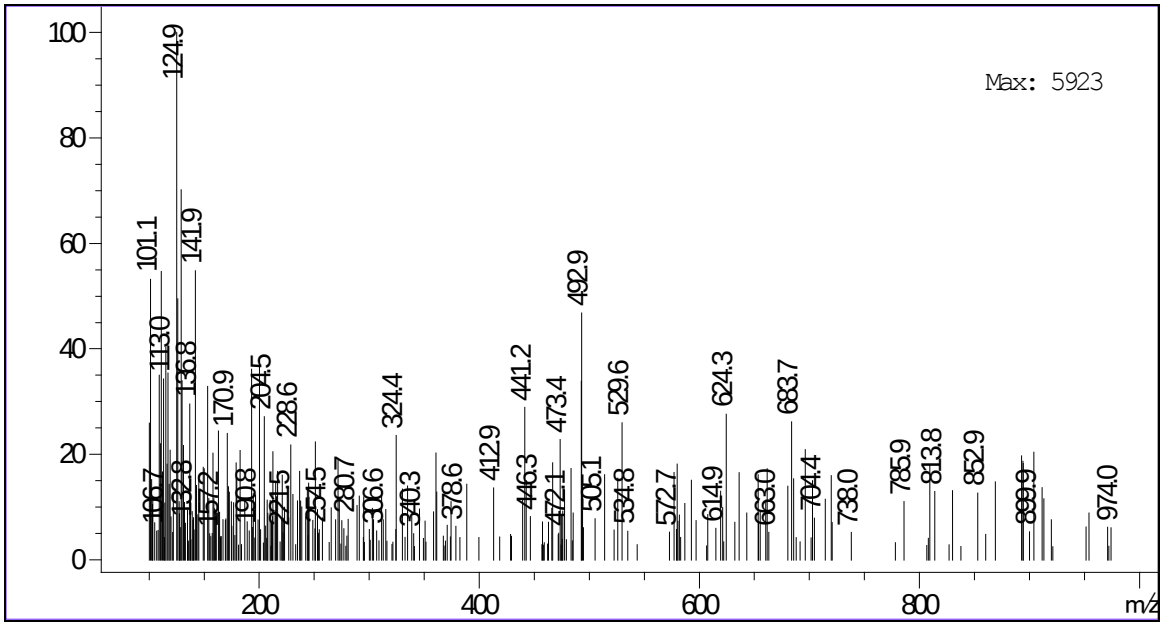
Şekil 5.16. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



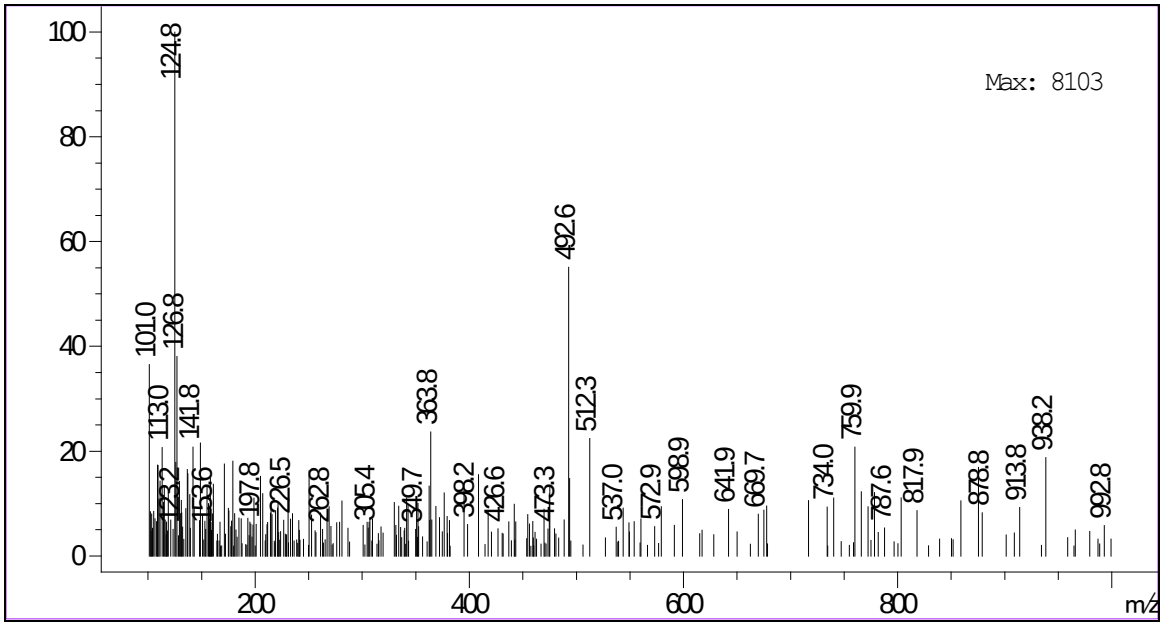
Şekil 5.17. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



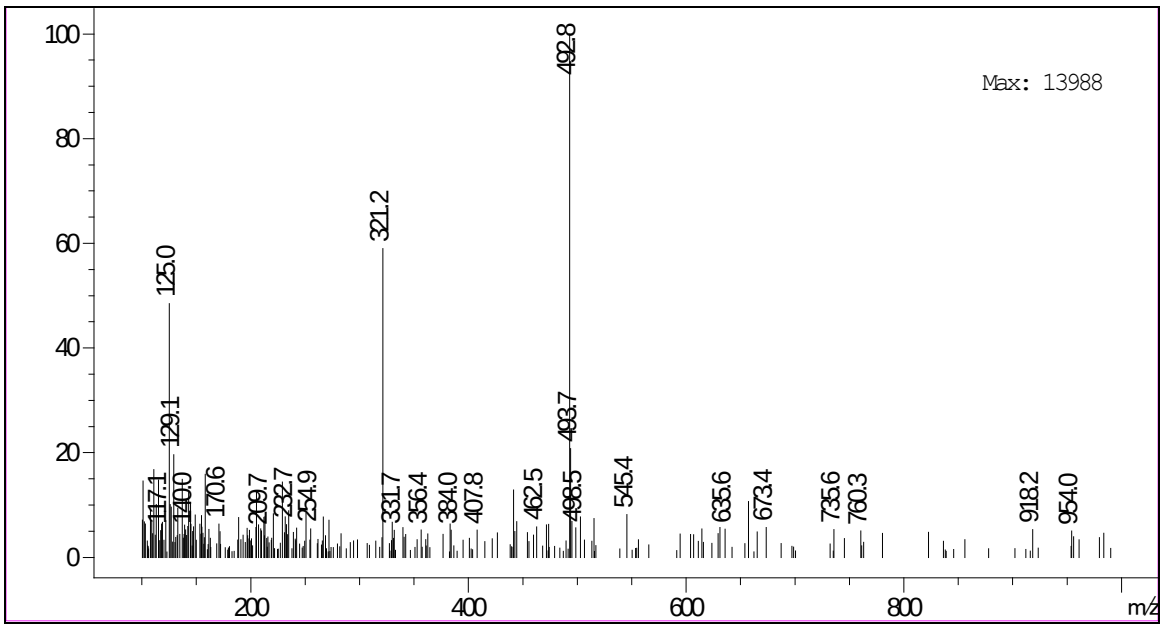
Şekil 5.18. HPLC-ESI-MS ile pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



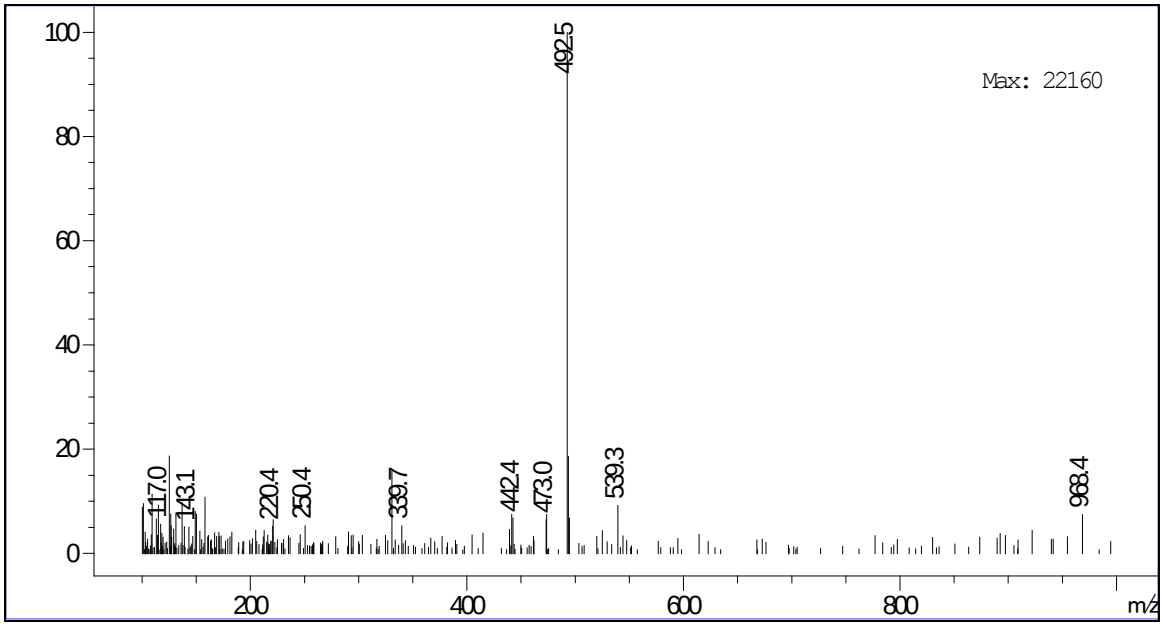
Şekil 5.19. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



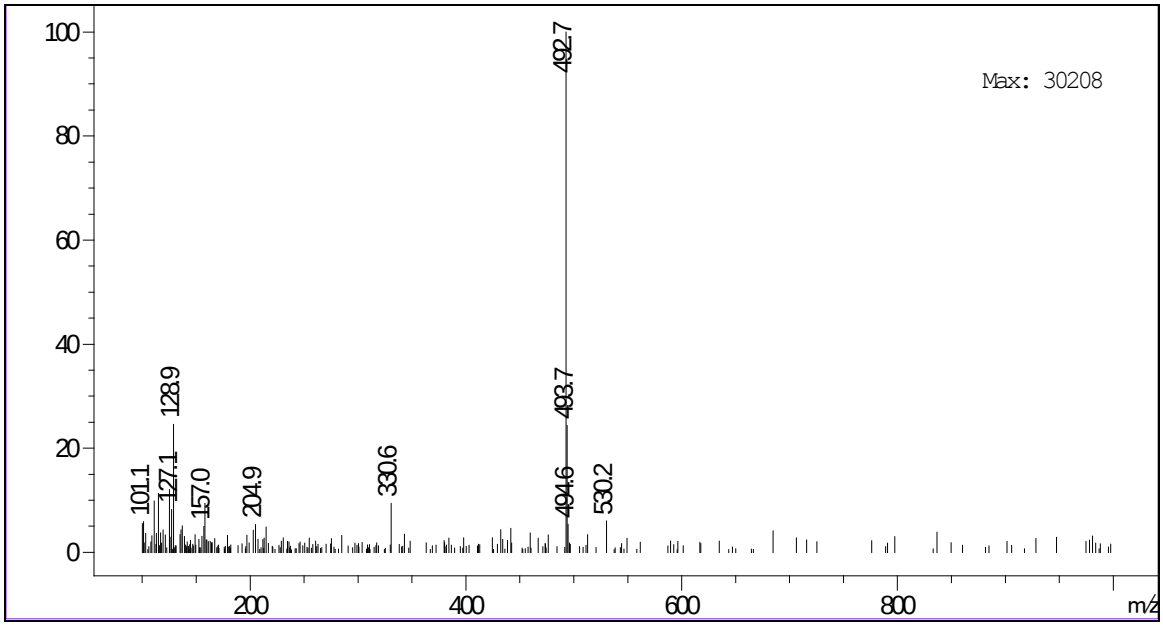
Şekil 5.20. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



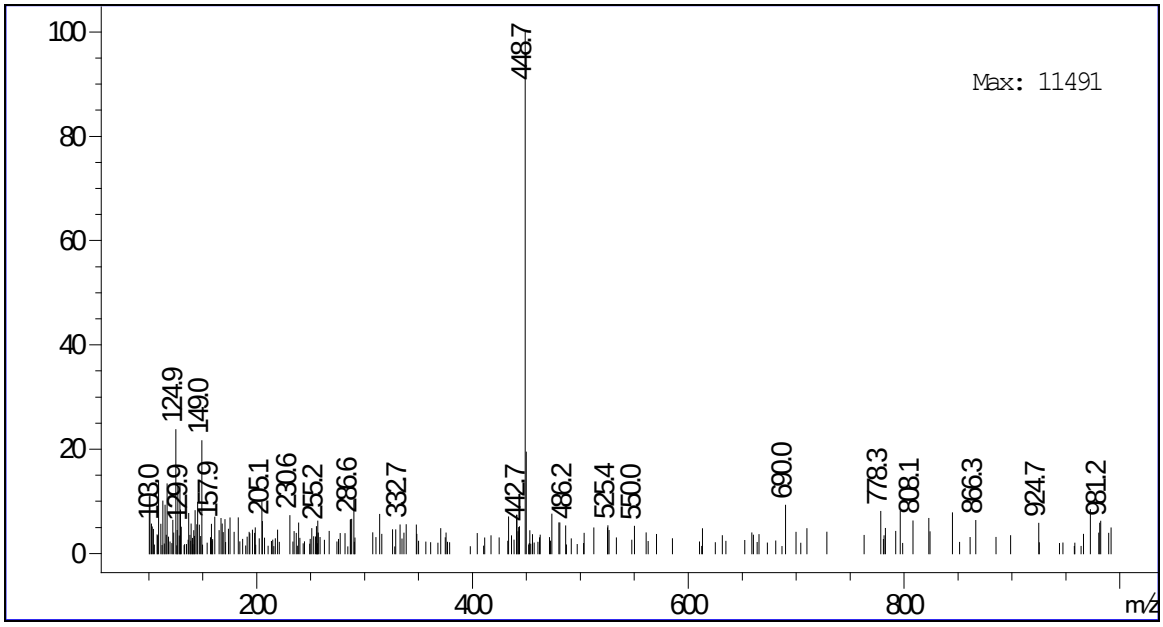
Şekil 5.21. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



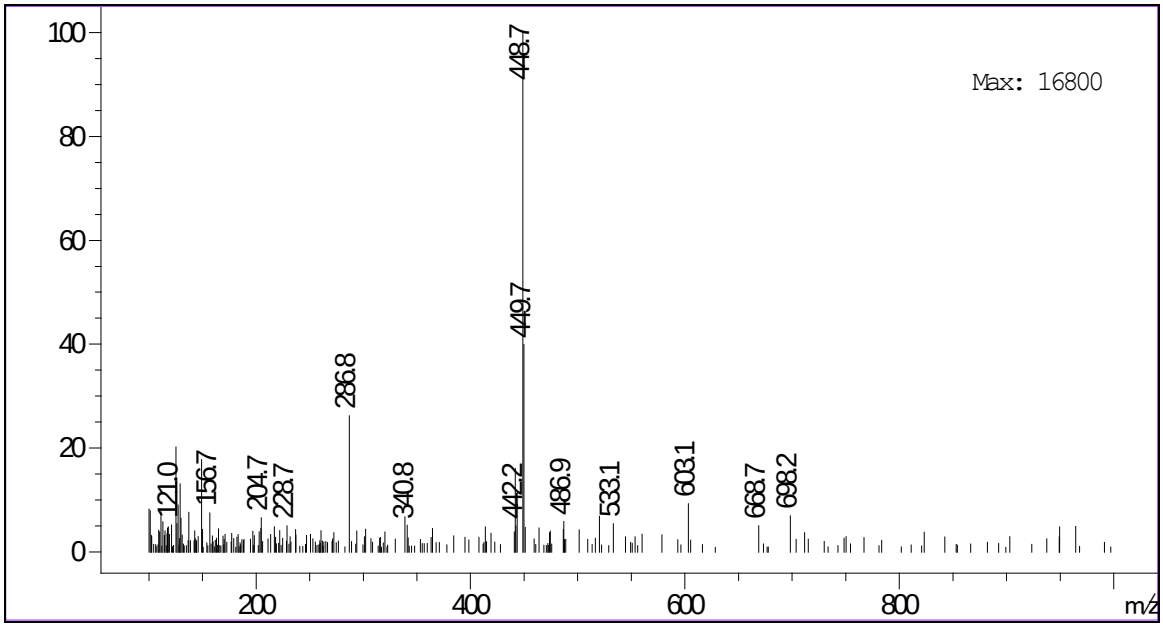
Şekil 5.22. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



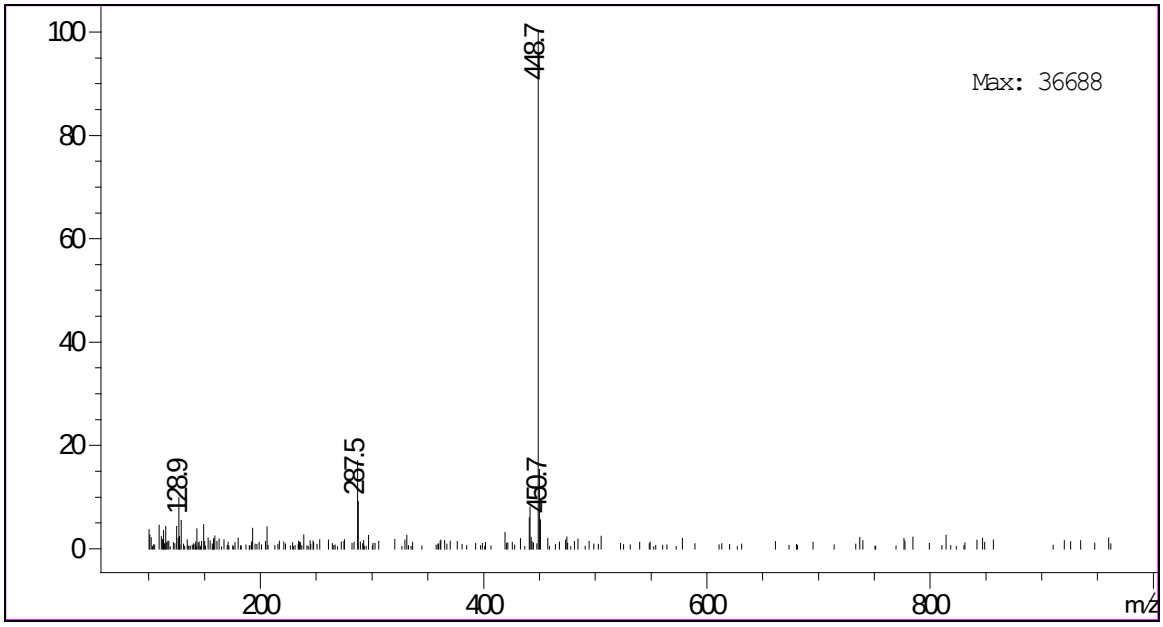
Şekil 5.23. HPLC-ESI-MS ile malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği için elde edilen kalibrasyon çözeltilerine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



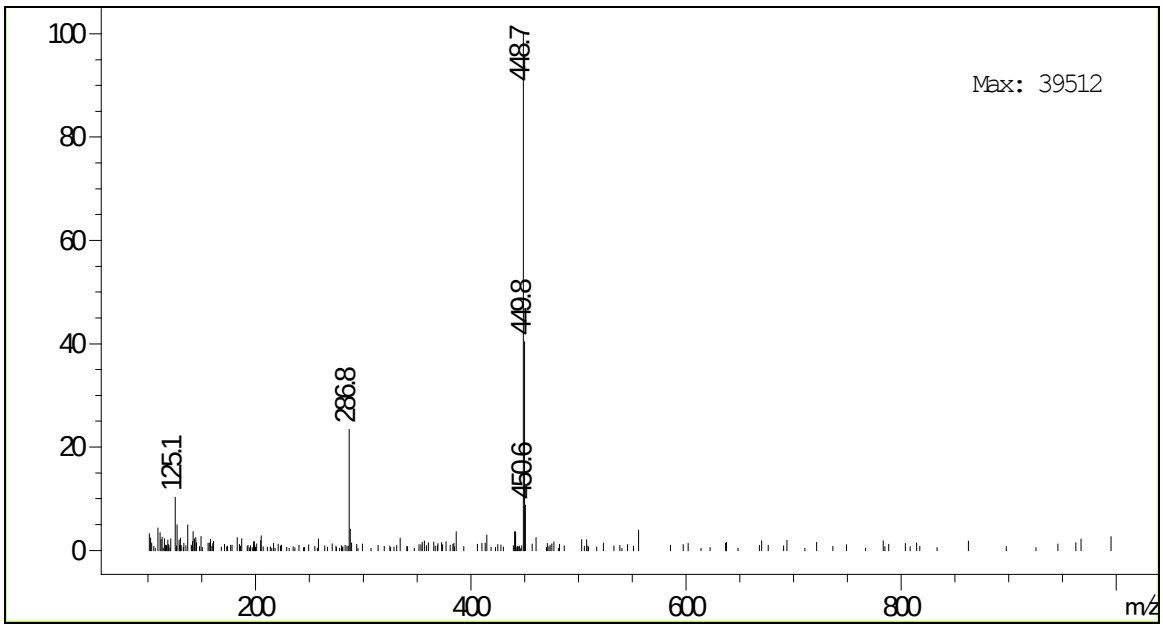
Şekil 5.24. Kiraz meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu



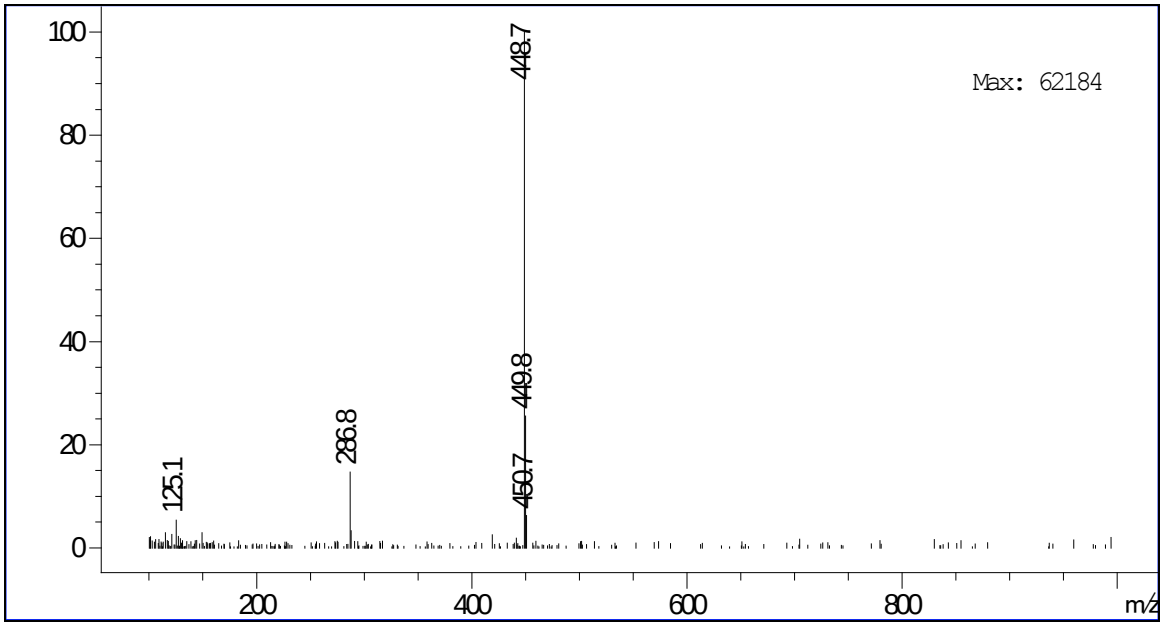
Şekil 5.25. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



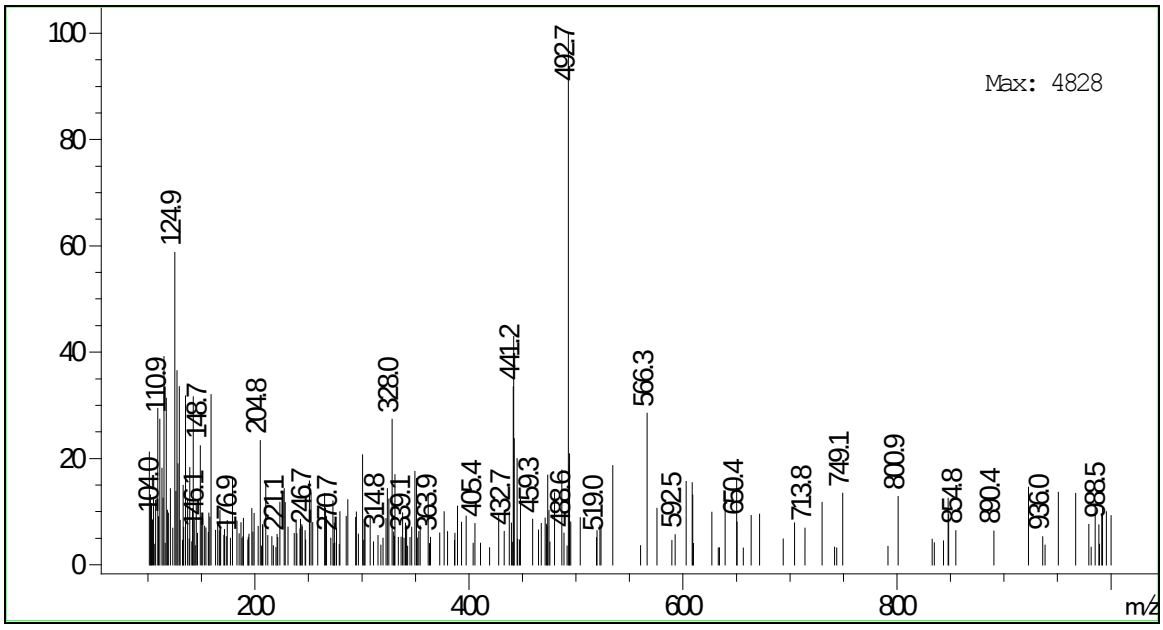
Şekil 5.26. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



