

Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu, Tanımlanması ve Antioksidant Kapasitesi

Seda ERSUS

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 35100 Bornova-İzmir

Özet

Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik maddelerden flavanoidler grubunda yer alan ve flavilyum veya difenil benzopirilyum tuzlarının glikozitleri olan antosiyaninlerin ekstraksiyon yöntemleri, tanımlanması ve antioksidant kapasiteleri ile ilgili çalışmalar bu çalışma kapsamında derlenmiştir.

Antosiyaninlerin Ekstraksiyonu

Antosiyaninlerin çeşitli bitkisel kaynaklardan ekstraksiyonunda kullanılacak olan yöntemler, çoğunlukla ekstraksiyonun amacına ve antosiyaninlerin yapısına bağlı olarak değişmektedir. Ekstraksiyon işlemleri için antosiyaninlerin yapısını ve stabilitesini etkileyen faktörlerin bilinmesi gerekmektedir. Ekstrakte edilen pigmentler, bekletilmeden analize alınacaksa seçilecek yöntem pigmentleri mümkün olduğunca doğal durumlarına yakın tutacak şekilde seçilmelidir. Ekstrakte edilen pigmentlerin renklendirici veya gıda bileşeni olarak kullanılması durumunda maksimum pigment verimi, boyama kuvveti ve stabilite gibi faktörler de önem kazanmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon ve temizleme işlemlerinin çok kompleks olmaması, zaman alıcı ve pahalı olmaması gerekmektedir (Jackman ve Smith,1992).

Antosiyaninler nötral veya alkali çözeltilerde stabil olmadığından ekstraksiyon işlemlerinde genellikle asidik çözeltilerin kullanılması önerilmektedir.

Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda geleneksel ve en yaygın yöntem bitkisel materyalin az miktarda mineral asit içeren ve düşük kaynama noktasına sahip olan alkol ile ekstraksiyonudur (King, 1980; Timberlake ve Bridle, 1980 ; Jackman ve ark., 1987 ; Jackman ve Smith, 1992). Alkol olarak çoğunlukla metanol kullanılmakla birlikte metanolün toksik etkisinden dolayı, ekstrakte etme gücü metanole göre daha düşük olmasına ve yüksek kaynama noktasından dolayı daha zor konsantre edilmesine rağmen asitlendirilmiş etanol de gıda esaslı preparatların hazırlanmasında tercih edilmektedir.

Hidroklorik asit ile asitlendirme düşük pH'ı korumaya yardımcı olmakla birlikte, bu gibi mineral asitlerin kullanımı, kompleks yapıdaki pigmentlerin doğal formunu değiştirebilmekte ve daha sonraki konsantrasyon aşamasında dayanıklı olmayan açıl ve şeker kalıntılarında kayıplara neden olabilmektedir. Bu nedenle pek çok araştırmacı açillenmiş pigmentlerin bozunmasını en aza indirmek için çok düşük konsantrasyonlarda asit kullanımını önermişler, güçlü asit çözeltilerinin bazı bileşiklere zarar verdiğini bildirmişlerdir (Du ve Francis, 1975 , Moore ve ark., 1982 a, b; Jackman ve ark., 1987). Bu nedenle antosiyaninleri doğal formlarına yakın elde etmek için pek çok araştırmacı tarafından başlangıç pigment ekstraksiyonunda nötral çözümlerin kullanımı (% 60

metanol, aseton/metanol/ su karışımları , n- butanol, soğuk aseton veya kaynamış su) önerilmiştir. Ayrıca zayıf organik asitlerin de (çoğunlukla formik asit, asetik asit, sitrik asit ve tartarik asit) ekstraksiyon çözümlerinde kullanıldığı bildirilmektedir (Jackman ve ark., 1987 ; Jackman ve Smith, 1992).

Rengin bitkisel materyalden yeterli ekstraksiyonu sağlandığında, alkol içeren çözelti düşük sıcaklıklarda konsantre edilmekte ve daha sonra gerekirse konsantratin kolon veya kağıt kromatografisi gibi tekniklerle saflaştırılması yoluna gidilmektedir (Timberlake ve Bridle, 1980).

Antosiyeninlerin çeşitli bitkisel materyallerden ekstraksiyonu üzerine günümüze kadar pek çok çalışma yapılmıştır. Bu konuyla ilgili literatür özetleri aşağıda verilmektedir.

Liao ve Luh (1970), Tinto cao üzümlerinden % 1 hidrokorik asit içeren metanolü ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanarak üzümlere 5 dakikalık parçalama işlemi uygulayarak metanol fazına almışlar, ekstraktı Whatman no 1 tipi süzgeç kağıdı kullanarak süzmüşlerdir. Saflaştırma işlemi için Dowex 50W-X4 katyon değiştirici reçine kullanmışlardır. Bu cins üzümdeki en baskın antosiyenin malvidin 3-monoglikozit ve malvidin 3-monoglikozitin p-kumarik asit ile açılmış formunun olduğunu bildirmişlerdir.

Palmidis ve Markakis (1975), fermente üzüm kabuklarındaki antosiyeninleri sıcak su ve farklı konsantrasyonlarda (500, 1000 ve 2000 ppm) kükürt dioksit (SO₂) çözeltisi ile ekstrakte ederek alkolsüz karbonatlı içeceklerdeki stabilitesini incelemiştir. Sıcak su ve 500 ppm'lik kükürt çözeltisi ile gerçekleştirilen ekstraktla en iyi sonuç elde edilmiştir. Ekstraktlar konsantre edilip kurutulduktan sonra hazırlanan karbonatlı içeceklere katılmış, içecekler farklı sıcaklıklarda ve ışık koşullarında depolanarak belli aralıklarla antosiyenin içerikleri saptanmıştır. Ekstraktların pigment içeriği enosiyenin cinsinden hesaplanmış, sıcak su ile elde edilen ekstrakta 581 mg enosiyenin/100 ml ve 500 ppm SO₂ çözeltisi ile hazırlanan içeceğin ise 640 mg enosiyenin/100 ml içerdiği saptanmıştır. Ayrıca SO₂ ile hazırlanan içeceğin sıcak su ile hazırlanan göre % 30-60 oranında daha stabil olduğu belirtilmiştir.

Woo ve ark. (1980), kırmızı yaban mersini pulpundan antosiyenin eldesi üzerine yaptıkları çalışmada optimum ekstraksiyon koşullarını pulp/çözgen oranı 1:2, ekstraksiyon çözeltisinin (% 95 etanol/1,5 N HCl (99,5/0,5 hacim/hacim) olarak bulmuşlardır. Ekstraktı ultrafiltrasyon işlemi ile kısmen saflaştırıp, ters ozmoz ve vakumlu evaporatör kullanarak konsantre etmişler elde ettikleri ekstraktın kuru madde bazında % 0,11 antosiyenin içerdiğini saptamışlardır.

Kızılciğa benzer bir meyveden (*Vaccinium oxycoccus*) antosiyeninleri ekstrakte etmek amacıyla yapılan bir çalışmada metanol, su, aseton, etilen glikol, propilen glikol, metil etil keton ve izopropanol kullanılmış ve maksimum renk maddesi ekstraksiyonunun %0.03 oranında HCl içeren metanol ile sağlandığı ve HCl'nin asetik asitten daha iyi sonuç verdiği bildirilmiştir. Elde edilen ekstraktı saflaştırmak amacıyla da iyon değiştirici reçine kullanılmıştır (Timberlake ve Bridle, 1980).

Bir çeşit erik meyvesinin (*Prunus cerasifera*) kabuğu ve yapraklarının antosiyenin kaynağı olarak

kullanılabilme durumunun araştırıldığı bir çalışmada siyanidin ve peonidin 3-glikozit ve 3-rutinozidler içeren erik antosiyeninleri, asitlendirilmiş etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstraktın organoleptik açıdan kabul edilebilir özelliklere sahip olduğu ifade edilmiştir (Jackman ve ark., 1987).

Antosiyeninler için en iyi kaynaklardan biri olan üzüm küspesinin kullanıldığı bir çalışmada da , ekstrakte edici çözgen olarak %0.1-1.0 oranında tartarik asit içeren metanol kullanılmış, ortamdaki tartarik asidin fazlası ve % 40'lık KOH çözeltisi kullanılarak çöktürülmüştür (Timberlake ve Bridle, 1980).

Metivier ve ark.(1980), antosiyeninlerin üzüm posasından ekstraksiyonunda kullanılan çözgen ve asidin ekstraksiyon derecesi ve oranı üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmada çözgen olarak etanol, metanol ve su; asit olarak hidroklorik asit, sitrik asit, tartarik asit, formik asit ve propiyonik asit kullanılmış ve kullanılan ekstraksiyon çözümleri arasında en iyi ekstraktın metanol olduğu bildirilmiştir. %10 HCl içeren metanolün ,etanolden % 20 ve sudan % 73 oranında daha etkili olduğu saptanmıştır. Metanol ekstraktındaki en yüksek pigment konsantrasyonuna 48 saat sonunda ulaşıldığı bildirilmiştir. HCl'nin oldukça korozif bir etkiye sahip olmasından dolayı çalışmada ekstraksiyon çözgeninde asit olarak organik asitler de denenmiştir. Organik asitle yapılan denemelerden elde edilen bulgulara göre sitrik asidin metanol ile ve asetik asidin su ile birlikte kullanıldığında daha etkili olduğu belirtilmiştir. Pigment analizi Fuleki ve Francis (1968)'in uyguladığı yöntem göre pH 1 ve 4,5'da pH differential yöntem ile yapılmıştır. Bu çalışmada 100 g üzüm posasında 85 mg antosiyenin içeriği saptanmıştır.