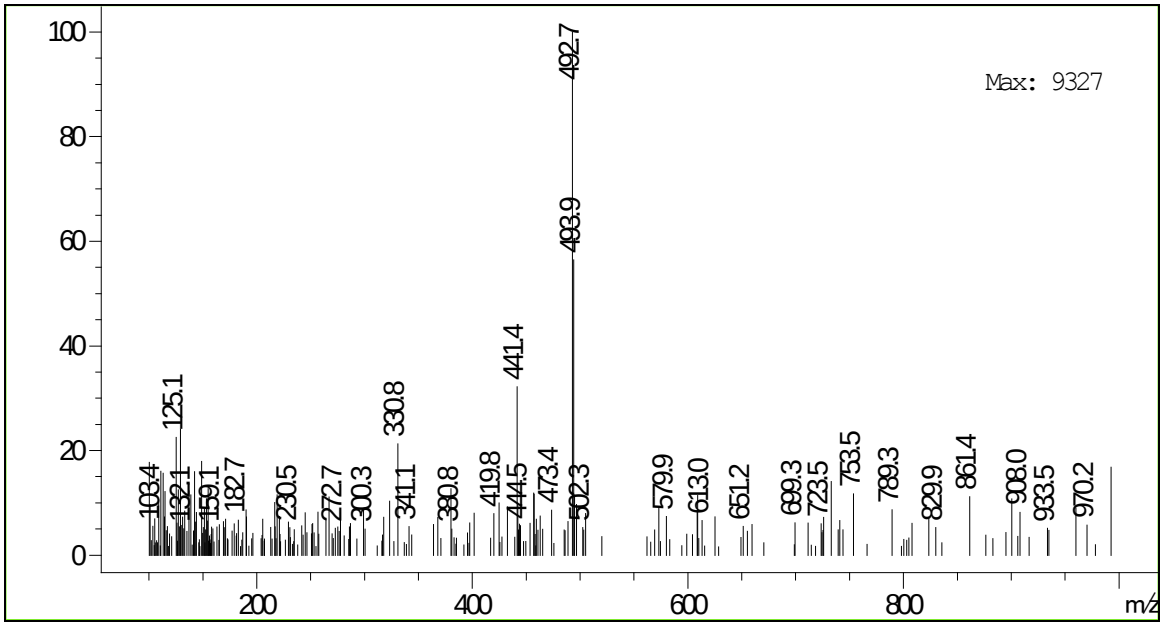
Şekil 5.27. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



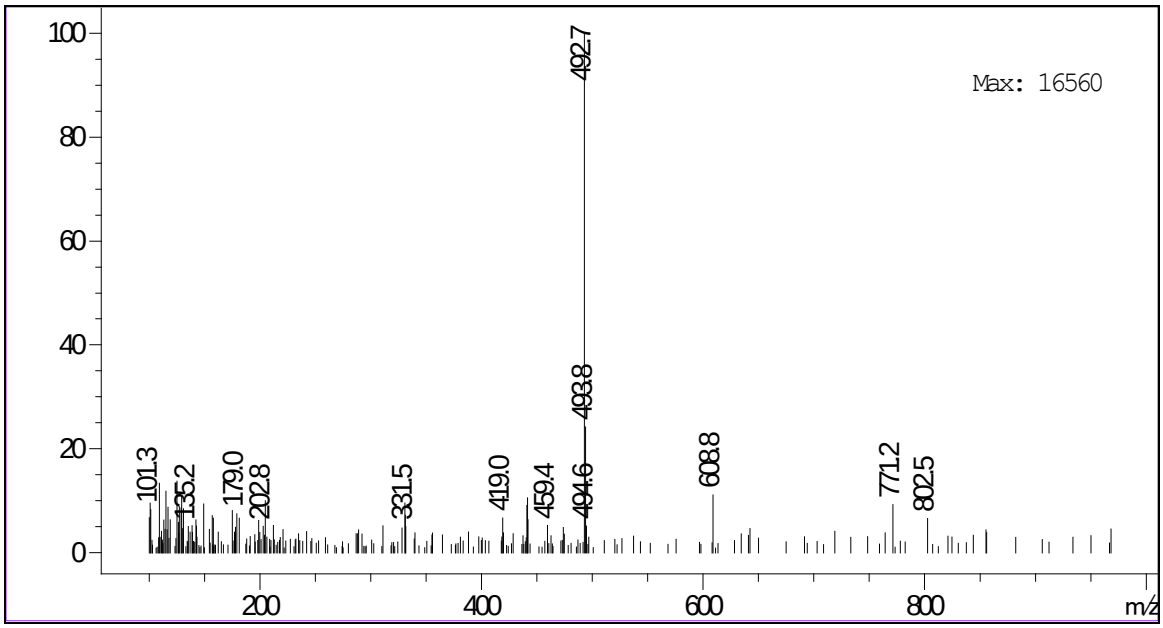
Şekil 5.28. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



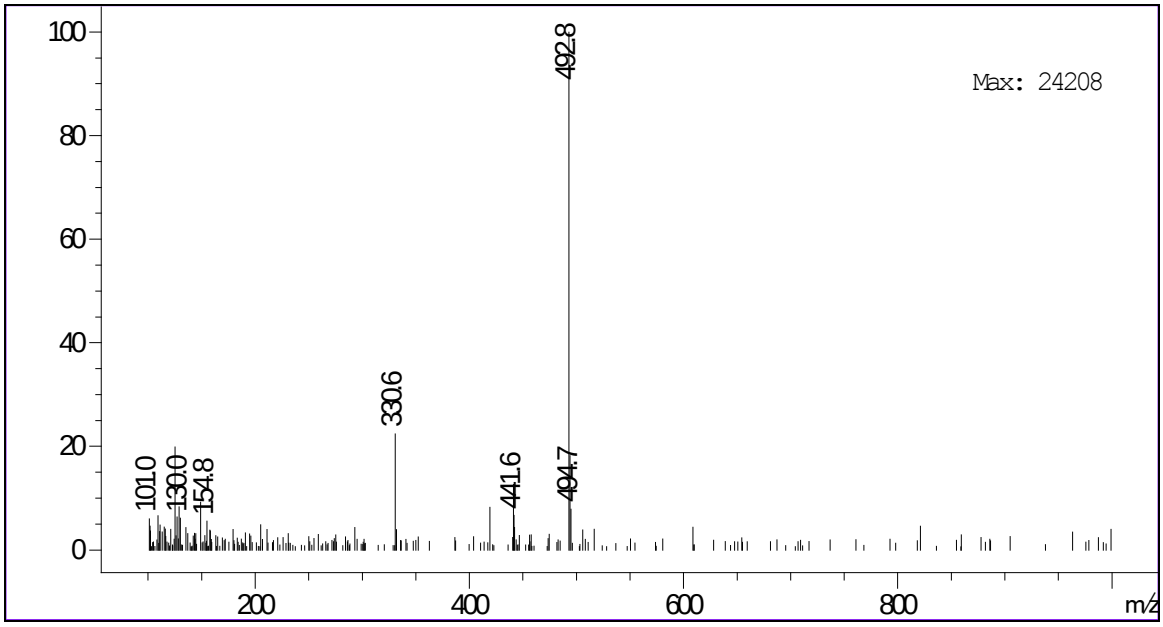
Şekil 5.29. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



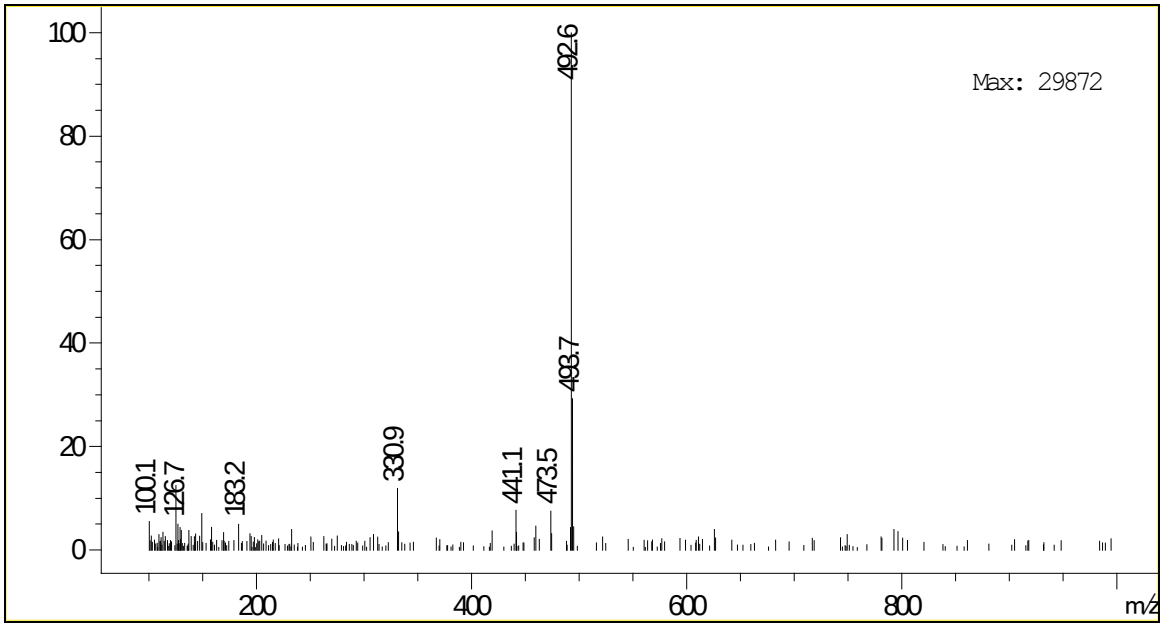
Şekil 5.30. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



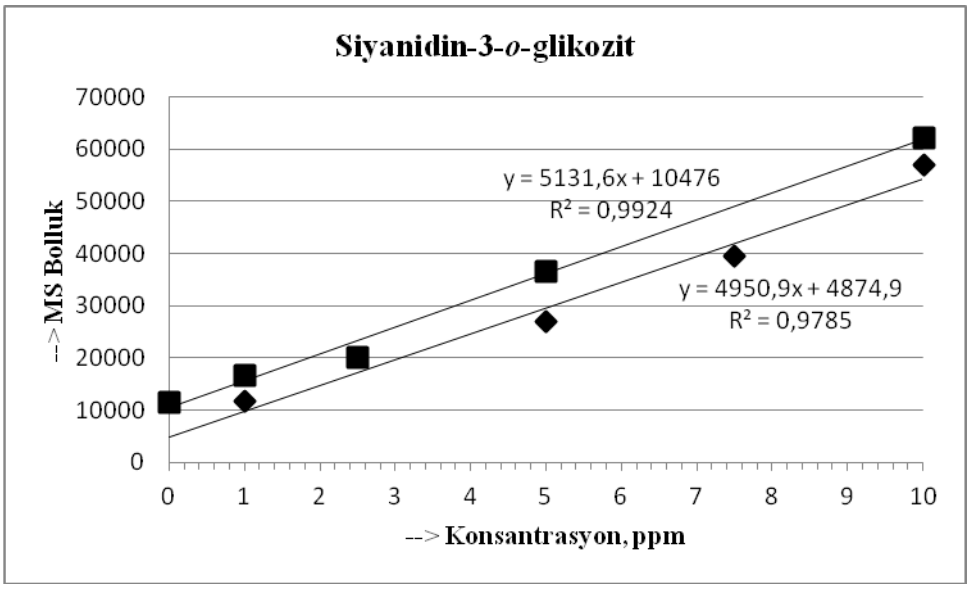
Şekil 5.31. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



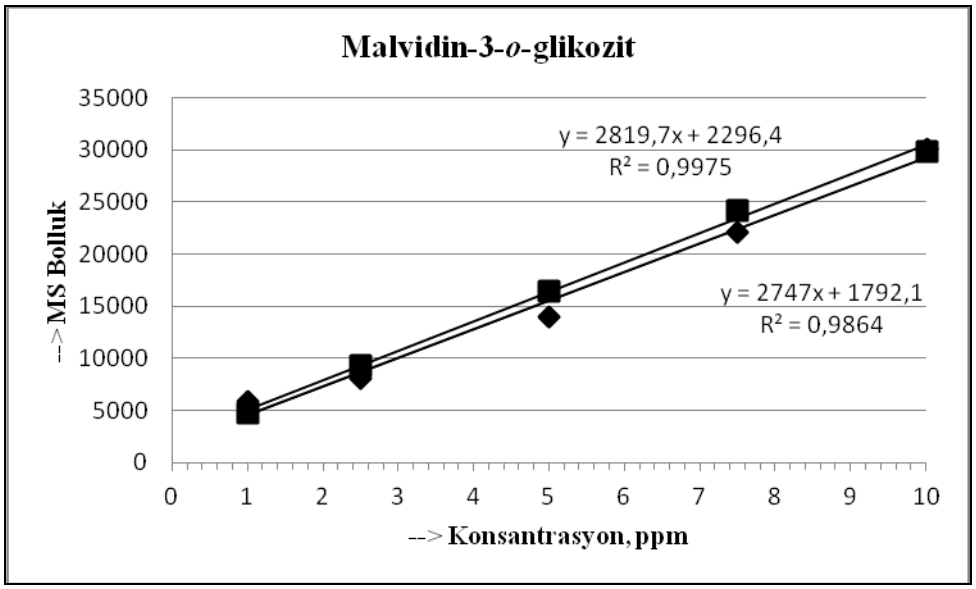
Şekil 5.32. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 5.33. Kiraz meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 5.34. Kiraz meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 5.35. Kiraz meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri

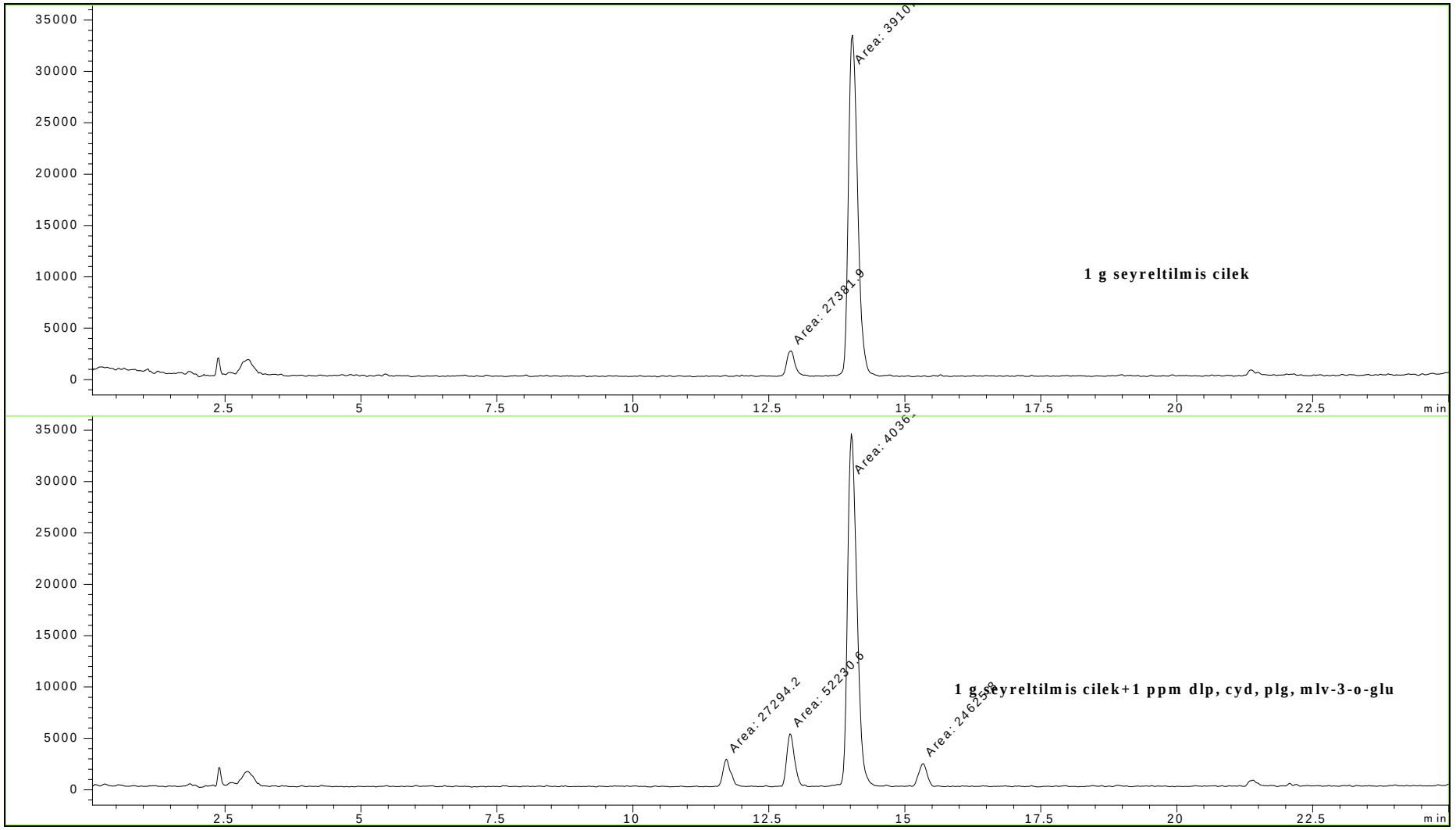
5.4. Çilek *(Fragaria vesca* L.*)* Meyvesinde Bulunan Antosiyanin Bileşiklerinin Konsantrasyonları

Bu amaçla, hem kalibrasyon hem de standart ekleme metodu uygulandı. Farklı yerlerden alınmış çilek örnekleri optimum ekstraksiyon şartlarında ekstrakte edildi. Örneklere standart ekleme metodu uygulandı. Bu amaçla aynı örneğe ait yine aynı hacimdeki beş ayrı ekstrakta bilinen konsantrasyonlarda antosiyanin çözeltileri eklendi. Böylece elde edilen çözeltiler ve standart çözeltilerin optimum HPLC-MS şartlarında kromatogram ve MS spektrumları alınarak kalibrasyon ve standart ekleme grafikleri elde edildi (Şekil 5.4, 5.5, 5.11-5.23, 5.36-5.58).

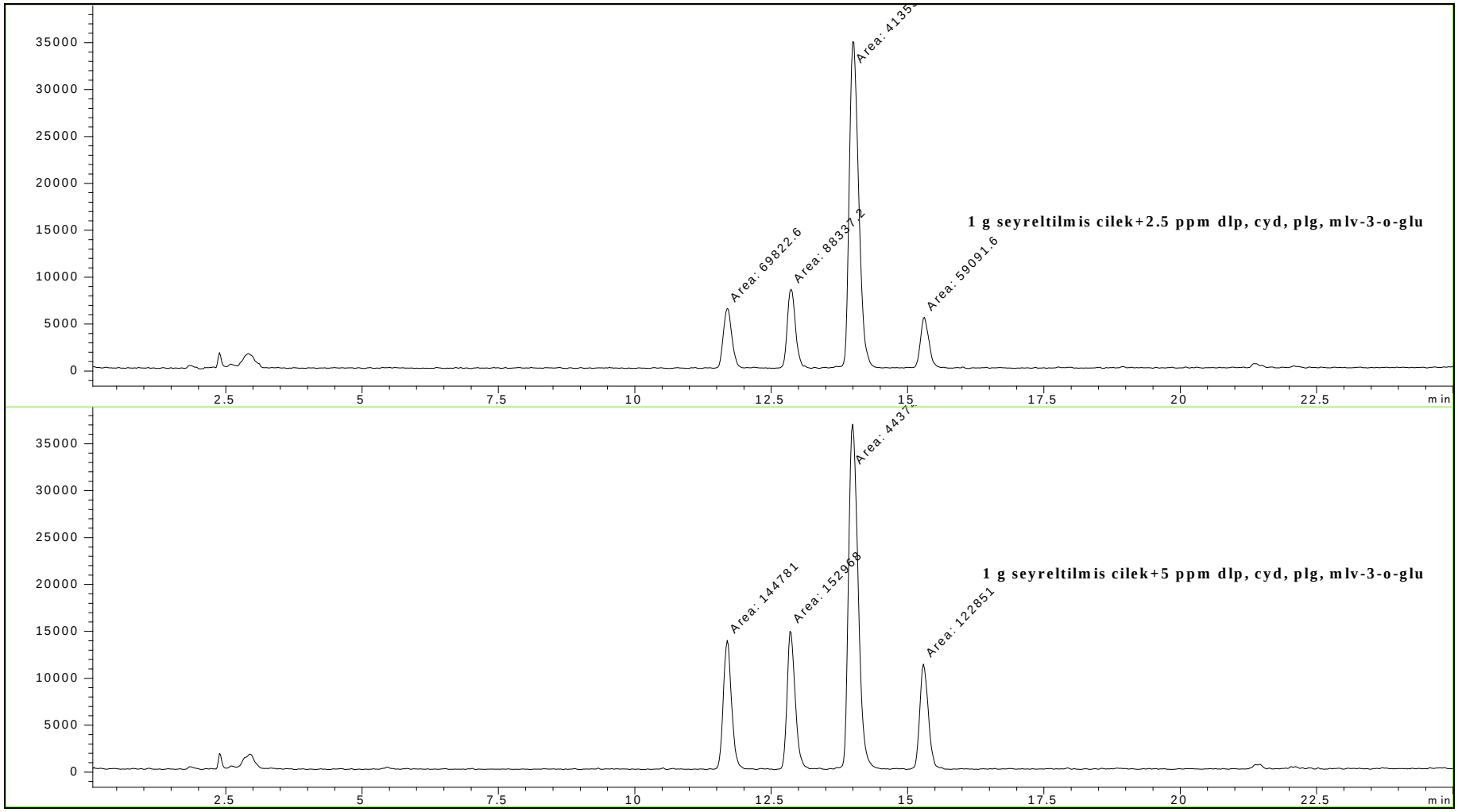
Siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 448.7 m/z $(M)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 449.7 m/z $(M+1)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 286.9 m/z piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan siyanidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 432.7 m/z $(M)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 433.6 m/z $(M+1)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 270.8 m/z piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan pelargonidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 492.8 m/z $(M)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 493.8 m/z $(M+1)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 330.8 m/z piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan malvidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Bu MS spektrumlarının yorumlanmasıyla çilek meyvesindeki antosiyanin bileşiklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

Bu şekillerdeki bulgular değerlendirildiğinde, kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit için paralel olduğu gözlendi. Çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayinine ilişkin kromatogramlardan elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin paralel olmadığı gözlendi. Çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayinine ilişkin MS spektrumlarından elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin birbirlerine paralel olduğu gözlendi. Bu verilerden, kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının

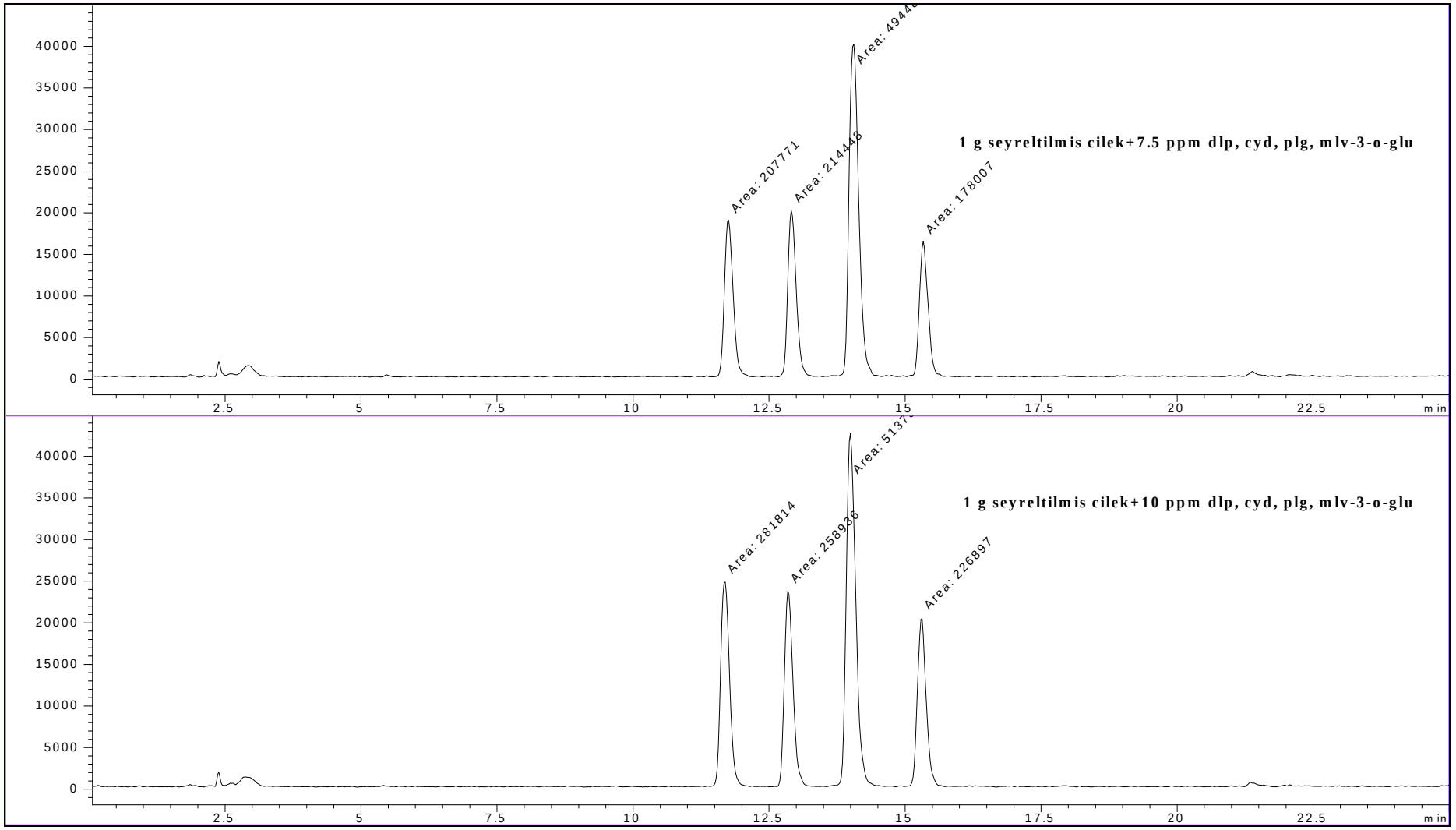
kimyasal girişim nedeniyle uygun olmadığı sonucuna varıldı. Böylece çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayini için MS spektrumlarından elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılması daha güvenilir olacağı anlaşılmaktadır. Tablo 5.2' de verilen değerler kromatogramlar için standart ekleme grafiklerinden bulunan konsantrasyonlardır. MS bolluklarından bulunan değerler ise kalibrasyon grafiklerinden elde edilen konsantrasyonlardır.



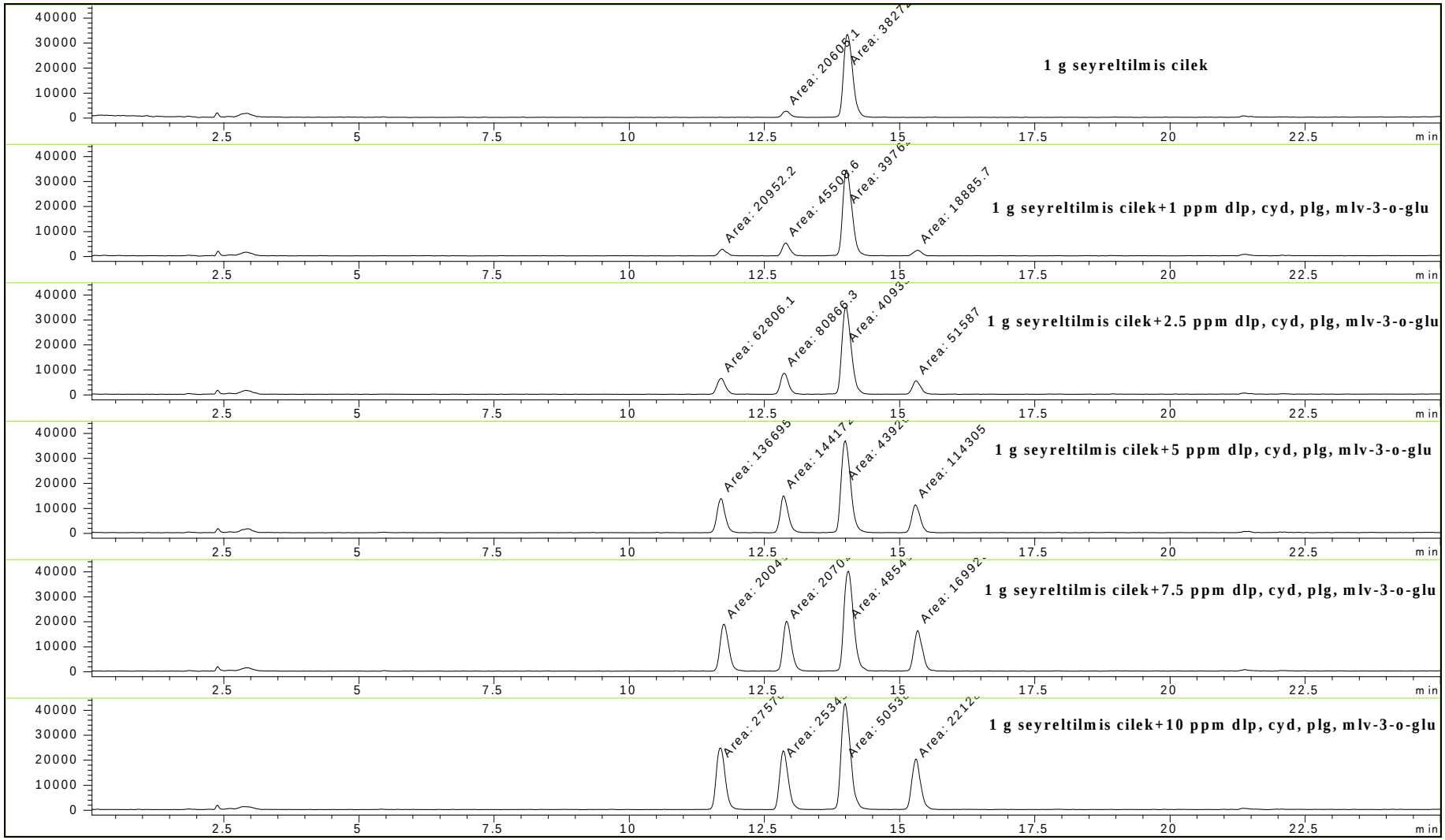
Şekil 5.36. Çilek meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



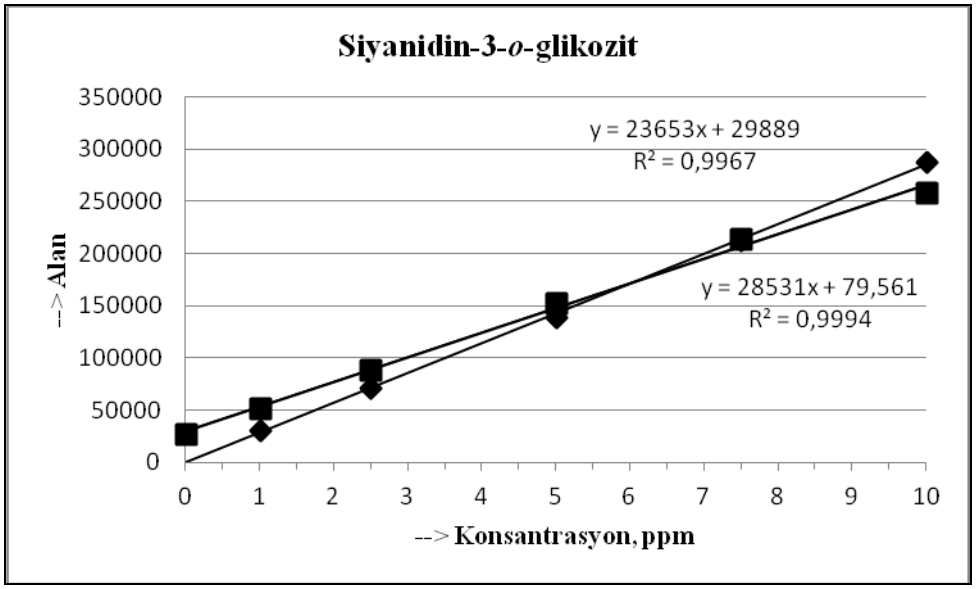
Şekil 5.37. Çilek meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



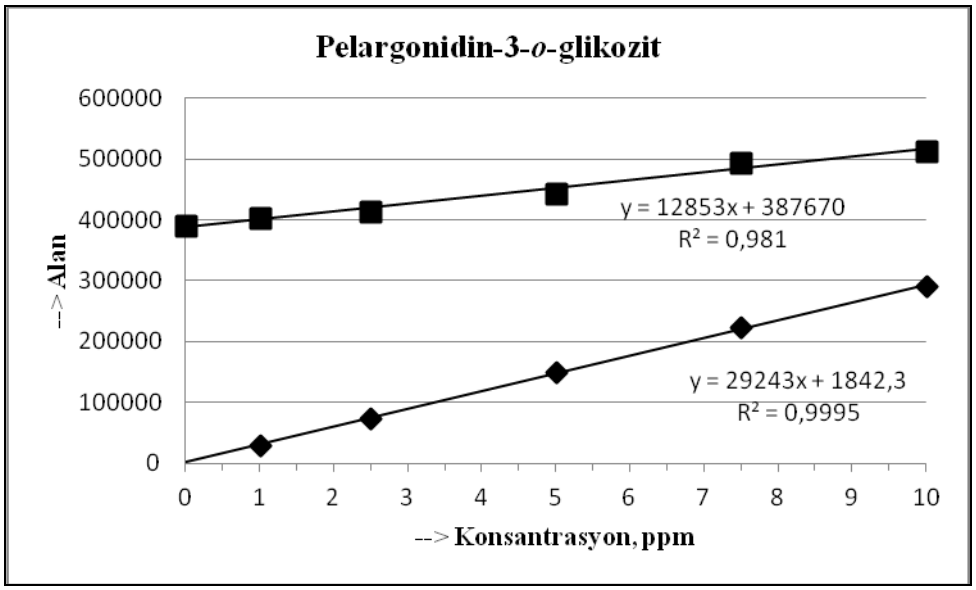
Şekil 5.38. Çilek meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



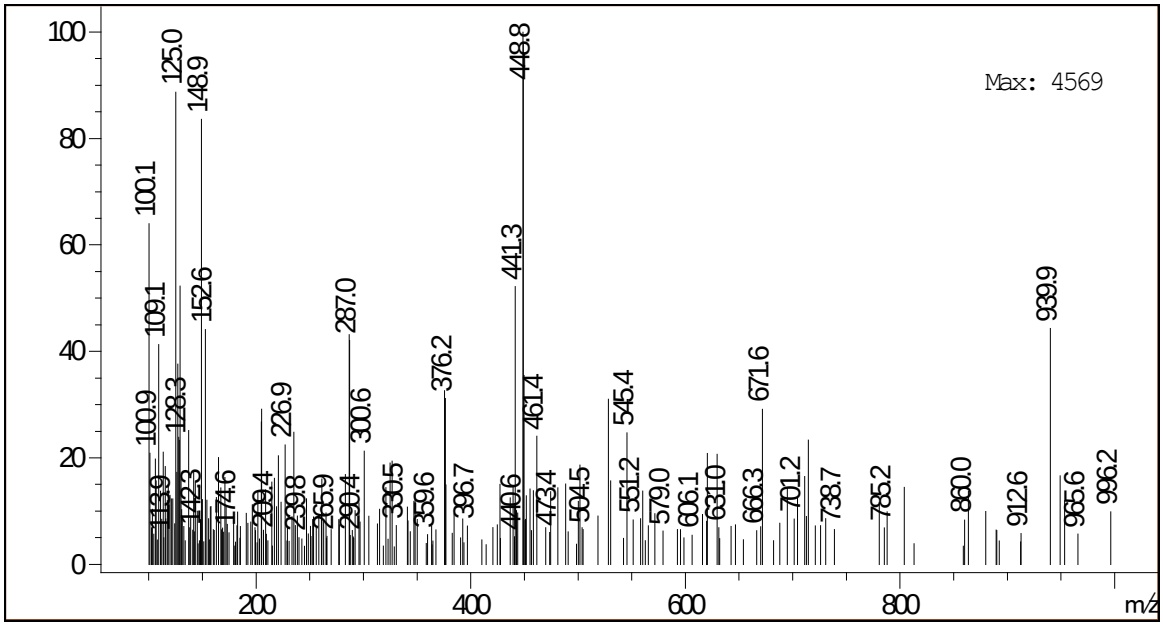
Şekil 5.39. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



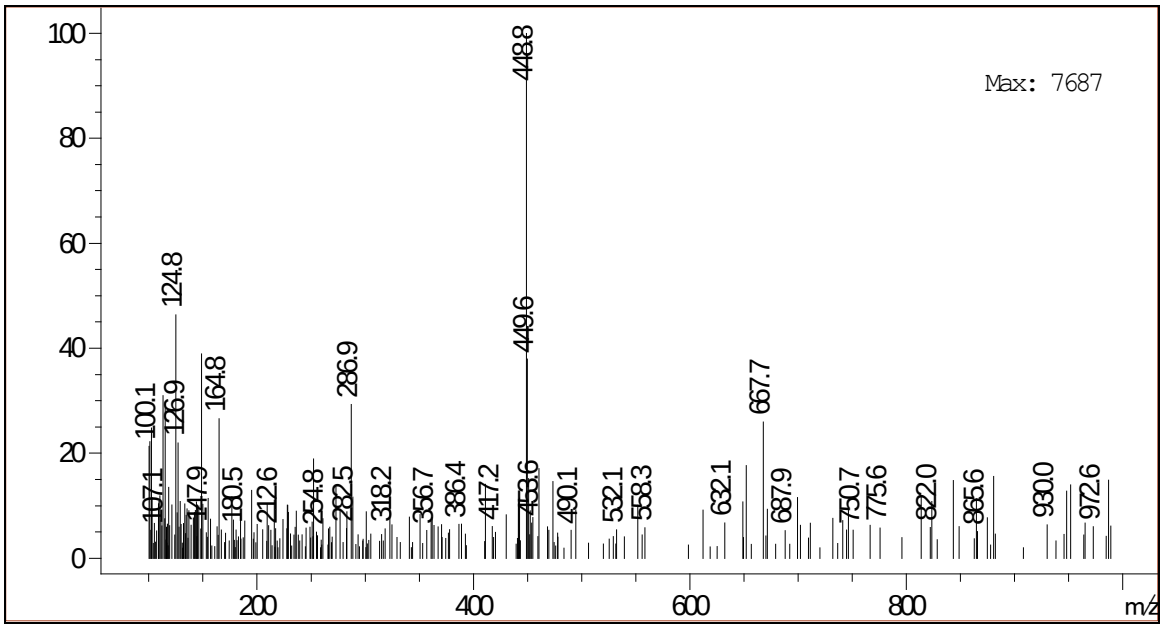
Şekil 5.40. Çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



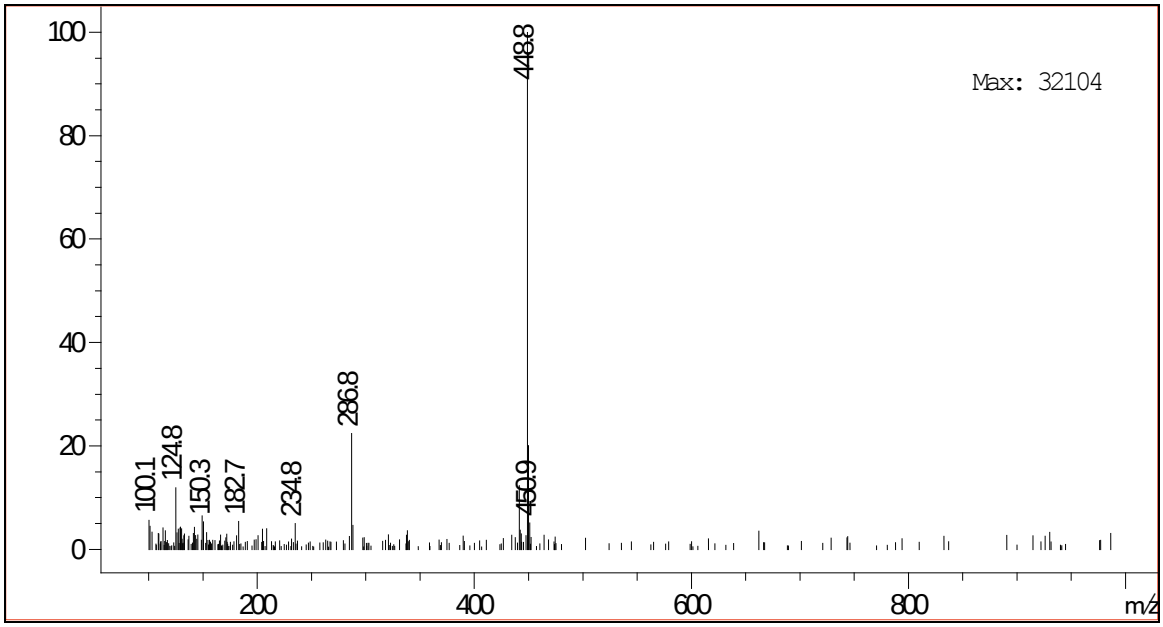
Şekil 5.41. Çilek meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



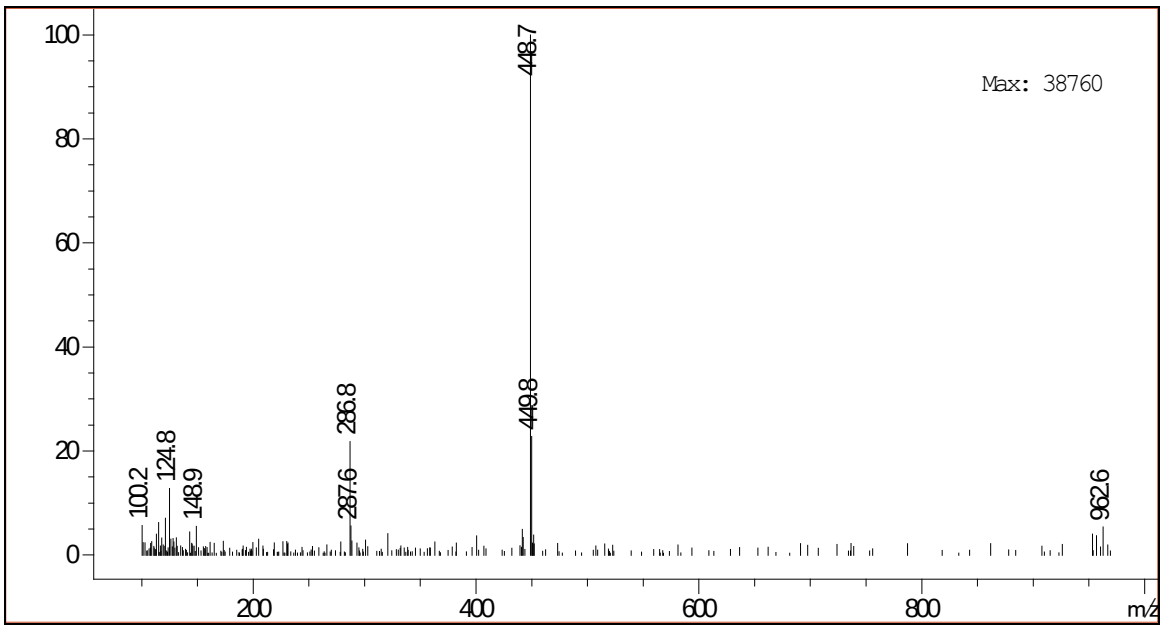
Şekil 5.42. Çilek meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu



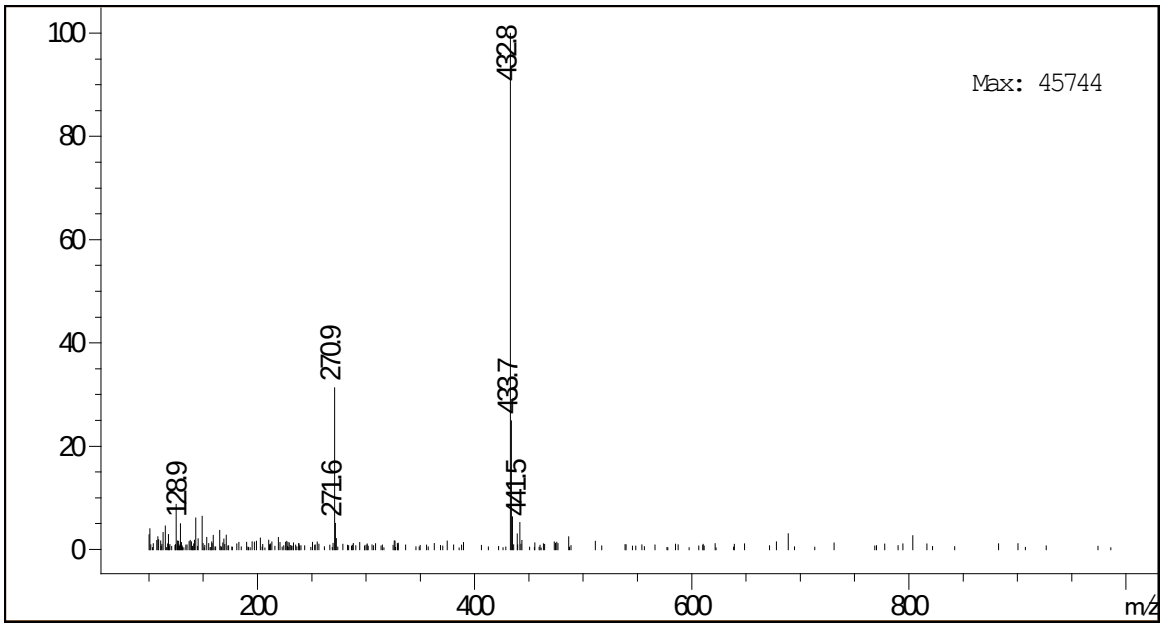
Şekil 5.43. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



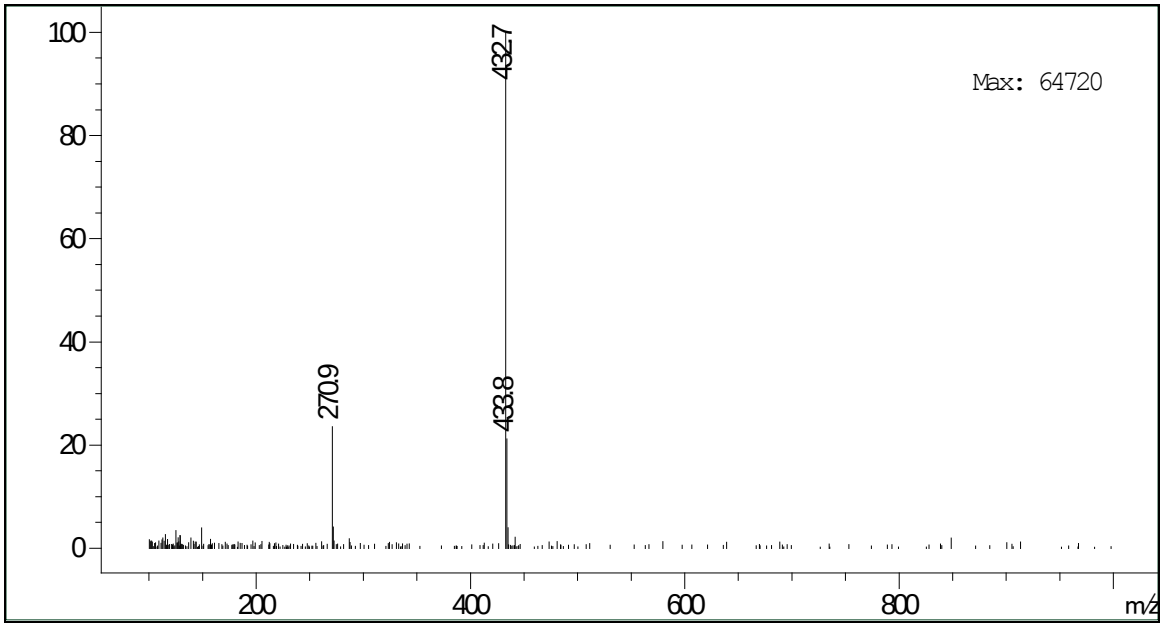
Şekil 5.44. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



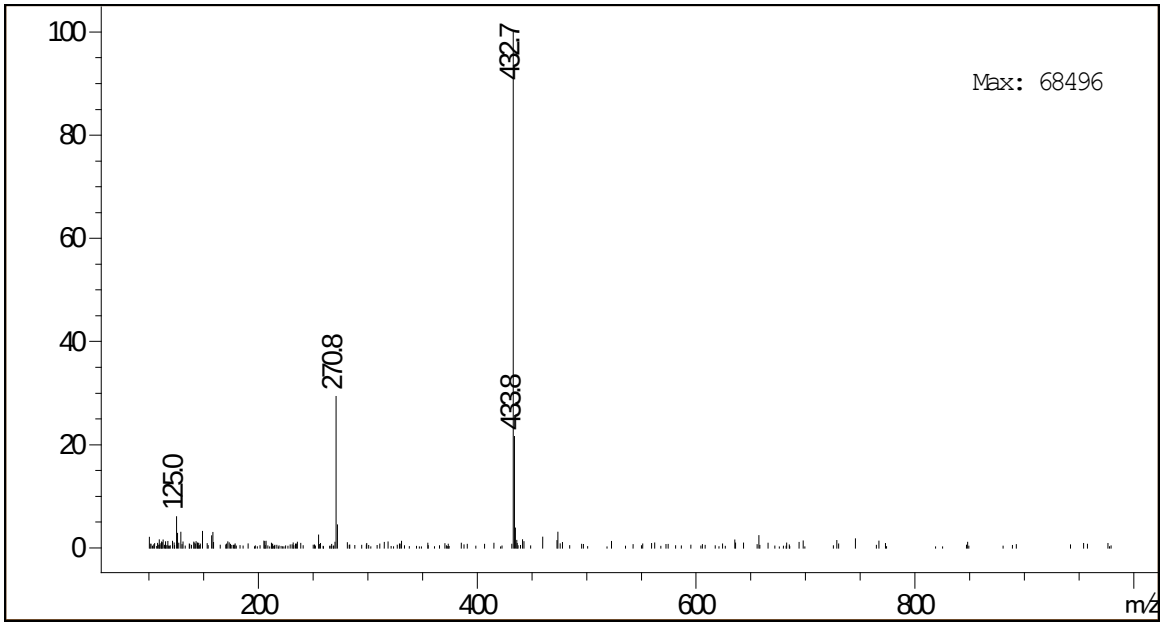
Şekil 5.45. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



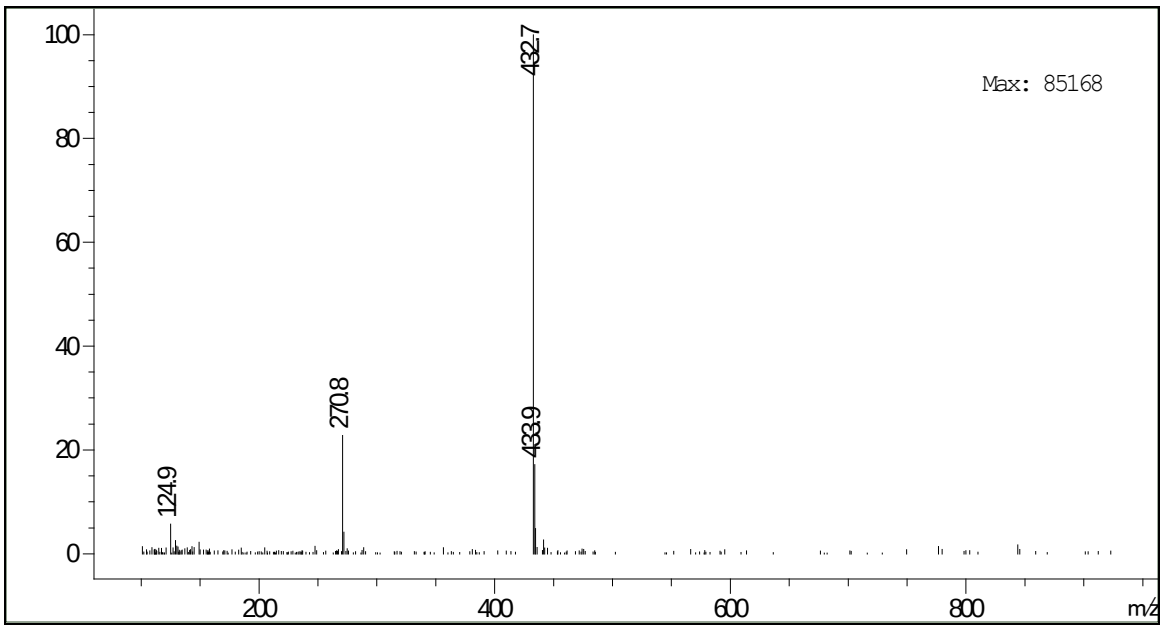
Şekil 5.46. Çilek meyvesi için elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu



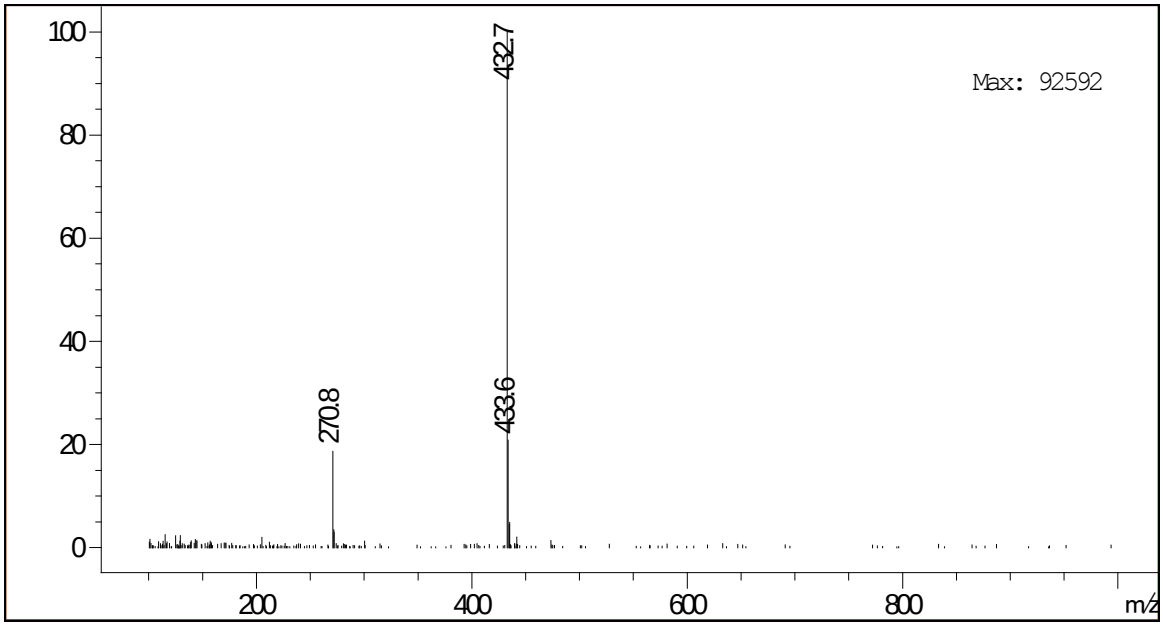
Şekil 5.47. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



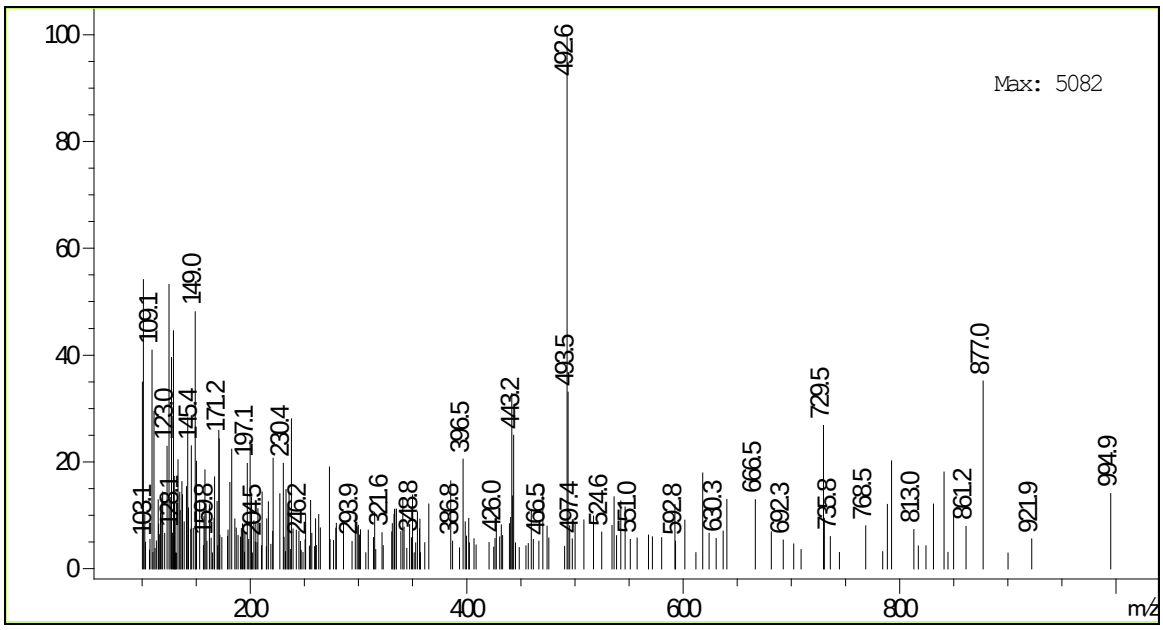
Şekil 5.48. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



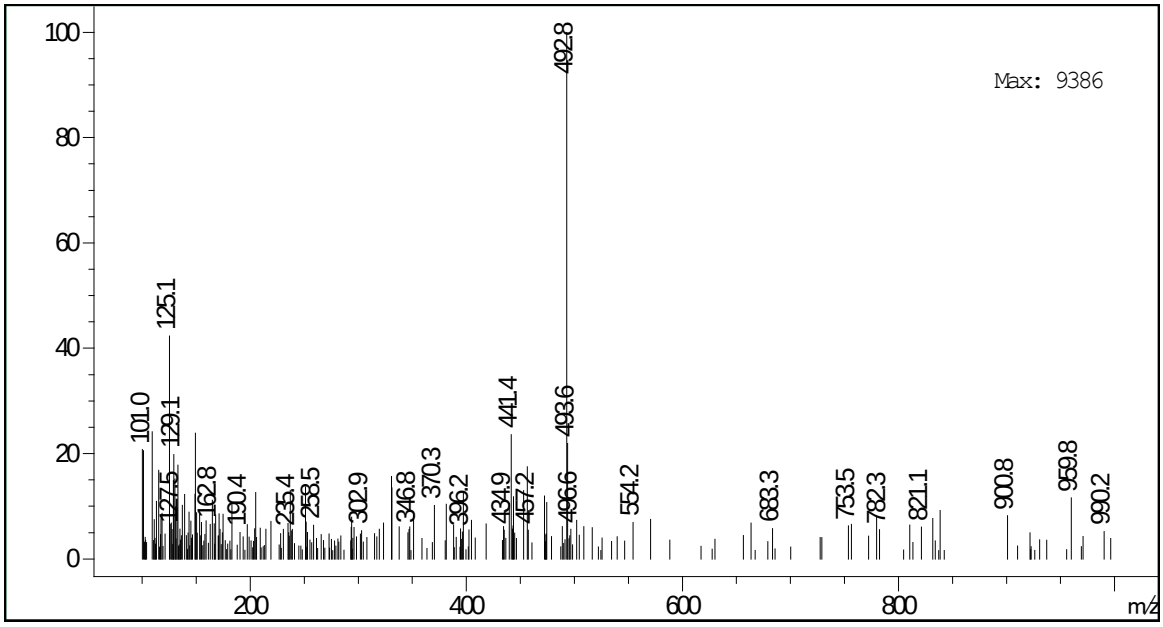
Şekil 5.49. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



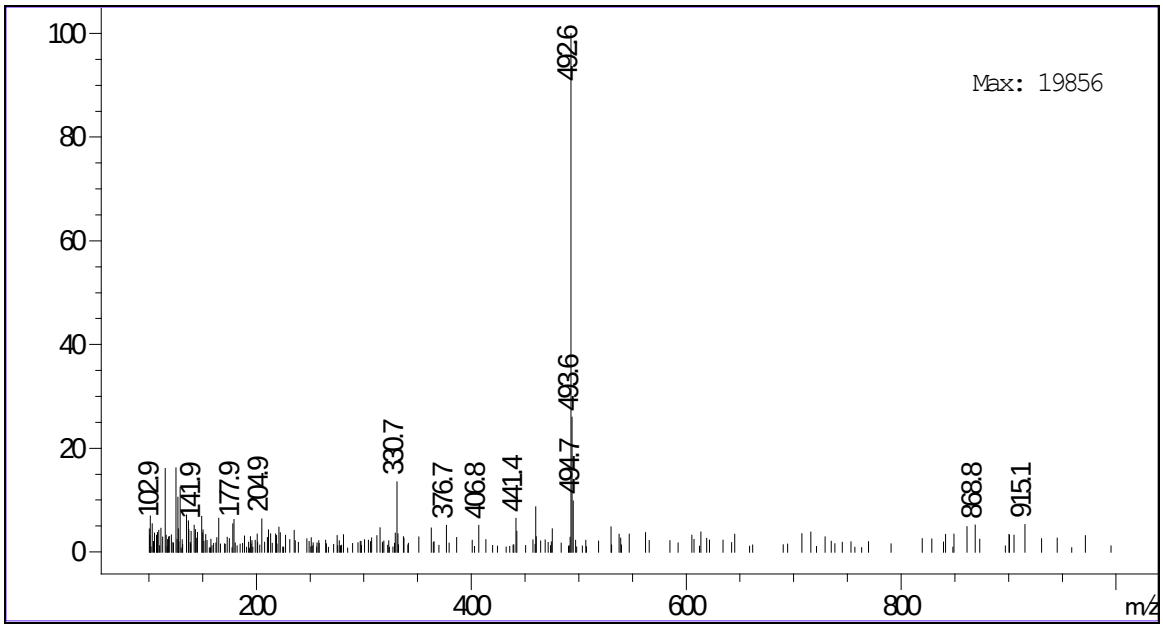
Şekil 5.50. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



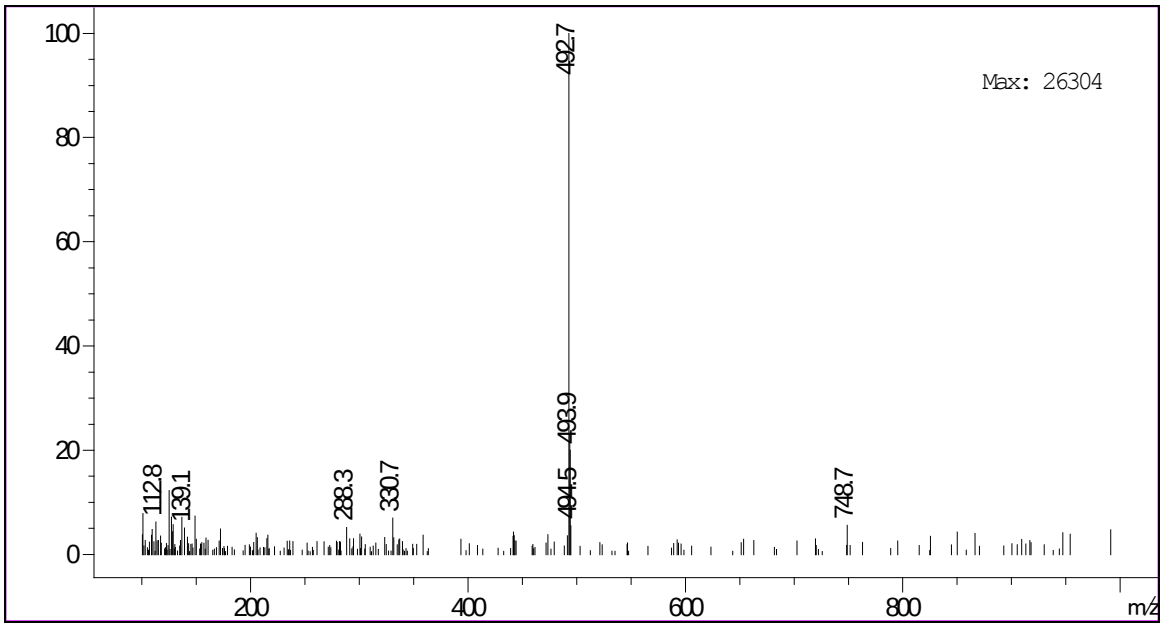
Şekil 5.51. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



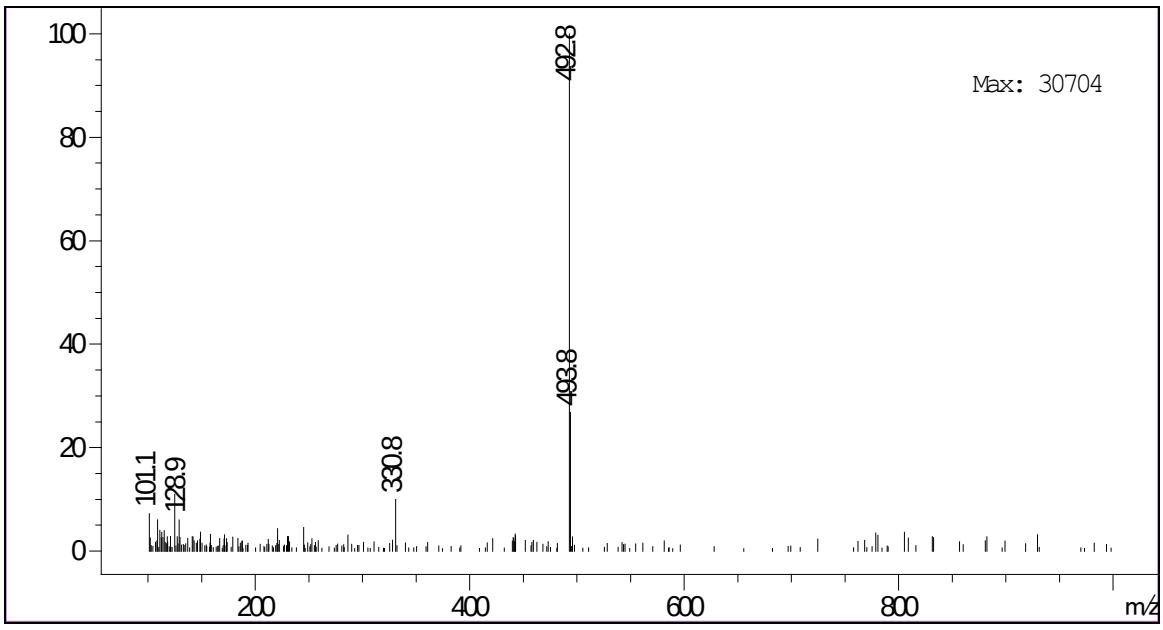
Şekil 5.52. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



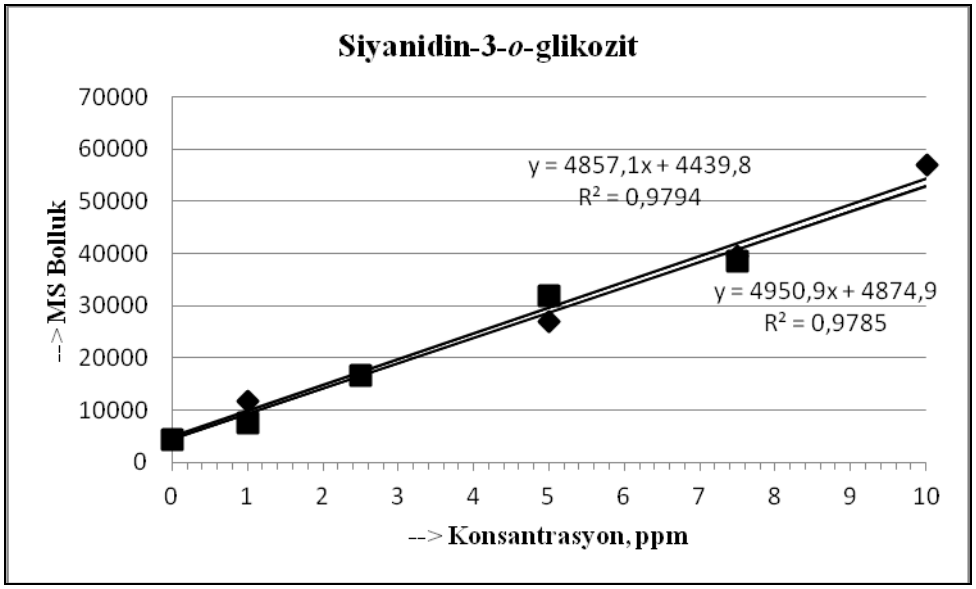
Şekil 5.53. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



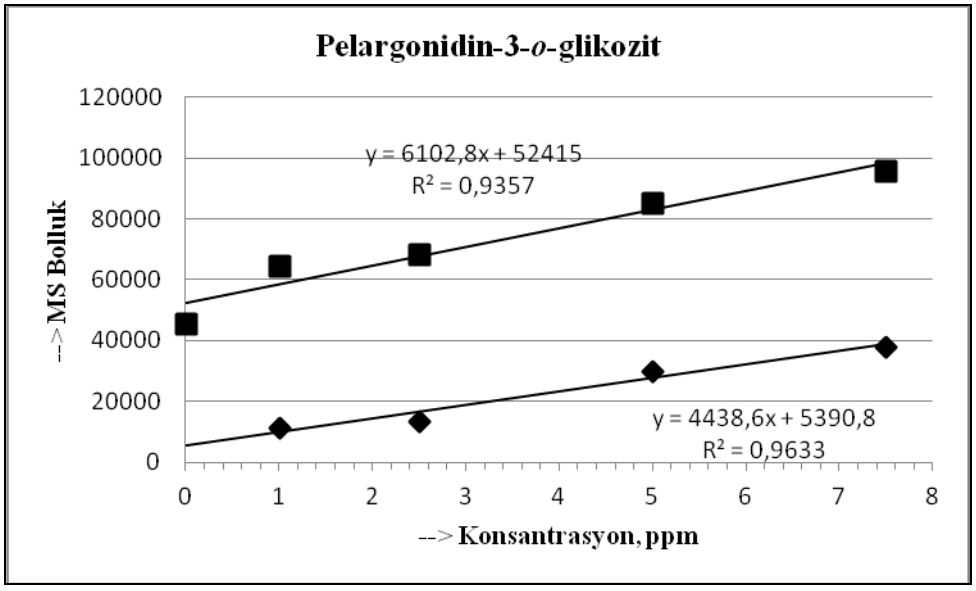
Şekil 5.54. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



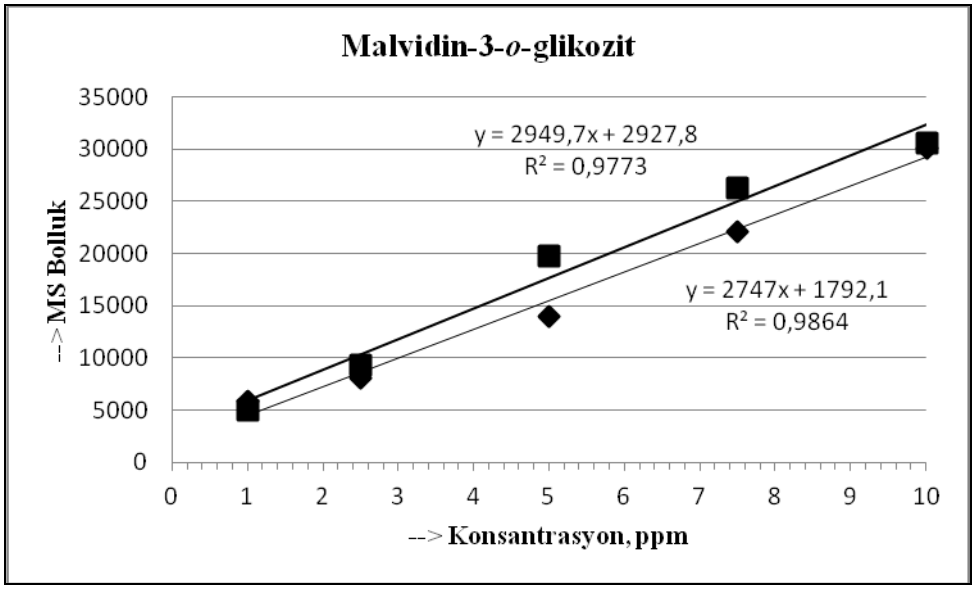
Şekil 5.55. Çilek meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 5.56. Çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 5.57. Çilek meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 5.58. Çilek meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri

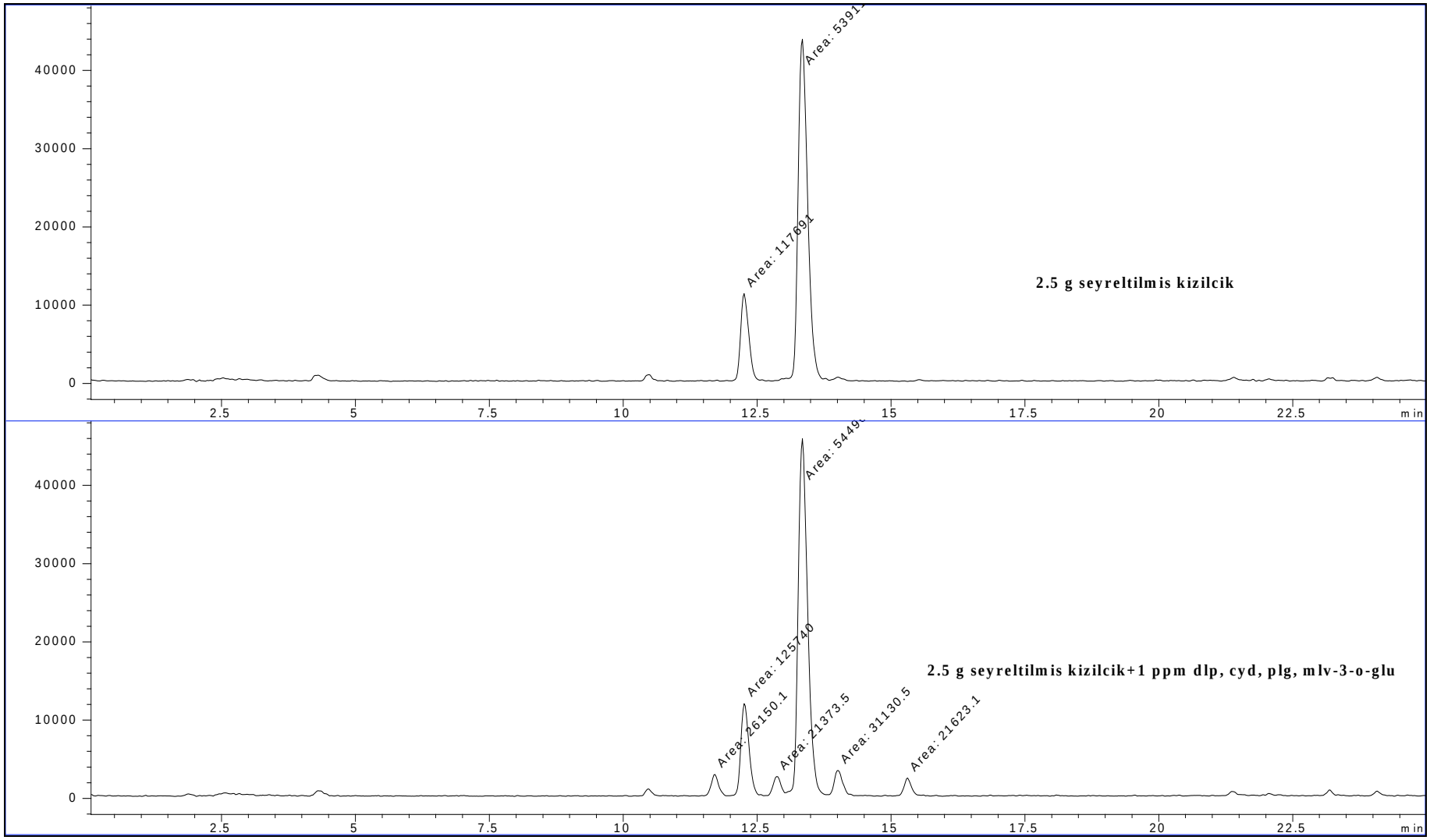
5.5. Kızılcık *(Cornus mas* L.*)* Meyvesinde Bulunan Antosiyanin Bileşiklerinin Konsantrasyonları

Bu amaçla, hem kalibrasyon hem de standart ekleme metodu uygulandı. Farklı yerlerden alınmış kızılcık örnekleri optimum ekstraksiyon şartlarında ekstrakte edildi. Örneklere standart ekleme metodu uygulandı. Bu amaçla aynı örneğe ait yine aynı hacimdeki beş ayrı ekstrakta bilinen konsantrasyonlarda antosiyanin çözeltileri eklendi. Böylece elde edilen çözeltiler ve standart çözeltilerin optimum HPLC-MS şartlarında kromatogram ve MS spektrumları alınarak kalibrasyon ve standart ekleme grafikleri elde edildi (Şekil 5.4, 5.5, 5.11-5.23, 5.59-5.90).

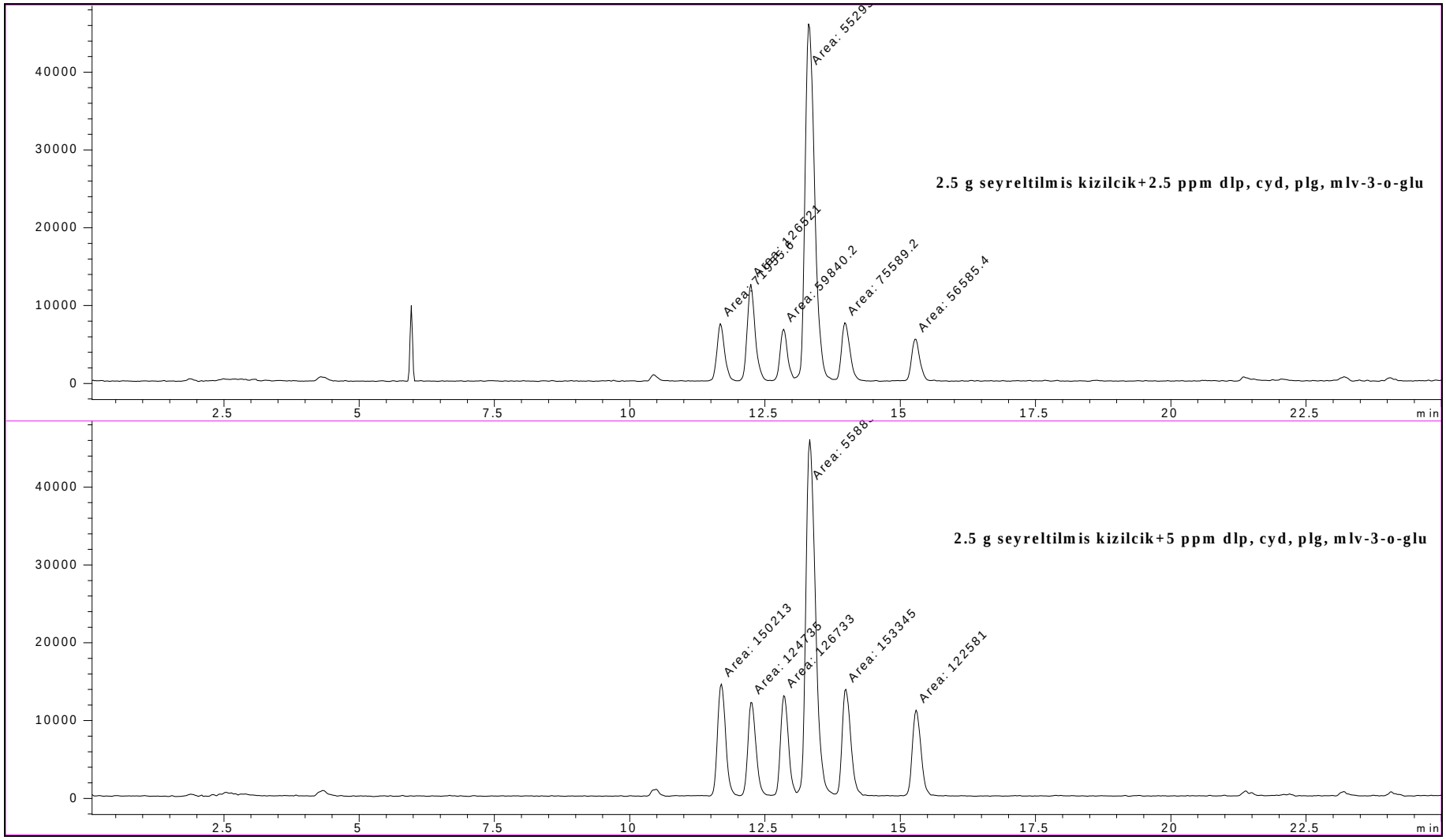
Siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 448.8 m/z $(M)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 449.6 m/z $(M+1)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 286.9 m/z piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan siyanidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 432.8 m/z $(M)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış

haline karşılık gelen temel pik, 433.9 m/z $(M+1)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 270.8 m/z piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan pelargonidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 492.7 m/z $(M)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 493.6 m/z $(M+1)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 330.8 m/z piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan malvidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Bu MS spektrumlarının yorumlanmasıyla kızılcık meyvesindeki antosiyanin bileşiklerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

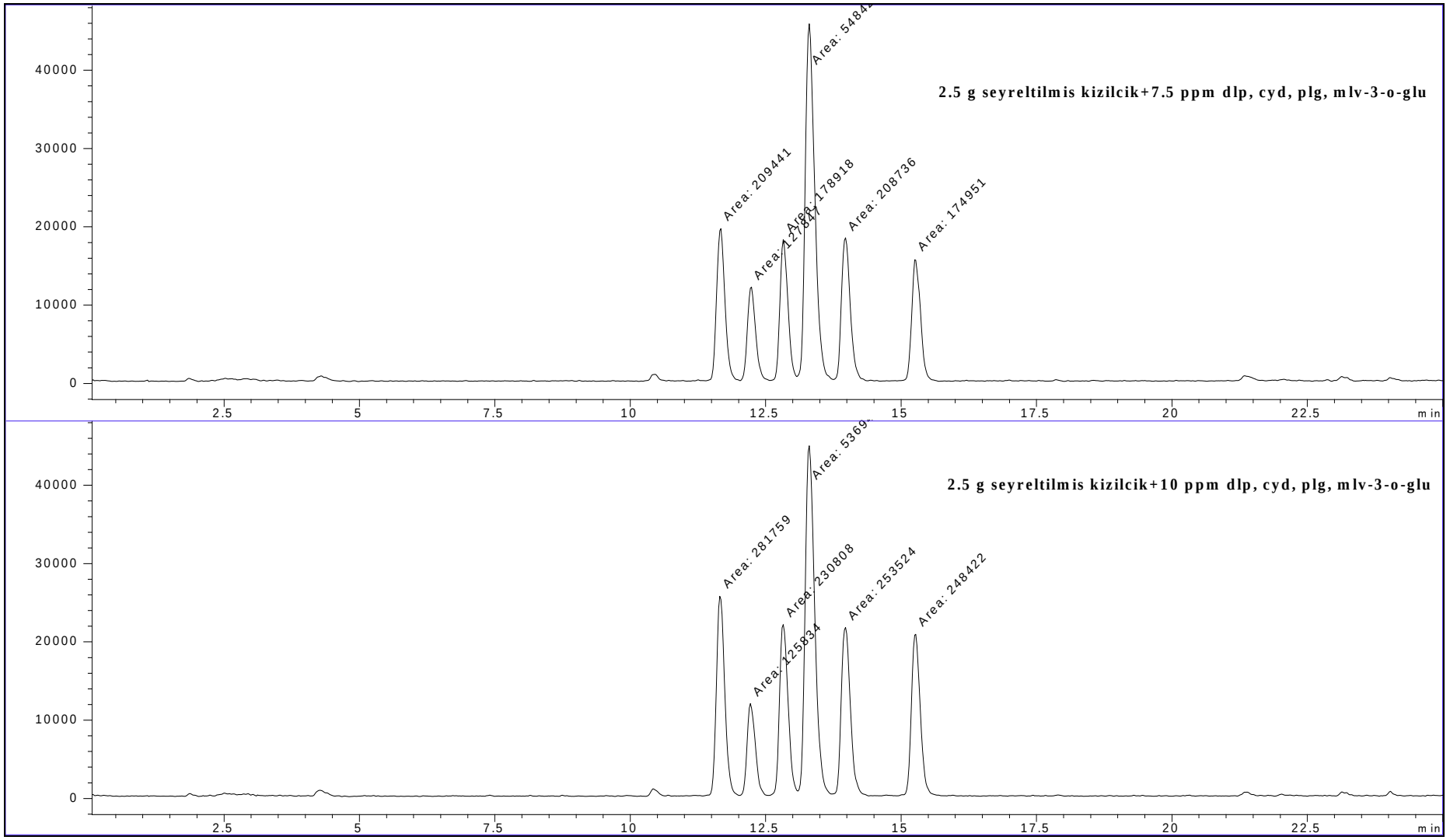
Bu şekillerdeki bulgular değerlendirildiğinde, kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit için paralel olduğu, pelargonidin-3-*o*-glikozit için paralel olmadığı gözlendi. Kızılcık örneğinde pelargonidin-3-*o*-glikozit tayini için kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının kimyasal girişim nedeniyle uygun olmadığı sonucuna varıldı. Bu amaçla, MS spektrumlarından elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının daha güvenilir olacağı görülmektedir. Tablo 5.2' de verilen değerler, kromatogramlar için standart ekleme grafiklerinden bulunan konsantrasyonlardır. MS bolluklarından bulunan değerler ise kalibrasyon grafiklerinden elde edilen konsantrasyonlardır.



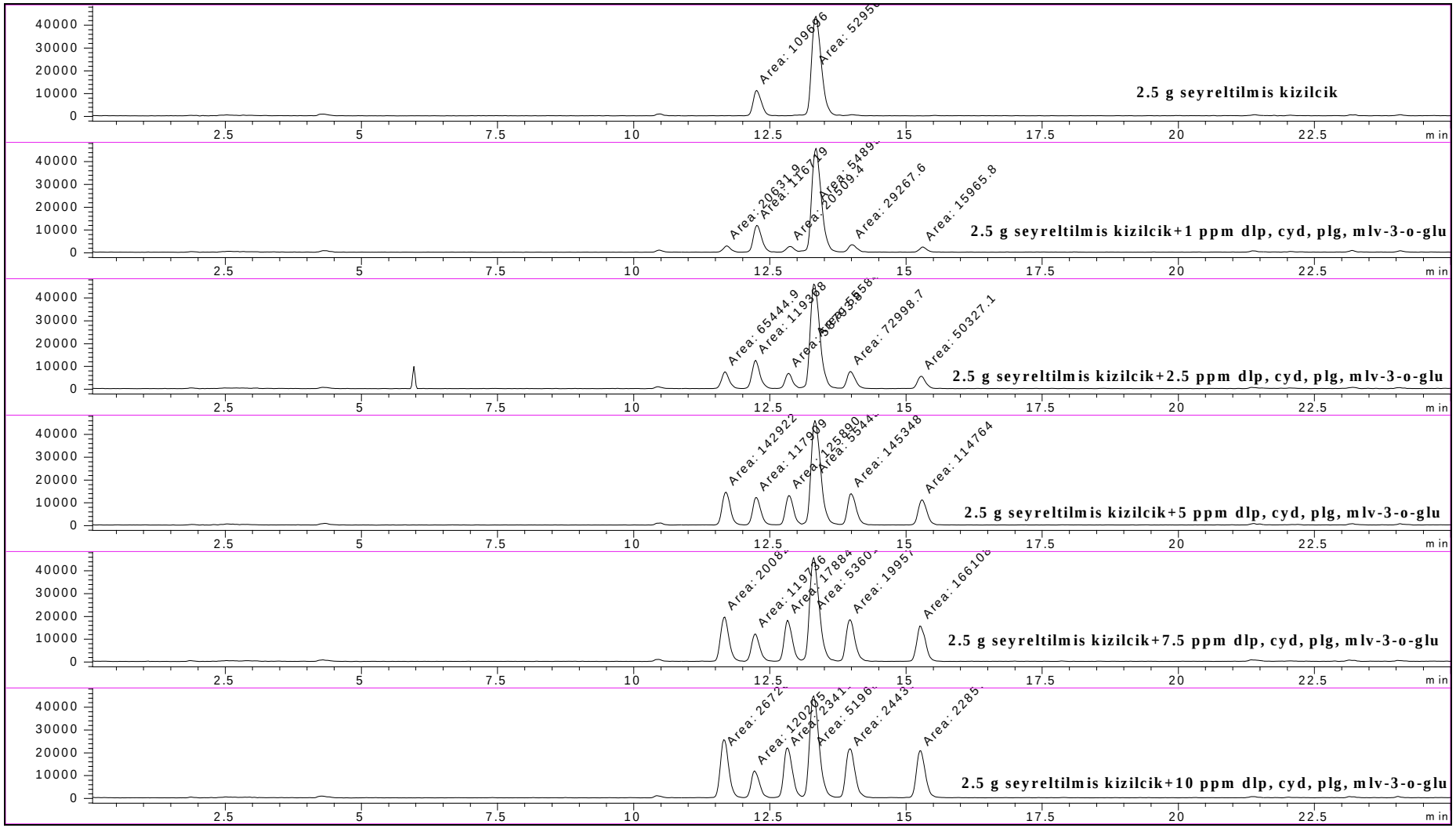
Şekil 5.59. Kızılcık meyvesine 1 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



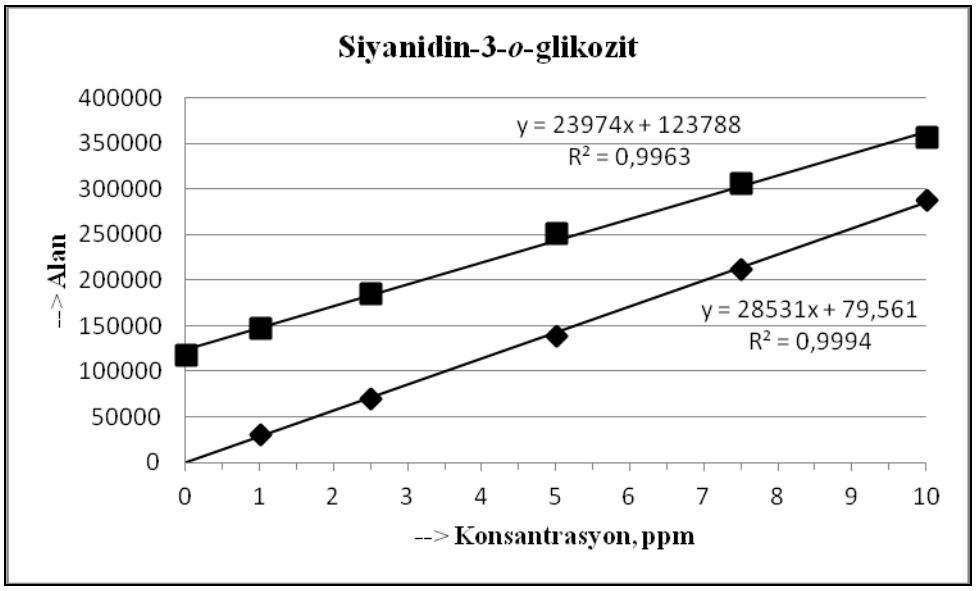
Şekil 5.60. Kızılcık meyvesine 2.5-5 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



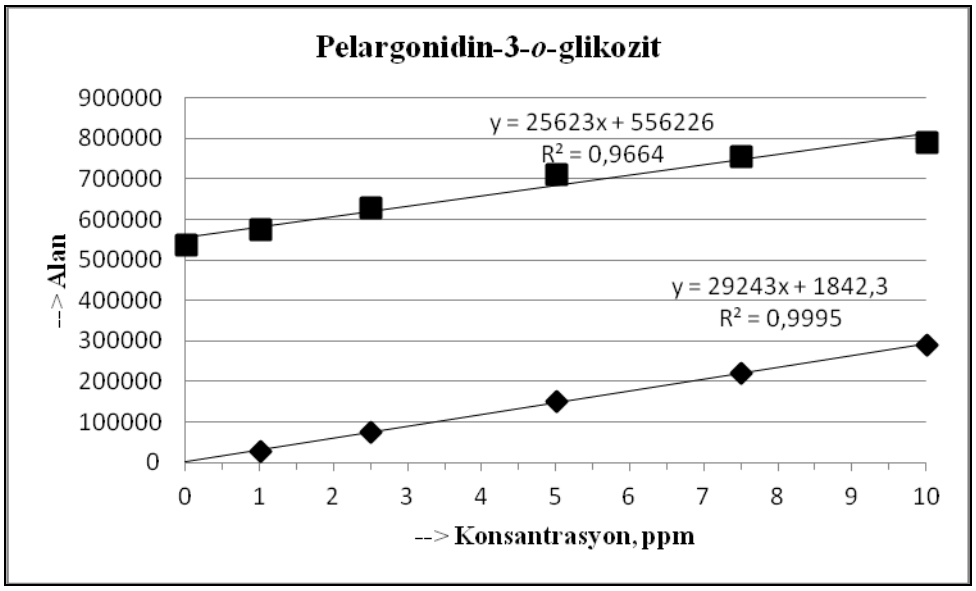
Şekil 5.61. Kızılcık meyvesine 7.5-10 ppm standart çözeltilerin eklenmesiyle elde edilen kromatogramlar (standart ekleme metodu)



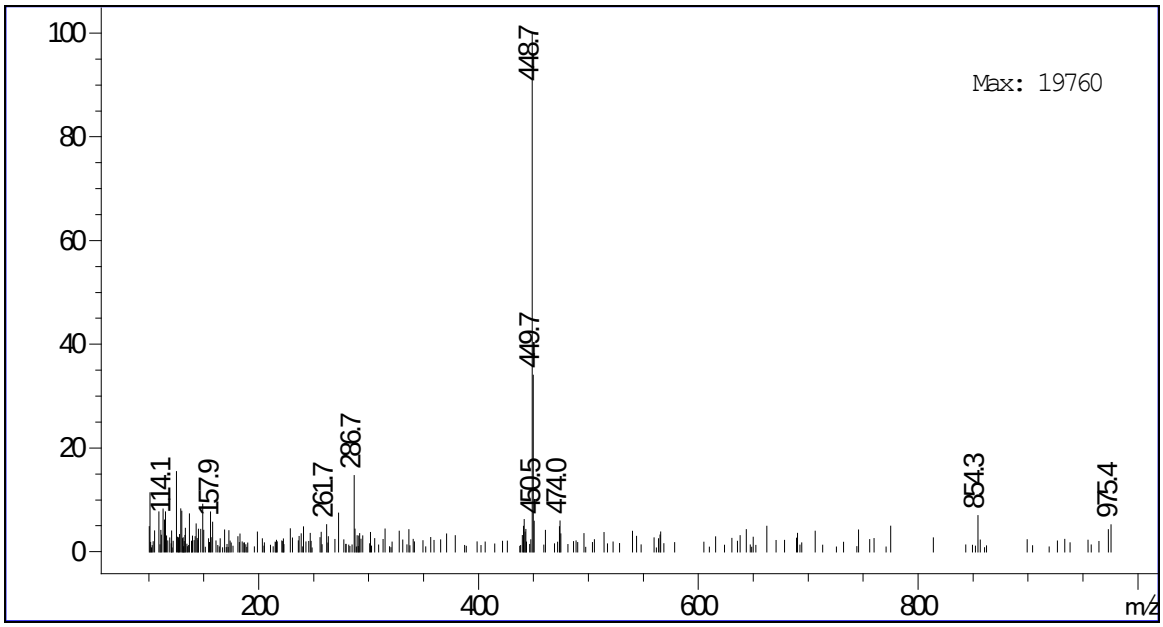
Şekil 5.62. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen antosiyanin bileşiklerine ait HPLC-ESI-MS kromatogramları



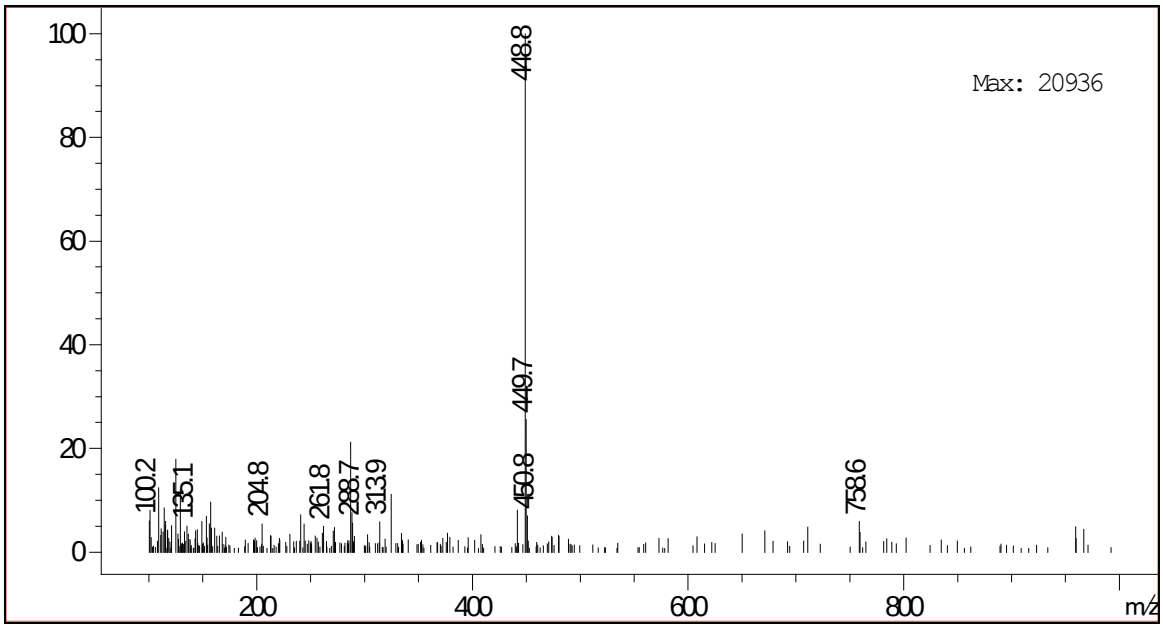
Şekil 5.63. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



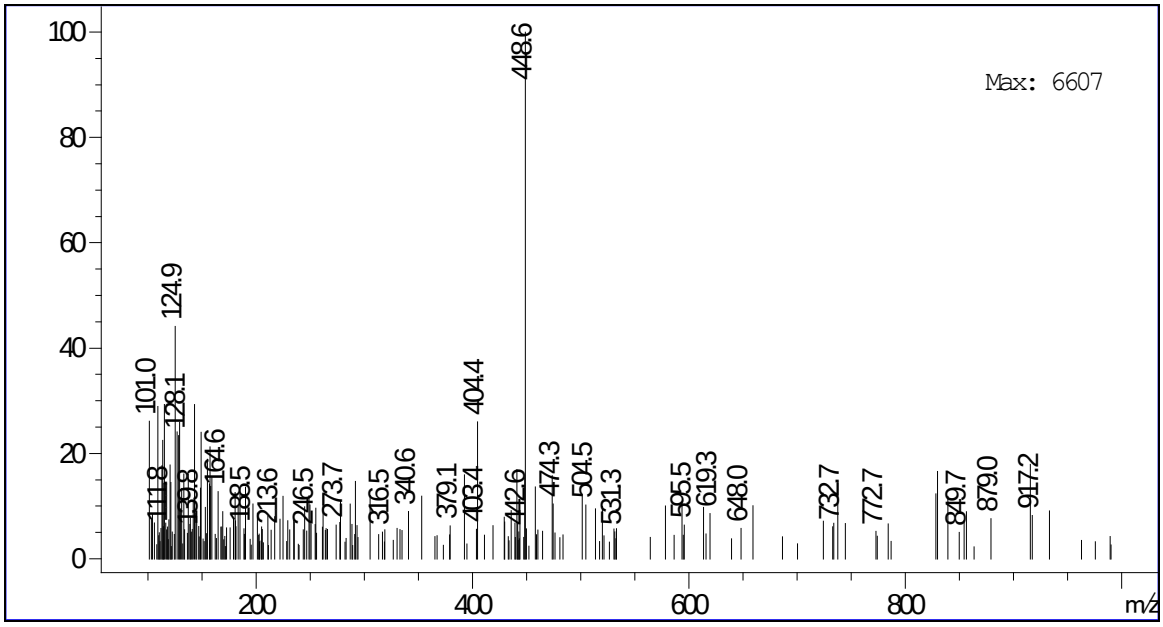
Şekil 5.64. Kızılcık meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



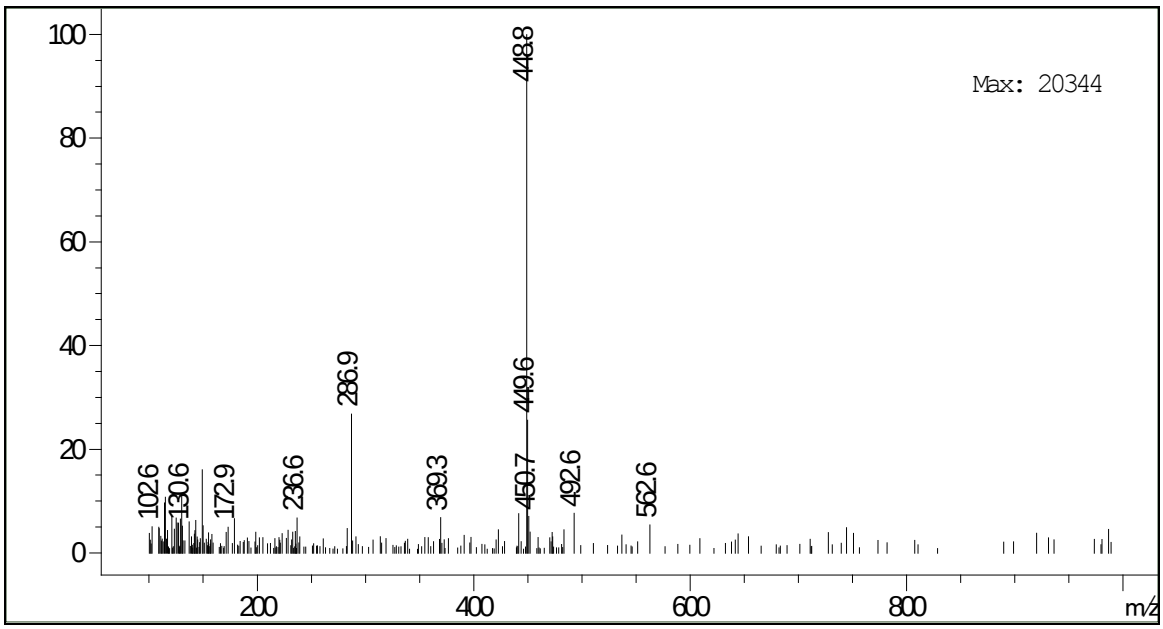
Şekil 5.65. Kızılcık meyvesi için elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu



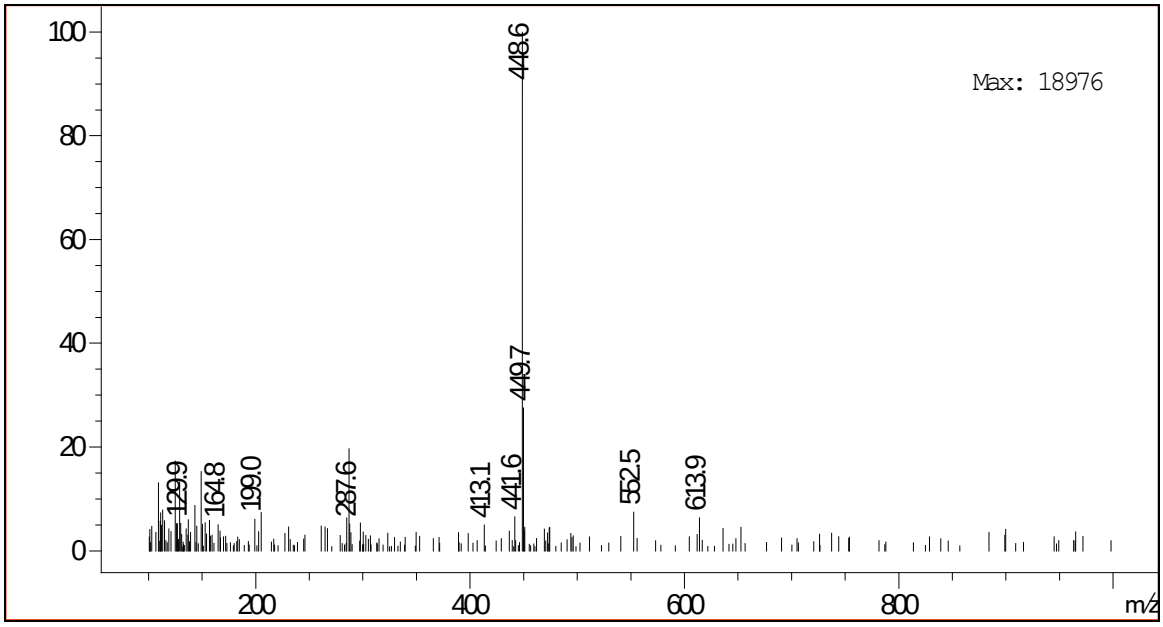
Şekil 5.66. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



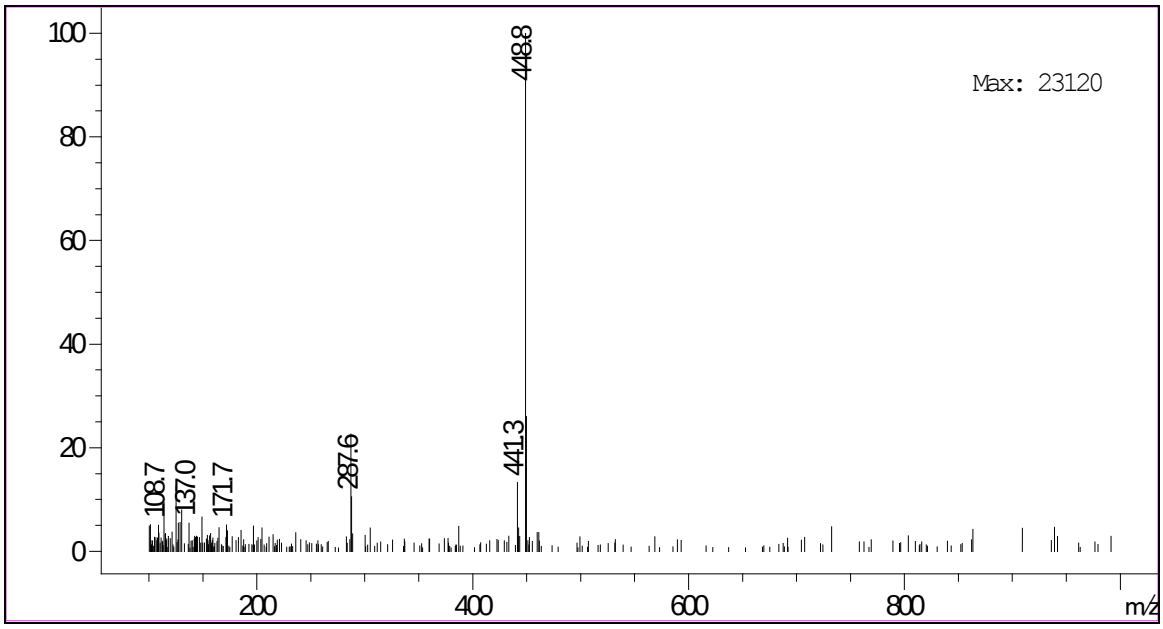
Şekil 5.67. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



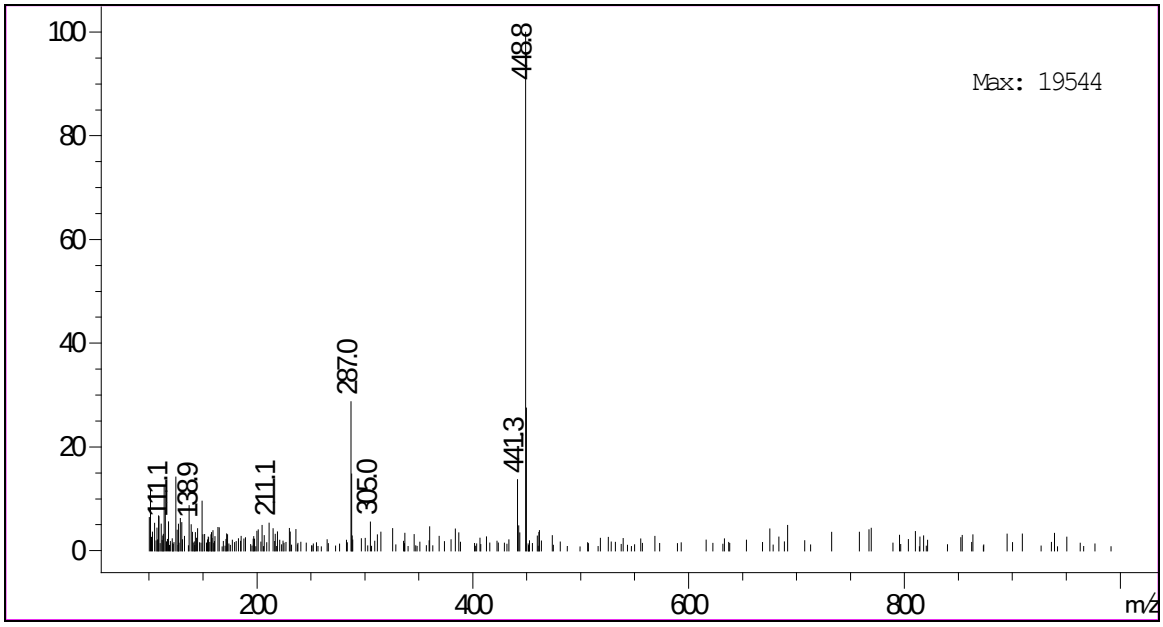
Şekil 5.68. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



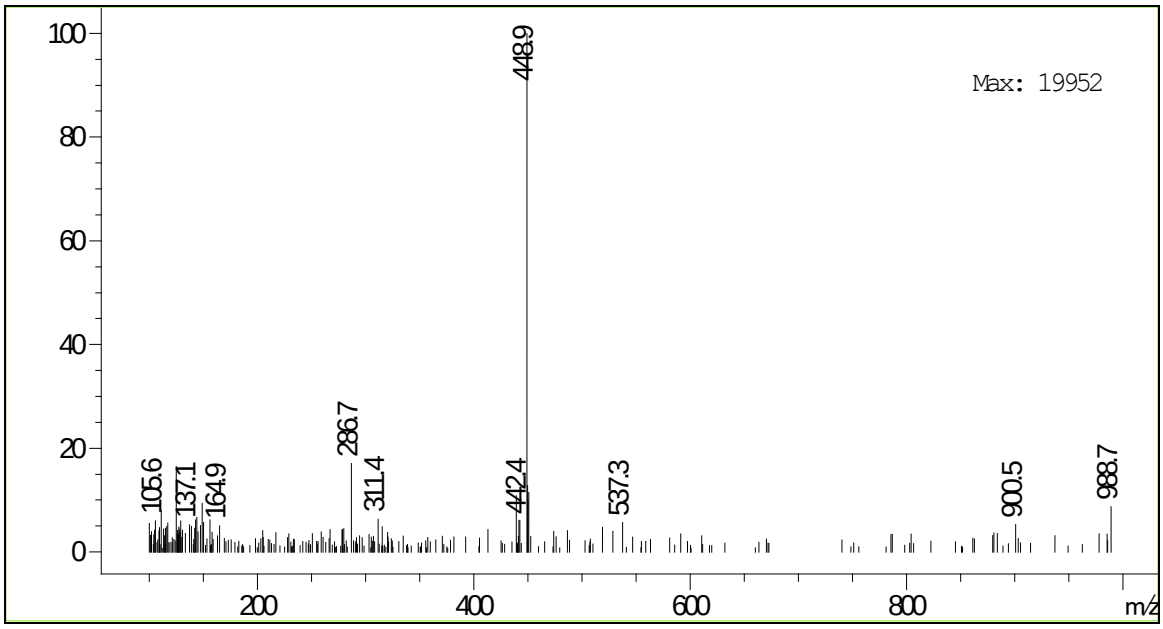
Şekil 5.69. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



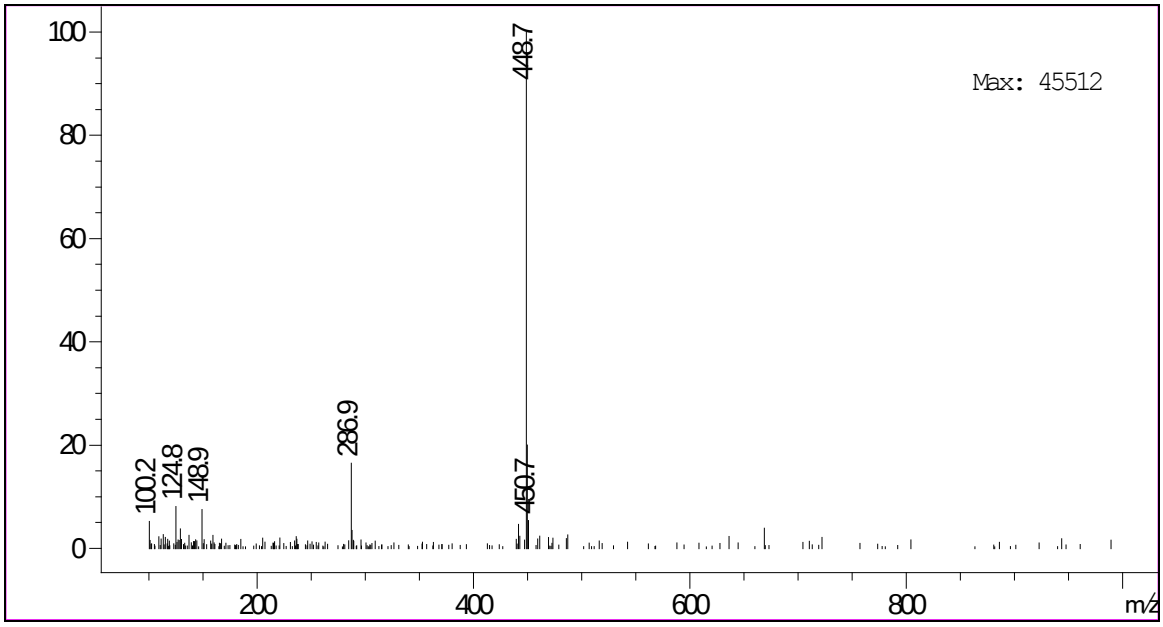
Şekil 5.70. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



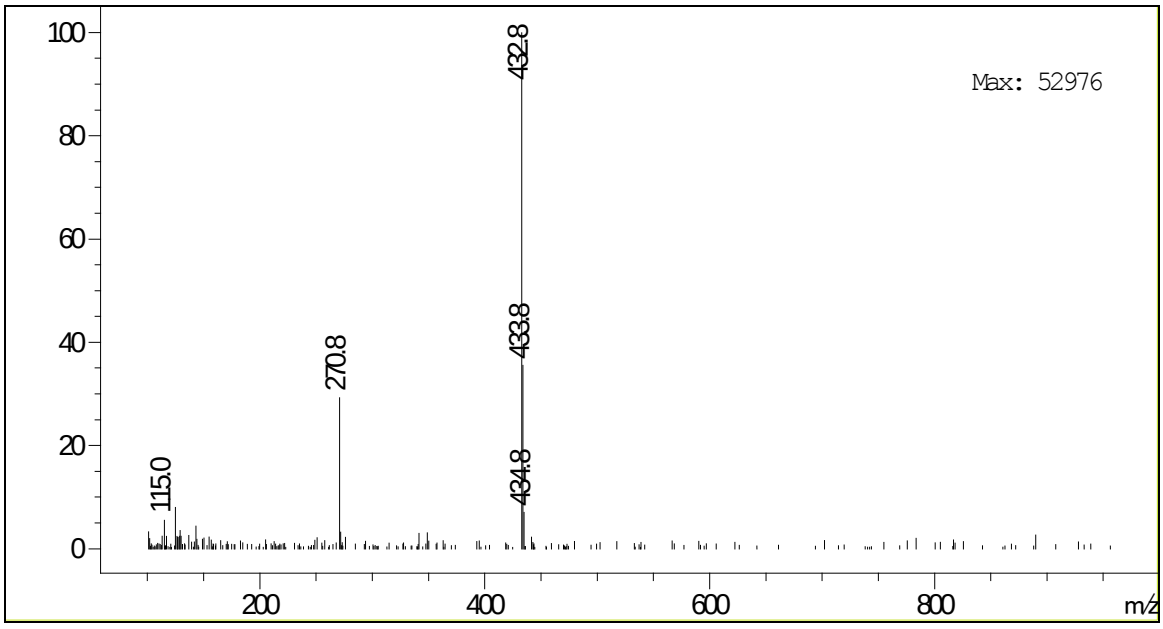
Şekil 5.71. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



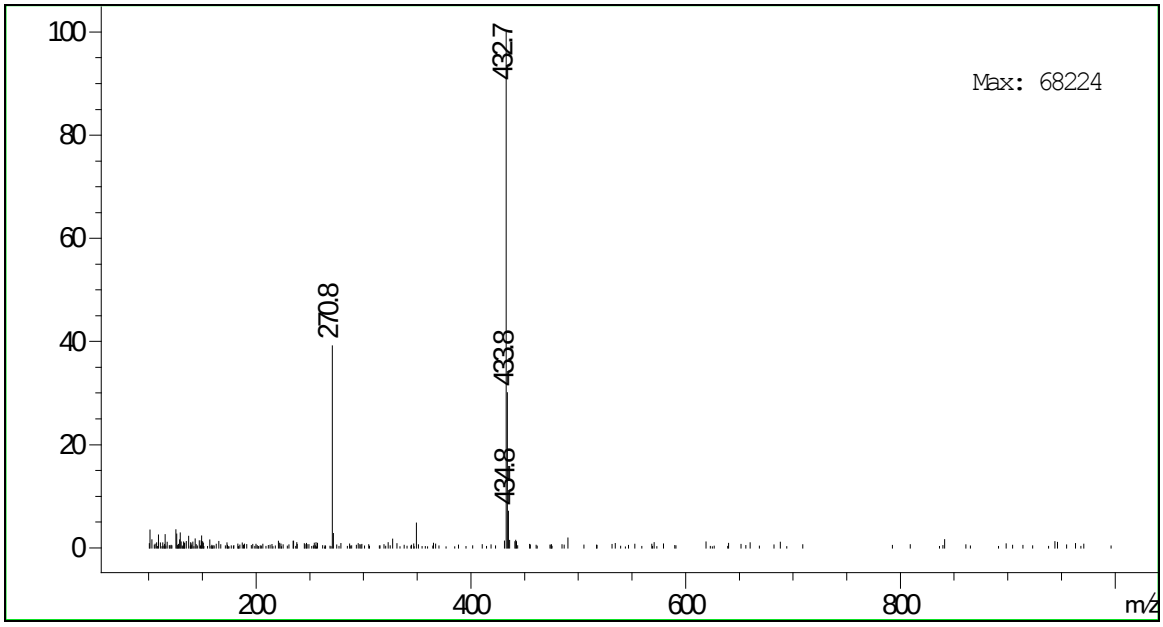
Şekil 5.72. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



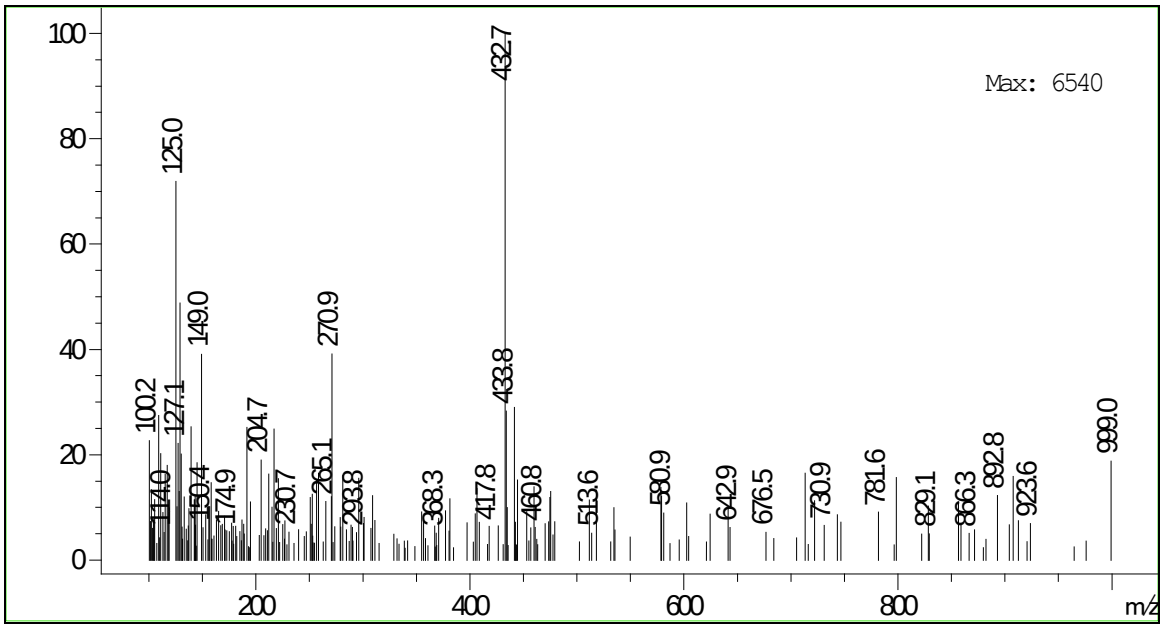
Şekil 5.73. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



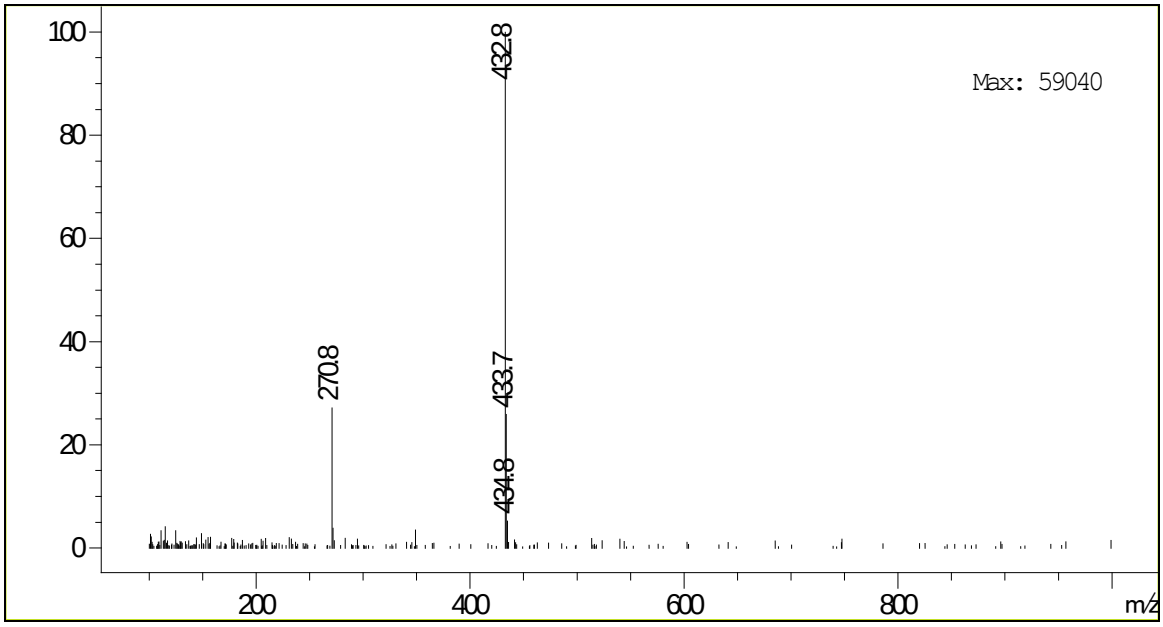
Şekil 5.74. Kızılcık meyvesi için elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine ait kütle spektrumu



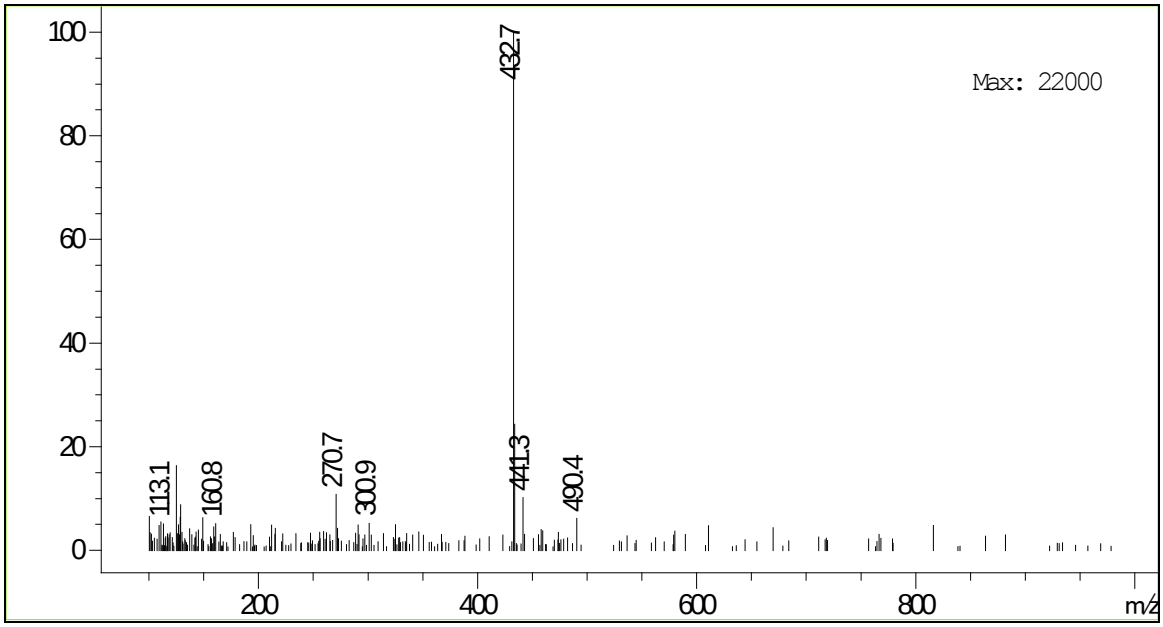
Şekil 5.75. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



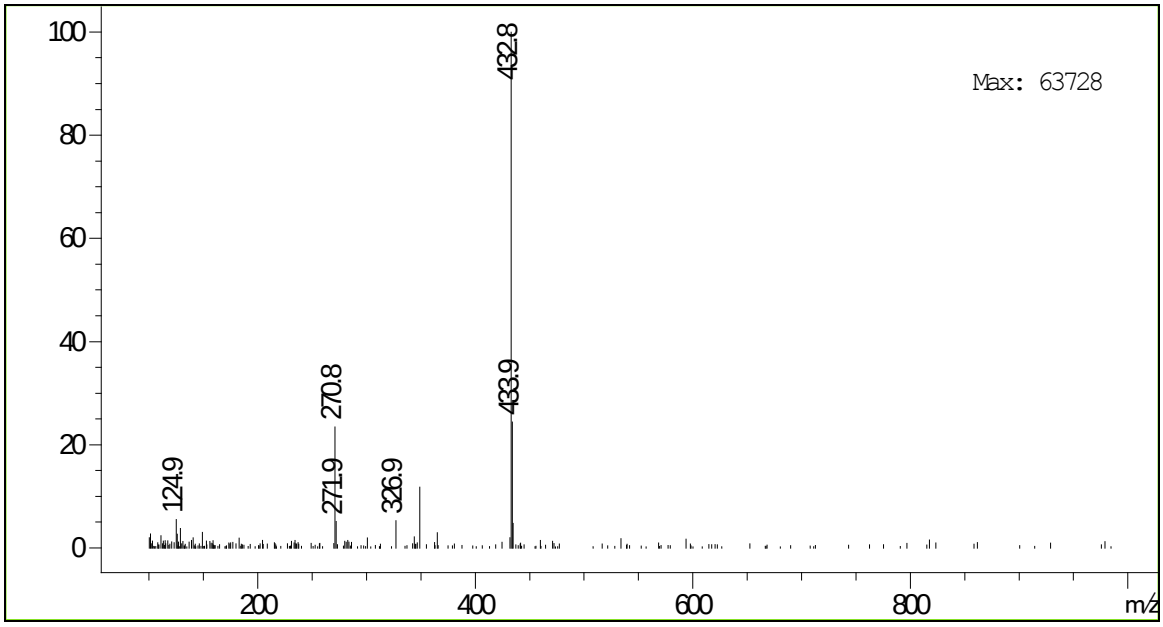
Şekil 5.76. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



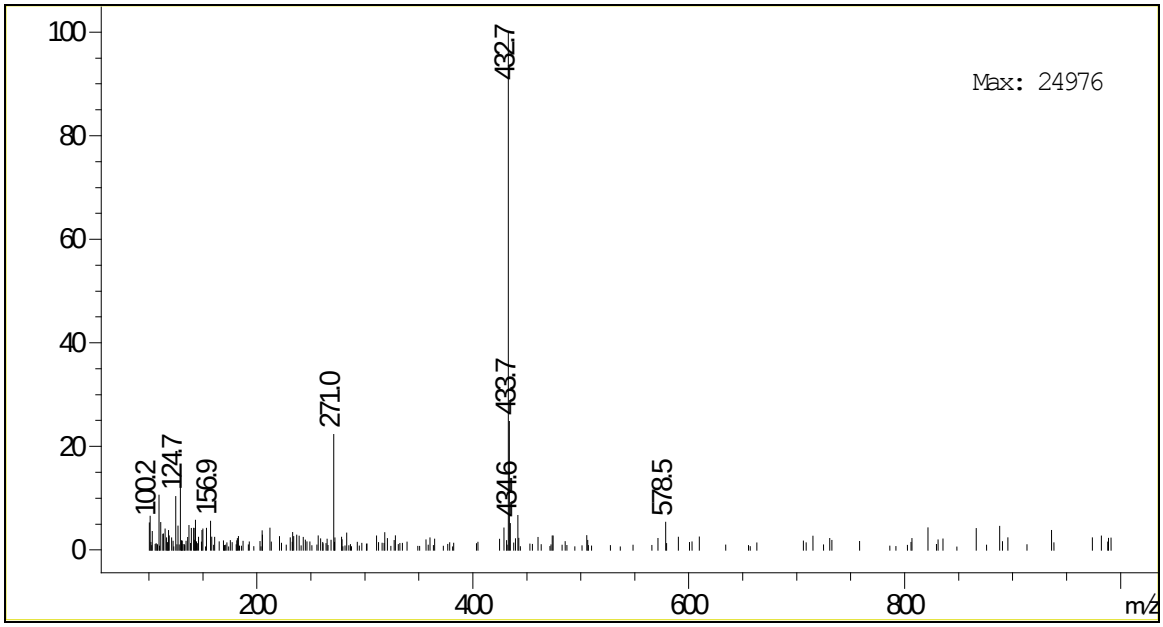
Şekil 5.77. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



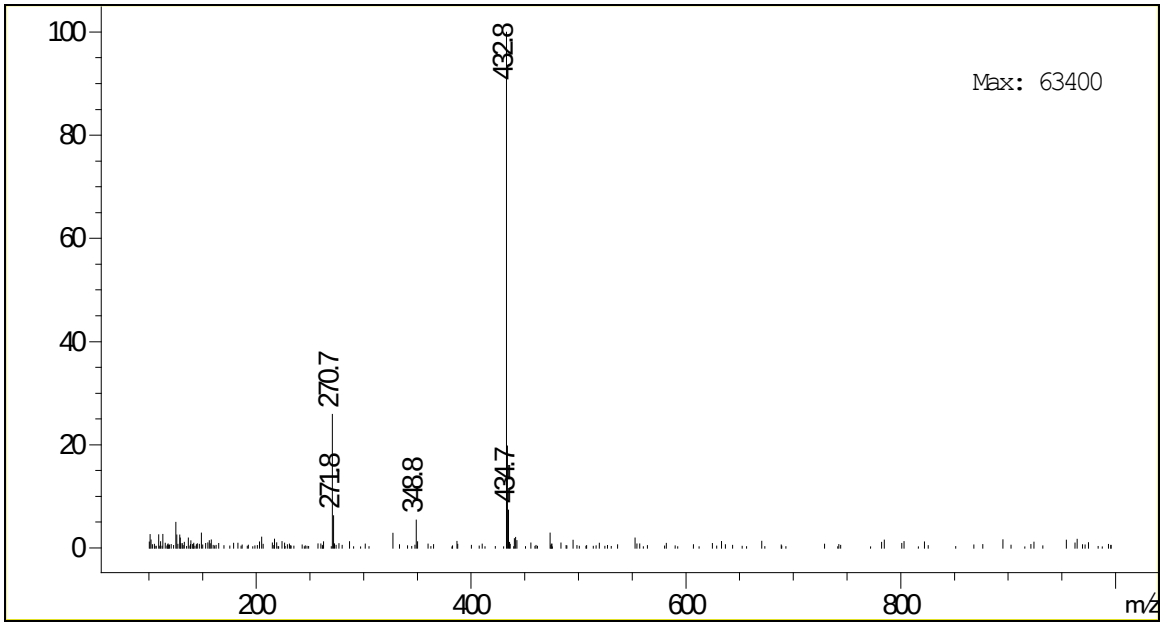
Şekil 5.78. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



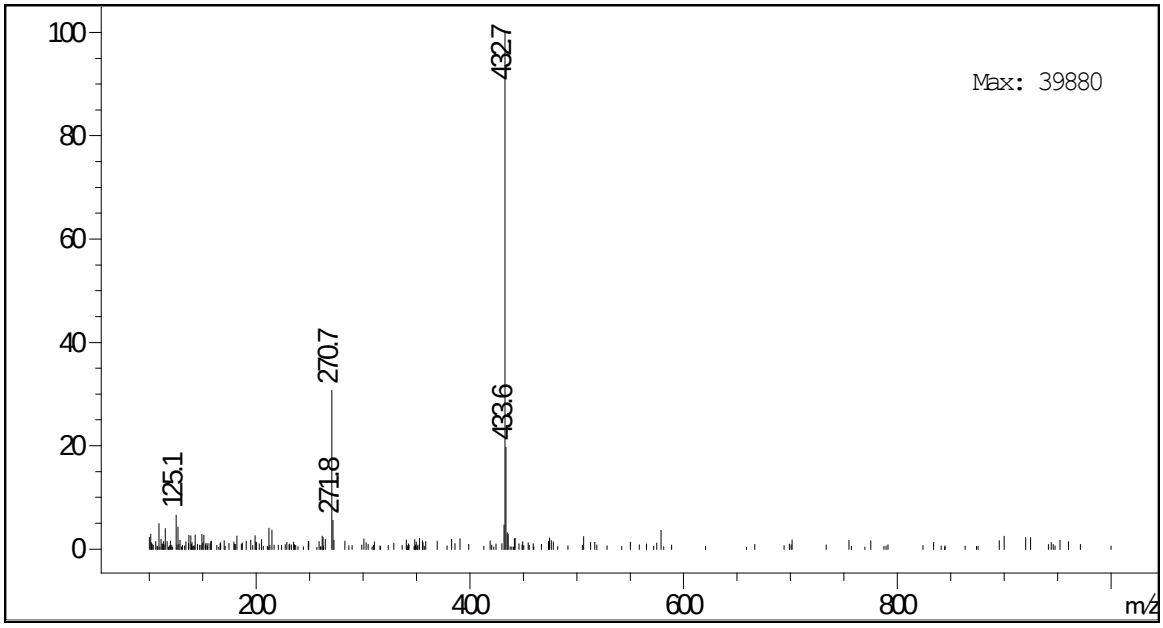
Şekil 5.79. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



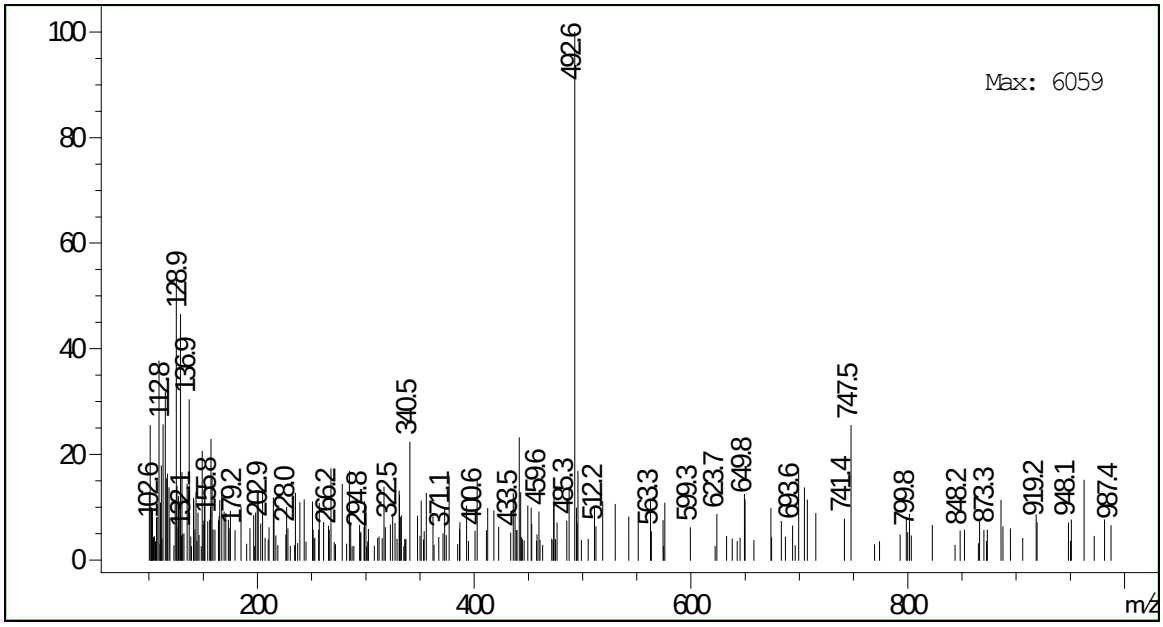
Şekil 5.80. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



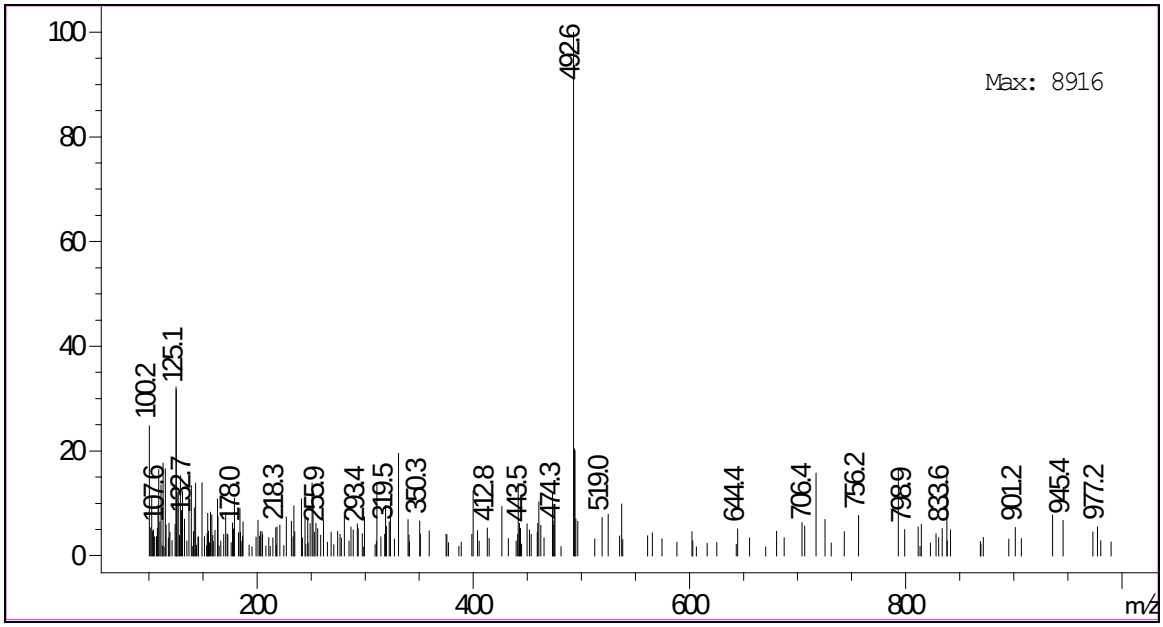
Şekil 5.81. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (1. pik)



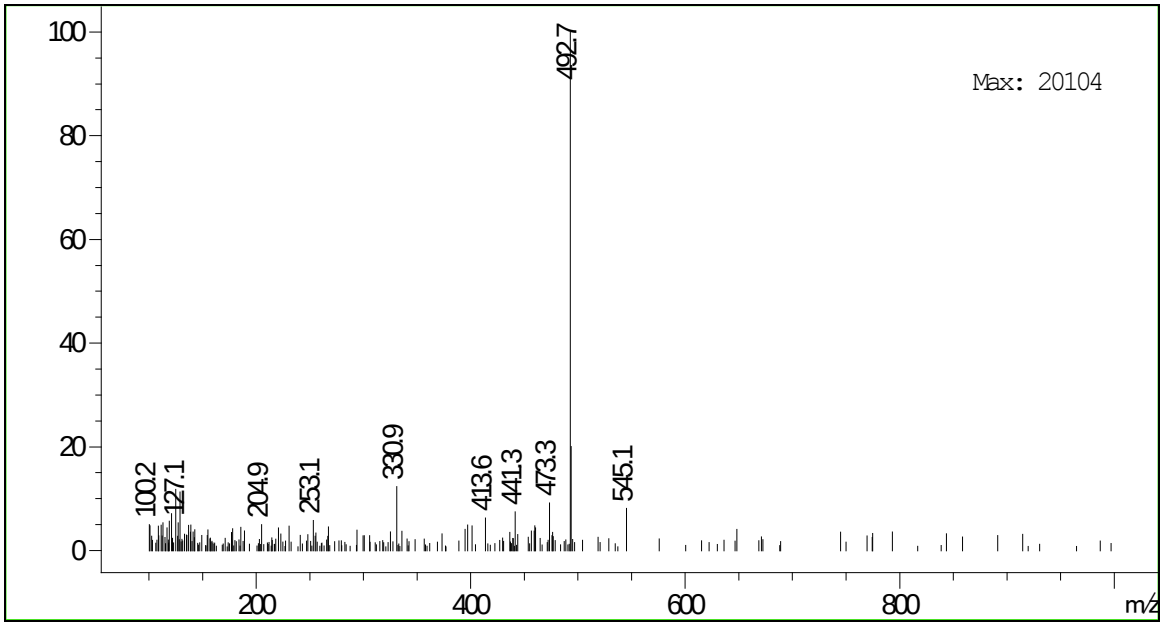
Şekil 5.82. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu (2. pik)



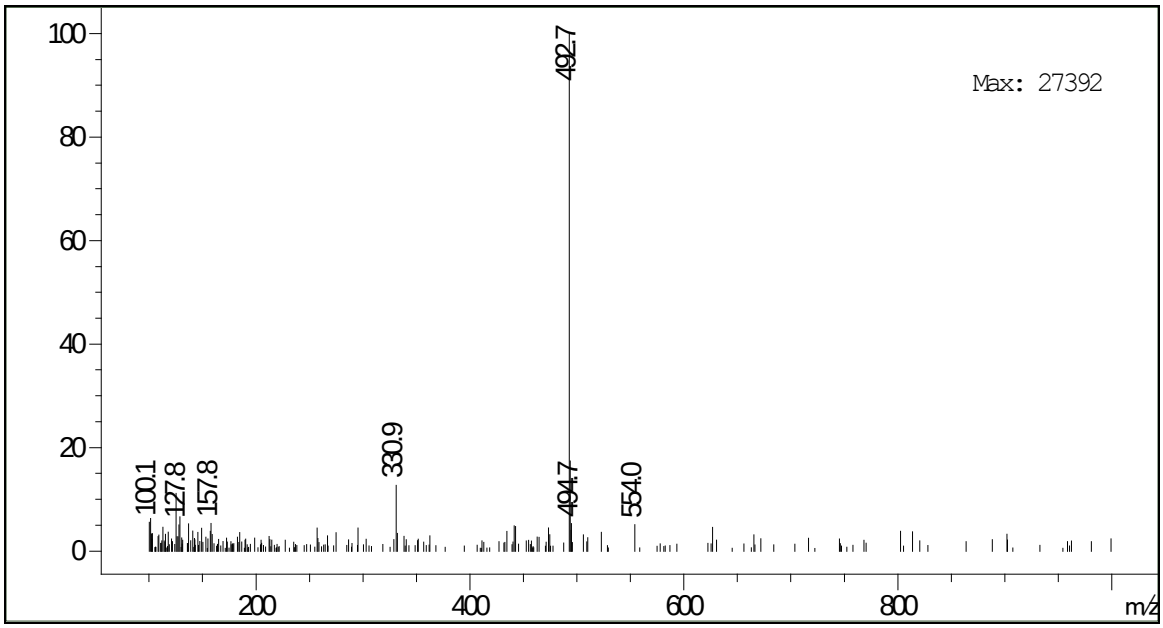
Şekil 5.83. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (1 ppm için) ait kütle spektrumu



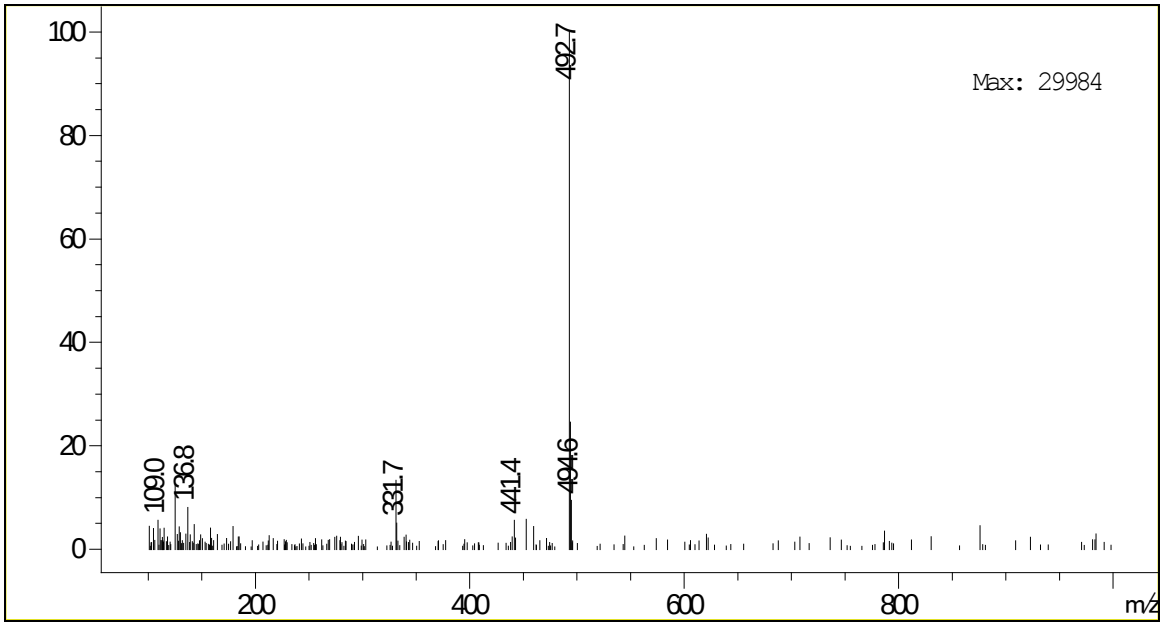
Şekil 5.84. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (2.5 ppm için) ait kütle spektrumu



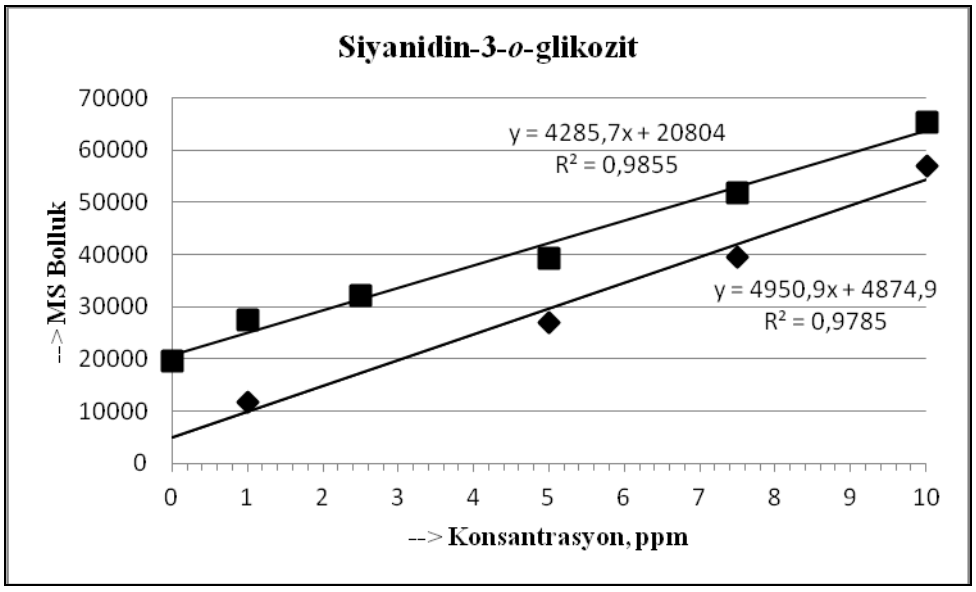
Şekil 5.85. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (5 ppm için) ait kütle spektrumu



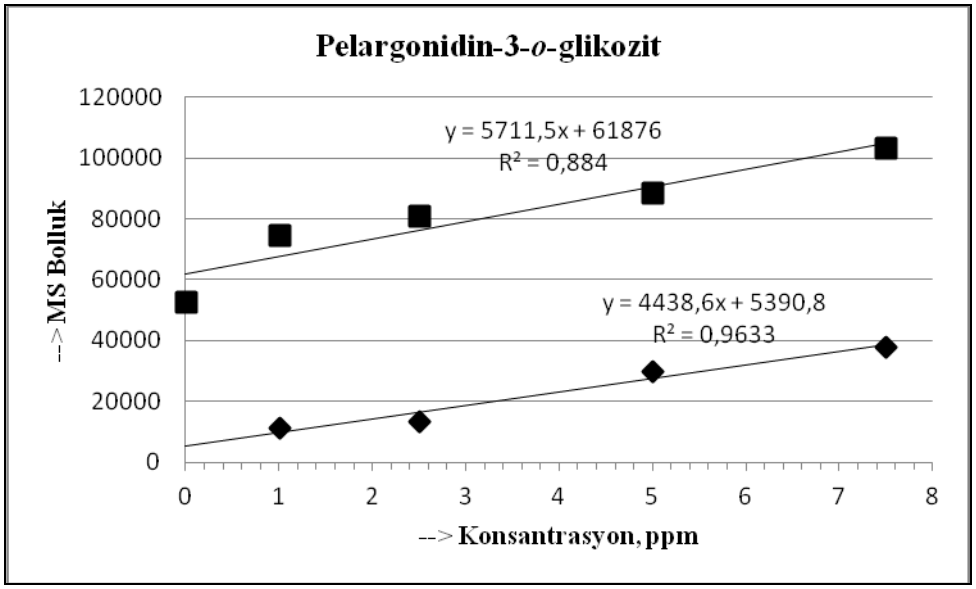
Şekil 5.86. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (7.5 ppm için) ait kütle spektrumu



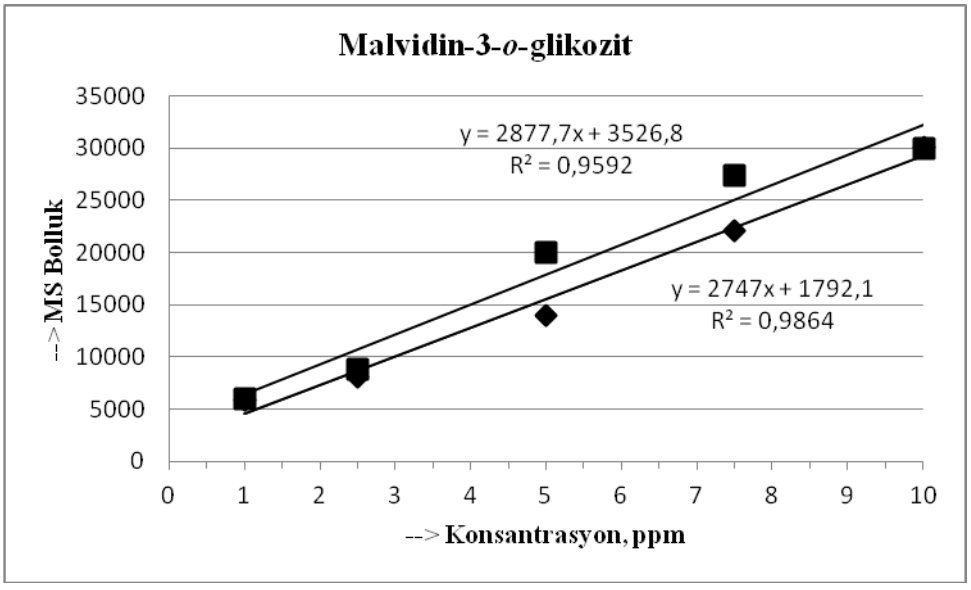
Şekil 5.87. Kızılcık meyvesine standart ekleme metodunun uygulanmasıyla elde edilen malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğine (10 ppm için) ait kütle spektrumu



Şekil 5.88. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 5.89. Kızılcık meyvesinde pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri



Şekil 5.90. Kızılcık meyvesinde malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin tayini için MS bolluğu ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrileri

Bölüm 4 ve 5' te verilen kromatogram ve MS spektrumları her meyve örneğinin belirli ağırlıktaki tipik miktarları içindir. Benzer şekilde, her bir meyve örneği için Elazığ yöresinden mevsiminde 4 farklı marketten temin edilen farklı meyve örneklerinin herbirisi 3 ayrı kısma ayrıldı. Her bir kısım yukarıda uygulanan işlemlerden geçirildi. Böylece bulunan sonuçlar Tablo 5.2' de verildi. Tablo 5.2' de verilen değerler, kromatogramlar için standart ekleme grafiklerinden bulunan konsantrasyonlardır. MS bolluklarından bulunan değerler ise kalibrasyon grafiklerinden elde edilen konsantrasyonlardır. Bu tablodaki her bir değer 3 ayrı sonucun ortalamasıdır.

Tablo 5.2. Çalışılan meyvelerde bulunan antosiyanin bileşiklerinin konsantrasyonları (ppm±s) (n=3)

Meyve Örneği	**Delfinidin-3-*o*-glikozit**		**Siyanidin-3-*o*-glikozit**		**Pelargonidin-3-*o*-glikozit**		**Malvidin-3-*o*-glikozit**	
	HPLC Alan	**MS Bolluk**	**HPLC Alan**	**MS Bolluk**	**HPLC Alan**	**MS Bolluk**	**HPLC Alan**	**MS Bolluk**
Kiraz 1	<t.s	<t.s	3.5±0.4	4.7±0.7	<t.s	<t.s	<t.s	<t.s
Kiraz 2	<t.s	<t.s	6.0±0.8	6.2±0.9	<t.s	<t.s	<t.s	2±0.3
Kiraz 3	<t.s	<t.s	5.2±0.7	7.8±1.0	<t.s	<t.s	<t.s	<t.s
Kiraz 4	<t.s	<t.s	8.3±1.1	9.0±1.3	<t.s	<t.s	<t.s	2.8±0.4
Çilek 1	<t.s	<t.s	3.5±0.4	<t.s	39±6	26±5	<t.s	<t.s
Çilek 2	<t.s	<t.s	5.0±0.7	2.2±0.3	64±9	55±11	<t.s	<t.s
Çilek 3	<t.s	<t.s	3.4±0.4	1.9±0.2	52±8	37±5	<t.s	<t.s
Çilek 4	<t.s	<t.s	4.8±0.6	<t.s	45±7	42±6	<t.s	<t.s
Kızılcık 1	<t.s	<t.s	9.8±1.4	8.3±1.2	233±35	205±29	<t.s	<t.s
Kızılcık 2	<t.s	<t.s	18±3	14.5±2.0	136±19	97±14	<t.s	<t.s
Kızılcık 3	<t.s	<t.s	14±1.5	12±1.3	208±33	173±24	<t.s	<t.s
Kızılcık 4	<t.s	<t.s	11±1.4	16±2.1	164±25	132±18	<t.s	<t.s

Tablo 3.5' teki literatür sonuçlarından, kiraz meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit için bulunan değerler 37.8 ppm, yine kirazda delfinidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit için rapor edilen konsantrasyonlar sırasıyla; 6.4, 6.7 ve 55.1 ppm şeklindedir. Çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit için 11.5-303 ppm aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit için 4-682 ppm aralığındadır. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit 128 ppm' dir. Bu çalışmada bulunan bu bileşiklere ait konsantrasyonların bu aralıkta olduğu görülmektedir. Çok farklı olan bazı veriler gerek sonuçların kuru örnek temeline göre verilmesi gerekse farklı ekstraksiyon şartlarında çalışılmasına bağlıdır.

Tablo 5.3’ de çalışılan meyvelerde bulunan toplam antosiyanin konsantrasyonları görülmektedir. Tablo 3.5 ve Bölüm 3.5’ teki literatür verileri birbirlerinden çok farklı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada gözlenen değerlerin literatürdeki aralıklarda olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 5.3. Çalışılan meyvelerde bulunan toplam antosiyanin konsantrasyonları (ppm±s) (n=3)

Meyve Örneği	**Toplam Antosiyanin**
Kiraz 1	132±20
Kiraz 2	200±28
Kiraz 3	119±16
Kiraz 4	140±19
Çilek 1	125±21
Çilek 2	128±20
Çilek 3	163±25
Çilek 4	140±20
Kızılcık 1	233±30
Kızılcık 2	120±19
Kızılcık 3	168±20
Kızılcık 4	158±22

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Günümüzde, artarak devam eden kalp ve kanser hastalıkları riskini azaltmada potansiyel rol oynayan antioksidan ve antikanser özellikli maddelerin başında polifenoller gelmektedir. Bu tür bileşiklerin bazılarının çok değişik konsantrasyonlarda meyve ve sebzelerde bulunduğu belirtilmektedir [59-90]. Diğer taraftan, alternatif tıp olarak ta adlandırılan, doğal ürünlerdeki antioksidanların, kanser ve benzeri hastalıkların sentetik ilaçlarından daha etkili ve yararlı olduğu da kabul edilmektedir. Çünkü sentetik ilaçlar hastalıklı hücreye spesifik olarak etki etmeyip sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Doğal ürünler ise düşük hücre hasarıyla bütün hücreler için koruyucu ve tedavi edici rol sunmaktadır.

Bu çalışmada; kiraz (*Prunus avium* L.), çilek (*Fragaria vesca* L.)ve kızılcık (*Cornus mas* L.) meyvelerinde antioksidan özelliği yüksek olan antosiyanin bileşiklerinden delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit türlerinin tayini ve karakterizasyonu HPLC-MS yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, ölçüm basamağının gradient çalışmalarında Mobil Faz 1: % 10' luk formik asit, Mobil Faz 2: % 100' lük metanol çözücüleri kullanıldı. Dört antosiyanin bileşiği için elde edilen optimum şartlar; akış hızı 0.5 mL/dk, fragmentasyon voltajı 110 V, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 30 ºC olarak bulundu. Dört antosiyanin bileşiğinin optimum şartlarının aynı olmasından yararlanarak aynı anda dört bileşiğin nicel analizi yapıldı.

Farklı derişimlerde hazırlanan analit çözeltileri kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiklerinden tayin sınırı (LOQ) delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için 0.5 ppm, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşikleri için ise 0.1 ppm olarak bulundu.

Örneklerin ekstraksiyon basamağında, her bir meyve için çözücü taraması, ekstraksiyon süresi ve çözücü/katı oranı gibi parametreler optimize edildi. Çalışılan antosiyanin bileşiklerinin polar özelliklerinin baskın olması nedeniyle 5 polar çözücü denendi. Ekstraksiyon esnasında ve ölçümün sonuna kadar oksidasyonu önlemek için çözücülere seyreltik HCl eklendi. Kiraz ve kızılcık meyveleri için elde edilen ekstraksiyon şartları; çözücü olarak asitlendirilmiş asetonitril, ekstraksiyon süresi 30 dk, çözücü/katı

oranı 2/1 (v/w) olarak belirlendi. Çilek meyvesi için elde edilen ekstraksiyon şartları; çözücü olarak asitlendirilmiş metanol, ekstraksiyon süresi 30 dk, çözücü/katı oranı 5/1 (v/w) olarak bulundu. Böylece elde edilen ekstraksiyon çözeltileri HPLC- MS ile optimize edilen şartlar kullanılarak analiz edildi. Ayrıca meyve örnekleri için belirlenen ekstraksiyon şartları kullanılarak standart ekleme metodu uygulandı.

Optimum şartlar kullanılarak her üç meyve için elde edilen tipik bir SIM (seçilmiş iyon taraması) ve SCAN (tam iyon taraması) kromatogramları Şekil 5.1-5.3' de verilmiştir. SIM taramada meyvelerde çalışılan dört bileşiğin tayini yapılırken, SCAN taramada 100-1000 m/z aralığındaki bileşikler tarandı. Şekil 5.1' de SIM, SCAN kromatogramları ve MS spektrumları incelendiğinde kirazda siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği, Şekil 5.2-5.3' de SIM, SCAN kromatogramları ve MS spektrumları incelendiğinde çilek ve kızılcıkta siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşikleri tespit edildi. Üç meyveye ait SIM ve SCAN kromatogramlarında bulunan diğer piklerin ise çalışılan bileşikler dışındaki fenolik bileşikler olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Kiraz meyvesinde aynı anda dört bileşiğin birlikte tayini için, delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin 1-10 ppm aralığındaki standart çözeltiler kullanıldı. Optimum ekstraksiyon şartları kullanılarak elde edilen ekstraktlara standart ekleme metodu uygulandı. Şekil 5.4-5.9' da kromatogram alanlarının kullanılmasıyla bulunan standart ekleme eğrilerine ilişkin grafikler Şekil 5.10' da verildi. Yine bu kromatogramlara ilişkin MS spektrumlarının (Şekil 5.11-5.33) bolluk değerlerinin kullanılmasıyla elde edilen standart ekleme eğrilerine ilişkin grafikler Şekil 5.34-5.35' te verildi. Görüldüğü gibi, bu şekillerdeki (Şekil 5.10, 5.34 ve 5.35) kromatogram alanları ile elde edilenler için paralel olmadığı, MS spektrumlarıyla elde edilenler için bir paralellik vardır. Böylece, kromatogram alanlarının kullanılmasıyla nicel analizde kimyasal girişim olduğu, MS spektrumlarının bolluklarının kullanılmasıyla nicel analizde kimyasal girişim olmadığı sonucuna varıldı.

Çilek meyvesinde aynı anda dört bileşiğin birlikte tayini için, delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin 1-10 ppm aralığındaki standart çözeltiler kullanıldı. Optimum ekstraksiyon şartları kullanılarak elde edilen ekstraktlara standart ekleme metodu uygulandı. Şekil 5.4-5.5' te standartlara ve Şekil 5.36-5.39' da standart ekleme uygulanmış çilek ekstraktına

ilişkin kromatogramlar verildi. Şekil 5.39-5.40' da kromatogram alanları dikkate alınarak standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerine ilişkin grafikler görülmektedir. Ayrıca Şekil 5.11-5.23' de standartlara ve Şekil 5.42-5.55' te standart ekleme uygulanmış çilek ekstraktlarına ilişkin MS spektrumları verildi. Şekil 5.56-5.58' de MS bolluğu değerleri dikkate alınarak standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerine ilişkin grafikler görülmektedir. Bu şekillerdeki bulgular değerlendirildiğinde, kromatogram alanları ile elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin çilek meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit için paralel olduğu gözlendi. Ancak, çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayinine ilişkin kromatogramlardan elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin paralel olmadığı gözlendi. Çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayinine ilişkin MS spektrumlarından elde edilen standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerinin birbirlerine paralel olduğu gözlendi. Bu verilerden, kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının kimyasal girişim nedeniyle uygun olmadığı sonucuna varıldı. Böylece çilekte pelargonidin-3-*o*-glikozit tayini için MS spektrumlarından elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılması daha güvenilir olacağı anlaşılmaktadır.

Kızılcık meyvesinde aynı anda dört bileşiğin birlikte tayini için, delfinidin-3-*o*-glikozit, siyanidin-3-*o*-glikozit, pelargonidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit bileşiklerinin 1-10 ppm aralığındaki standart çözeltiler kullanıldı. Optimum ekstraksiyon şartları kullanılarak elde edilen ekstraktlara standart ekleme metodu uygulandı. Şekil 5.4-5.5' te standartlara ve Şekil 5.59-5.62' de standart ekleme uygulanmış kızılcık ekstraktına ilişkin kromatogramlar verildi. Şekil 5.63-5.64' de kromatogram alanları dikkate alınarak standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerine ilişkin grafikler görülmektedir. Ayrıca Şekil 5.11-5.23' de standartlara ve Şekil 5.65-5.87' de standart ekleme uygulanmış kızılcık ekstraktlarına ilişkin MS spektrumları verildi. Şekil 5.88-5.90' da MS bolluğu değerleri dikkate alınarak standart ekleme ve kalibrasyon eğrilerine ilişkin grafikler görülmektedir. Çilek örneğine benzer sonuçlar kızılcık örneğinde siyanidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-*o*-glikozit tayini için de gözlendi. Bu nedenle, kızılcık örneğinde pelargonidin-3-*o*-glikozit tayini için kromatogramlardan elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının kimyasal girişim nedeniyle uygun olmadığı sonucuna varıldı. Bu amaçla, MS spektrumlarından elde edilen kalibrasyon grafiklerinin kullanılmasının daha güvenilir olacağı görülmektedir.

Standartlar ve meyve örneklerine ait kütle spektrumları değerlendirildiğinde; delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiği için, 464.7 m/z $(M)^+$ piki delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 465.8 m/z $(M+1)^+$ piki delfinidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 302.7 m/z piki delfinidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan delfinidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiği için, 448.7 m/z $(M)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 449.8 m/z $(M+1)^+$ piki, 450.8 m/z $(M+2)^+$ piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomerleri, 286.8 m/z piki siyanidin-3-*o*-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan siyanidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiği ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 432.8 m/z $(M)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 433.8 m/z $(M+1)^+$ piki, 434.8 m/z $(M+2)^+$ piki pelargonidin-3-*o*-glikozit izomerleri, 270.8 m/z piki pelargonidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan pelargonidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Malvidin-3-*o*-glikozit bileşiği ilişkin kütle spektrumları incelendiğinde, 492.6 m/z $(M)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin protonlanmış haline karşılık gelen temel pik, 493.7 m/z $(M+1)^+$ piki malvidin-3-*o*-glikozit bileşiğinin izomeri, 330.9 m/z piki malvidin-3-o-glikozit bileşiğinden glikozit şekerinin kopmuş hali olan malvidin bileşiğine karşılık gelmektedir. Böylece, elde edilen MS spektrumlarının temel piklerinin yorumlanmasıyla meyvelerdeki antosiyanin bileşiklerinin karakterizasyonu yapıldı.

Bütün bu veriler ve elde edilen optimum şartlar kullanılarak bulunan ve Tablo 5.2' de verilen sonuçlar hem kromatogram alanlarından hem de MS spektrum bollukları kullanılarak bulunan konsantrasyon değerleridir. Elde edilen optimum şartlar kullanılarak bulunan sonuçlardan, kirazda siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu 3.5-9.0 ppm (mg/kg) aralığında, malvidin-3-*o*-glikozit <t.s.-2.8 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve pelargonidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Çilekte siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu <t.s-5.0 ppm (mg/kg) aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit 26-64 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Kızılcıkta siyanidin-3-*o*-glikozit konsantrasyonu 8.3-18 ppm (mg/kg) aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit 97-233 ppm (mg/kg) aralığında, delfinidin-3-*o*-glikozit ve malvidin-3-*o*-glikozit <t.s. altında bulundu. Tablo 3.5 ve Bölüm 3.5' teki literatürde verilen sonuçlar değerlendirildiğinde çalışılan meyve örnekleri için yine çalışılan bileşiklere ilişkin veri çok olmadığı anlaşılmaktadır. Kiraz için 6.42 ppm delfinidin-3-*o*-glikozit, 37.77 ppm

siyanidin-3-*o*-glikozit, 6.7 ppm pelargonidin-3-*o*-glikozit ve 55.07 ppm malvidin-3-*o*-glikozit rapor edilmiştir [80]. Çilek için ise, siyanidin-3-*o*-glikozit için 11.5-303 ppm aralığında, pelargonidin-3-*o*-glikozit için 4-682 ppm aralığı bulunmuştur [62, 83]. Kızılcık meyvesinde siyanidin-3-*o*-glikozit ise 45 ppm olarak rapor edilmiştir [82]. Görüldüğü gibi bu aralıklar çok büyüktür. Bu çalışmada gözlenen yukarıdaki değerlerin literatürde rapor edilen aralıklarda olduğu anlaşılmaktadır.

7. ÖNERİLER

Literatürde yaygın olarak çalışılan toplam antioksidan içeriği, toplam flavonoid veya toplam antosiyanin tayininden ziyade moleküler düzeyde bileşiklerin tayinlerinin yapılması, bu bileşiklerin spesifik etkilerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır. Bu amaçla kütle spektrometrinin dedektör olarak kullanıldığı sıvı kromatografisi metodunun kullanılması gerekmektedir. Yine bu çalışmalarda, matrikse bağlı olarak kimyasal girişimlerin analiz sonuçlarını önemli oranda olumsuz etkilediği anlaşıldığından standart ekleme metodunun uygulanmasıyla bulunan sonuçlara güvenilmesi gerektiği önerilmektedir. Kızılcıkta pelargonidin-3-*o*-glikozit bağıl olarak önemli oranda büyük konsantrasyonda bulunduğundan bu meyvenin antikanserojen çalışmalarında daha fazla kullanılmasının yararlı olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Robards, K. and Antolovich, M., 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids Review, *Analyst*, **122**, *(11R–34R.)*

[2] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 727-747.

[3] Shahidi, F. and Naczk, M., 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, *Technomic Publishing Company. Lancaster*, PA: Technomic Publishing Co Inc.

[4] Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, **56**, 317-333.

[5] Klick, S. and Herrmann, K., 1988. Glucosides and Glucose Esters of Hydroxybenzoic Acids in Plants, *Phytochemistry*, **27**, 2177-2180.

[6] Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2000. Advances in Flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, **55**, 481-504.

[7] Saldamlı, İ., 2007. Gıda Kimyası, *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 463-492.

[8] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, **99**, 191–203.

[9] Crozier, A., Clifford, M.N. and Ashihara, H.. 2006. Plant Secondary Metabolites: Occurence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Pub. Xii, p. 372.

[10]Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T. and Tomas-BArberan, F.A., 2007. Nutraceuticals: Facts and Fiction, *Phytochemistry*, **68**, 2986-3008.

[11] Scalbert, A., Manach, C., Remesy, C. and Jimenez, L., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45(4)**, 287-306.

[12] Arts, I.C.W., Van De Putte, B., Hollman, P.C.H., **2000a**. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in the Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1746-1751.

[13] Arts, I.C.W., Van De Putte, B., Hollman, P.C.H., **2000a**. Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in the Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1752-1757.

[14] Rommel, A., Wrolstad, R.E. and Heatherbell, D.A., 1992. Blackberry Juice and Wine: Processing and Storage Effects on Anthocyanin Composition, Color and Appearance, *Journal of Food Science*, **57,** 385.

[15] Hong, V. and Wrolstad, R.E., 1986. Cranberry Juice Composition, *Journal of The Association of Official Analytical Chemists*, **69(2)**, 199-207.

[16] Castaneda-Ovando, A., De Lourdes Pacheco-Hernandez, M.A., Elena Paez Hernandez, M.A., Rodriguez, J.A. and Galan-Vidal, C.A., 2009. Chemical Studies of Anthocyanins: A review, *Food Chemistry*, **113**, 859-871.

[17] Wrolstad, R.E., Durst, R.W. and Lee, J., 2005. Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products, *Trends in Food Science and Technology*, **16(9)**, 423-428.

[18] Fennema, O.R., 1985. Pigment and Other Colorants, *Food Chemistry*, 545-584.

[19] Kurilich, A.C., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Simon, P.W. and Novotny, J.A., 2005. Plasma and Urine Responses Are Lower for Acylated vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6537-6542.

[20] Mazza, G. and Miniati, E., 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains, CRC Pres, London, UK.

[21] Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M. and Saito, K., 2003. Recent Advances in The Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins, *Natural Products Reports*, **20**, 288-303.

[22] Williams, C.A. ve Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and Other Flavonoids, *Natural Products Reports*, **21**, 539-573.

[23] Rein, M. 2005. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins, Helsinki: University of Helsinki, 10–14.

[24] Ito, F., Tanaka N., Katsuki A., and Fujı T., 2002. Why Do Flavylium Salts Show So Various Colors in Solution?: Effect of Concentration and Water on the Flavylium's Color Changes, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **150(1–3)**, 153–157.

[25] Da Costa, C.T., Nelson, B.C., Margolis, S.A. and Horton, D., 1998. Separation of Blackcurrant Anthocyanins by Capillary Zone Electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, **799(1–2)**, 321–327.

[26] Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G. and Kulling, S.E., 2006. Stability and Biotransformation of Various Dietary Anthocyanins in Vitro, *European Journal of Nutrition*, **45(1)**, 7–18.

[27] Cooper-Driver, G.A., 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and Co-Workers to the Study of Anthocyanins, *Phytochemistry*, **56(3)**, 229-236.

[28] Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F. and Brouillard, R., 2003. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins, *Phytochemistry*, **64(5)**, 923–933.

[29] Clifford, M.N. and Scalbert A., 2000. Ellagitannins-Occurrence in Food, Bioavailability and Cancer Prevention, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80,**1118-1125.

[30] Dey, P.M. and Harborne, J.B., 1993. 1. Plant Phenolics Methods in Plant Biochemistry (2nd printing). London, Academic Press Limited. pp. 326-341.

[31] Boyles, M.J. and Wrolstad, R.E., 1993. Anthocyanin Composition of Red Raspberry Juice: Influences of Cultivar, Processing, and Environmental Factors, Journal *of Food Science*, **58**, 1135-1141.

[32] Withy, L.M., Nguyen, T.T., Wrolstad, R.E. and Heatherbell, D.A., 1993. Storage Changes in Anthocyanin Content of Red Raspberry Juice Concentrate, *Journal of Food Science*, **58**, 190-192.

[33] Jongen, W., 2002. Fruit and vegetable processing Improving quality, 25-39-40.

[34] Nizamlıoğlu, N.M. and Nas, S., 2010, Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri**,** *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi***, 5(1)**, 20,35.

[35] Klimenko, S., 2004. The Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.): Collection, Preservation, and Utilization of Genetic Resources, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, **12**, 93-98.

[36] Nakajima, J.I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M. and Saito, K., 2004. LC/PDA/ESIMS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **5**, 241-247.

[37] Wang, H., Cao, G. and Prior, R.L. 1997. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 304-309.

[38] Lee, H.S. and Widmer, B.W., 1996. Phenolic Compounds. In: Nollet LML, ed. Handbook of Food Analysis, Physical Characterization and Nutriet Analysis, New York, USA: Marcel Dekker, Inc., **1**, 821–894.

[39] Waterman, P.G. and Mole, S., 1994. In: Lawton Jh, Likens Ge, eds. Analysis of Phenolic Plant Metabolites, The Methods in Ecology Series. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.

[40] Sarıburun, E., 2009. Bursa'da Yetiştirilen Bazı Ahududu (*Rubus idaeus* L.*)* ve Böğürtlen (R*ubus f*ruticosus L.) Çesitlerinin Fenolik Bileşiklerinin Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (LC-MS) ile İncelenmesi ve Antioksidan

Aktivite Tayinleri, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

[41] Shahidi, F. and Naczk, M., 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Pres, Boca Raton, FL.

[42] Robbins, R.J. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overiew of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 2866-2887.

[43] Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. And Ryan, D. 2000. Sample Preparation in the Determination of Phenolic Compounds in Fruits, *Analyst*, **125**, 989-1009.

[44] Price, M.L. and Butler, L.G., 1977. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**,1268-1273.

[45] Cork, S.J. and Krockenberger, A.K., 1991. Methods and Pitfalls of Extracting Condensed Tannins and Other Phenolics from Plants-Insights from Investigations on Eucalyptus Leaves, *Journal of Chemical Ecology*, **17**, 123-134.

[46] Maxson, E.D. and Rooney, L.W., 1972. Evaluation of Methods for Tannin Analysis in Sorghum Grain, *Cereal Chemistry*, **49**, 719-728.

[47] Khanna, S.K., Viswanatham, P.N., Krishnan, P.S., and Sanwai, G.G., 1968. Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry*, **7**, 1513-1517.

[48] Hertog, M.G.L., 1994. Flavonols and Flavones in Foods and Their Relation with Cancer and Coronary Heart Disease. Thesis, Agricultural University Wageningen, State Institute for Quality Control of Agricultural Products, The Netherlands, and National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, The Netherlands. Wageningen, The Netherlands.

[49] Macheix, J.J., Fleuriet, A. and Billot, J., 1990. Fruit Phenolics, Boca Raton, USA: CRC Pres.

[50] Ewald, C., Fjelkner-Modig S., Johansson K., Sjoholm I., Akesson B., 1999. Effect of Processing on Major Flavonoids in Processed Onions, Green Beans, and Peas, *Food Chemistry*, **64**, 231–235.

[51] Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T., 1998. Quantitative Analysis of Flavonols, Flavones, and Flavanones in Fruits, Vegetables and Beverages by High- Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array and Mass Spectrometric Detection, *Journal of Chromatography A*, **799**, 101–110.

[52] Kahkonen, M.P., Hopia, A.I. and Heinonen, M., 2001. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4076-4082.

[53] Amr, A. and Al-Tamimi, E., 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.

[54] Careri, M., Mangia, M. and Musci, M., 1998. Overview of the Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Interfacing Systems in Food Analysis: Naturally occurring substances in food, *Journal of Chromatography A,* **794**, 263-297.

[55] Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E., 2001. Unit F1.2: Characterization and Measurement with UV- Visible Spectroscopy, In Current Protocols in Food Analytical Chemistry; Wrolstad, R. E., Ed.; JohnWiley & Sons: New York, p F1.2.1-F1.2.13.

[56] Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997, Enstrümental Analiz Yöntemleri, *Hacettepe Yayınları*, 417-422.

[57] Özcimder, M. ve arkadaşları, 2004. Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale.

[58] Skoog, D.A., Holler, F.I. and Nieman, T.A., 1998. Enstrümental Analiz İlkeleri, I. Baskı, 498-531, 725-739.

[59] Chandra, A., Rana, J. and Li, Y.Q, 2001. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49(8)**, 3515-3521.

[60] De Brito, E.S., De Araujo, M.C.P., Alves, R.E., Carkeet, C., Clevidence, B.A. and Novotny, J.A., 2007. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolao, Jussara, and Guajiru, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55(23)**, 9389-9394.

[61] Kulisic-Bilusi, T., Schnabele, K., Schmoller, I., Dragovic-Uzelac, V., Krisko, A., Dejanovic, B., Milos, M. and Pifat, G., 2009. Antioxidant activity versus cytotoxic and nuclear factor kappa B regulatory activities on HT-29 cells by natural fruit juices, *European Food Research and Technology,* **228**, 417–424.

[62] Oszmianski, J., Wojdy1o, A. and Kolniak, J., 2009. Effect of L-ascorbic acid, sugar, pectin and freeze–thaw treatment on polyphenol content of frozen strawberries, *LWT - Food Science and Technology*, **42**, 581–586.

[63] Kalt, W., MacKinnon, S., McDonald, J. and Vinqvist, M., 2008. Chery Craft and Amy Howell, Phenolics of Vaccinium berries and other fruit crops, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88**, 68–76.

[64] Ek, S., Kartimo, H., Mattila, S. and Tolonen, A., 2006. Characterization of Phenolic Compounds from Lingonberry (*Vaccinium-vitis-idaea*), *Journal of Agricultural and* Food Chemistry, **54**, 9834-9842.

[65] Elisia, I., Hu, C., David, G,. Popovich, D. and Kitts, D., 2007. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract, *Food Chemistry*, **101**, 1052–1058.

[66] Seeram N.P, Lee, R., Scheuller, H.S. and Heber, D., 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy, *Food Chemistry,* **97**, 1–11.

[67] Sariburun, E., Sahin, S., Demir, C., Turkben, C. and Uylaser V., 2010. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Raspberry and Blackberry Cultivars**,** *Journal of Food Science*, **75**, Nr. 4.

[68] Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J.-L. and Remesy, C., 2005. Blackberry Anthocyanins Are Mainly Recovered from Urine as Methylated and Glucuronidated Conjugates in Humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 7721-7727.

[69] Wu, X. and Prior, R.L., 2005. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **53**, 2589-2599.

[70] Watson, D.J., Bushway, A.A. and Bushway, R.J., 2004. Separation of Peonidin and Cyanidin, Two Anthocyanidins, in Cranberries by Capillary Electrophoresis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **27 (1)**, 113-121.

[71] Noda, Y., Takao, K., Akitane, M. and Packer, L., 2002. Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 166-171.

[72] Nyman, A.N. and Kumpulainen, J.T., 2001. Determination of Anthocyanidins in Berries and Red Wine by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 4183-4187.

[73] Rababah, T.M., Banat, F., Rababah, A., Ereifej, K. and Yang, W., 2010. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant Activities, and Anthocyanin of Oregano, Thyme, Terebinth, and Pomegranate, *Journal of Food Science*, **75**, Nr. 7.

[74] Yangzhao S., Liao, X., Wang, Z., Hu, X., and Chen, F., 2007. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *European Food Research and Technology*¸ **225**, 511–523.

[75] Srivastava, J. and Vankar, P.S., 2010. Canna indica flower: New source of anthocyanins, *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**, 1015-1019.

[76] Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M.M. and Toth-Markus, M., 2005. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables, *Food Research International*, **38**, 1023–1029.

[77] Jing, P. and Giusti, M.M., 2007. Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract**,** *Journal of Food Science,* **72**, C363-C368.

[78] Dai, J., Gupte, A., Gates, L. and Mumper, J., 2009. A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms, *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 837–847.

[79] Yang, Z., Chen, Z.,1 Yuan, S., Zhai, W., Piao, X. and Piao, X., 2009. Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays L.*), *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 2485–2492.

[80] Can, N.O., Arli, G., Atkosar, Z., 2012. Rapid determination of free anthocyanins in foodstuffs using high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, **130**, 1082–1089.

[81] Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Determination of Phenolic Composition and Antioxidant Activity in Fruits, Rhizomes and Leaves of the White Strawberry (*Fragaria chiloensis* spp. *Chiloensis* form *chiloensis*) using HPLC-DAD–ESI-MS and Free Radical Quenching Techniques, *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 545–553.

[82] White, B.L, Howard, L.R. and Ronald, P.L., 2010. Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **58**, 4030-4036.

[83] Simirgiotis, M.J., Theoduloz, C., Caligari, P.D.S. and Schmeda-Hirschmann, G., 2009. Comparison of Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Two Native Chilean and One Domestic Strawberry Genotypes, *Food Chemistry,* **113**, 3377–3858.

[84] Chirinos, R., Campos, D., Betalleluz, I., Giusti, M. Monıca, Schwartz, S.J., Tian, Q., Pedreschi, R. and Larondelle, V., 2006. High-Performance Liquid Chromatography with PhotodiodeArray Detection (HPLC-DAD)/HPLC-Mass Spectrometry (MS) Profiling of Anthocyanins from Andean Mashua Tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz and Pavon) and Their Contribution to the Overall Antioxidant Activity, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **54**, 7089-7097.

[85] Ohnishi, R., Ito, H., Kasajima, N., Kaneda, M., Karıyama, R., Kumon, H., Hatano, T. and Yoshida T., 2006. Urinary Excretion of Anthocyanins in Humans after Cranberry Juice Ingestion**,** *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,* **70(7),** 1681-1687.

[86] Doka, O., Ficzek, G., Bicanic, D., Spruijt, R., Luterotti, S., Toth, M., Buijnsters, J.G. and Vegvari, G., 2011. Direct Photothermal Techniques for Rapid Quantification of Total Anthocyanin Content in Sour Cherry Cultivars, *Talanta*, **84**, 341–346.

[87] Dossett, M., Lee, J. and Chad, E.F., 2010. Variation in Anthocyanins and Total Phenolics of Black Raspberry Populations, *Journal of Functional Foods*, **2**, 292-297.

[88] Orak, H.H., 2007. Total Atioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities of Selected Red Grape Cultivars and Their Correlations, *Scientia Horticulturae*, **111**, 235–241.

[89] Klopotek, Y., Otto, K. and Bohm, V., 2005. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity, *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **53**, 5640-5646.

[90] Ozcan, C., Dilgin, Y. And Yaman M., 2012. Determination of Quercetin in Medicinal Plants Such as Rose Hip (*Rosa canina*), Bettle (*Urticadioica*), Terebinth (*Terebinthina chica*) and Purslane (*Portulace oleracea*) using HPLC-MS Method, *Asian Journal of Chemistry*, **24(8)**.

ÖZGEÇMİŞ

31.10.1984 yılında Malatya' da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Malatya' da tamamladı. 2002 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nü kazandı. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' ne yatay geçiş yaptı. 2005 yılında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bursa Test ve Analiz Laboratuarı (BUTAL)' nda stajını tamamladı. İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' nden 2006 yılında başarıyla mezun oldu. 2007 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalında başladığı yüksek lisans eğitimini *"Çok Yıllık Ağaç Yapraklarında Metal Tayinleri İle Kirletici Kaynakların Belirlenmesi"* konulu tez ile tamamladı. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Bilim Dalında doktora eğitimine başladı ve "*Kiraz (Prunus avium), Çilek (Fragaria vesca) ve Kızılcık (Cornus mas* L.*) Meyvelerindeki Antosiyanin Bileşiklerinin HPLC-ESI-MS ile Tayini ve Karakterizasyonu*" konulu doktora tez çalışması ile doktorasını sürdürmektedir.