Bronnum-Hansen ve ark. (1985), 2-10 mg/g antosiyenin içeren *Sambucus nigra*'dan renk maddesi ekstraksiyonu üzerine çalışmışlardır. Antosiyenin içeriğinin çeşit ve olgunluk durumu ile çok büyük farklılıklar gösterdiğini, dondurulmuş ürünlerin preslenmesinde daha yüksek verimde ekstrakt elde edildiğini saptamışlardır. Ekstraksiyonlarında hidroklorik asit ile asitlendirilmiş alkol, su ve sitrik asitle asitlendirilmiş su kullanmışlar, en yüksek antosiyenin içeriği olan ekstraktı 761,4 mg antosiyenin/l olacak şekilde etanol:1,5 M HCl (85:15 hacim/hacim) çözeltisi ile elde etmişlerdir.

Kocabıyık ve Yurdagel (1987) de kırmızı üzüm cibresinden boyar bileşiklerin eldesi ve bunların gıdalarda kullanılabilirliği üzerinde çalışmışlardır. Araştırmada Carignane-Grenache çeşidi üzümlerin artığı karışık cibre kullanılmış, cibredeki renk maddeleri sitrik asit içeren metanol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt süzöldükten sonra vakum altında konsantre edilmiş ve buzdolabı koşullarında depolanmıştır. Elde edilen doğal renk maddeleri gül reçeli, gül likörü, akide şekeri ve oksidasyona uğramış beyaz şarapların roze formunun renklendirilmesinde kullanılmış ve 60 gün boyunca belirli zaman aralıklarında absorbans değerlerine bakılarak renk kayıpları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre renklendirilen gıdalarda renk açılmalarının kullanılan gıdanın pH'sına bağlı olarak değiştiği ve gül reçelinde alıkonan renk şiddetinin oldukça yüksek olduğu bulunmuş, bu nedenle renk maddelerinin pH 4,5'un altındaki gıdalarda kullanılabilmesi ifade edilmiştir.

Yıldız ve Dikmen (1988), üzümlerden antosiyenin ekstraksiyonunda en yüksek verimi elde

emek için özütleme değişkenlerinin optimizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Maksimum antosiyanin verimini; özütleme çözücüsü olarak içerisinde % 37'lik hidroklorik asit bulunan %99,5'lik metanol; çözücünün katı maddeye oranı 2:1 hacim:ağırlık, çözücü pH değeri 0 (% 37 HCl/ %99,5 metanol; 0,1/99,9 hacim/hacim), özütleme sıcaklığı 35° C, özütleme süresi 120 dk. olduğu koşullarda elde etmişler ve tek basamaklı özütlemenin yeterli olduğunu bulgulamışlardır. Kırmızı üzümde antosiyaninlerin en önemlileri olarak petunidin 3-monoglikozit, malvidin 5-monoglikozit, siyanidin 3-monoglikozit ve peonidin 3-monoglikozitin varlığını saptamışlardır.

Price ve Wrolstad (1995), yaban mersini ve çay yemişine benzeyen, Amerika'da yetişen bir cins ufak ve siyah meyve (Royal Okanogan Huckleberry) suyunda > 5 g/l miktarlarda antosiyanin bulunduğunu belirtmişler ve antosiyaninleri HPLC-UV dedektör kullanarak kalma zamanlarına göre tanımlamışlar, pigment içeriğinin % 70'ini petunidin 3-(p-kumaril-rutinozit)-5-glikozit olduğunu bulgulamışlardır. Bu pigmentin dışında ise 11 adet petunidin, delfinidin ve malvidin türevi pigmentlerin bulunduğunu belirlemişlerdir.

Hernandez-Perez ve ark. (1996), Mocan (*Visnea mocanera* L.f.) meyvesinden metanol: hidroklorik asit (1000:1 h/h) çözeltisi ile ekstrakt hazırlamışlar, ince tabaka kromatografisi ve HPLC ile içerisindeki antosiyanin ve fenolik madde kompozisyonunu belirlemişlerdir. Yapıdaki antosiyaninlerin delfinidin, siyanidin, petunidin, peonidin ve malvidin glikozitlerinden oluştuğunu belirlemişlerdir.

Gao ve Mazza (1996), mor ayçiçeği kabuklarındaki antosiyaninleri ekstrakte etmek için farklı çözgen sistemleri (etanol-asetik asit-su; 50:1:9 oranında, 0,01 M asetik asit ve SO₂ içeren sulu çözelti) kullanarak, çözgen, ekstraksiyon zamanı, kabuk boyutu, ekstraksiyon çözgeninin pH'sı ve SO₂ konsantrasyonunun ekstraksiyon üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. SO₂ çözeltisinin ekstraksiyonda en etkili çözgen olduğunu saptanmış, bunu etanol-asetik asit-su (50:1:9) çözeltisinin izlediği belirlenmiştir. Optimum koşullar 200 mg/l SO₂ içeren çözelti ile 5 dakikalık ekstraksiyon sonucunda sağlanmıştır.

Antosiyaninlerin Tanımlanması

Farklı çözgenlerle ekstraksiyonu mümkün olan antosiyaninlerinin fraksiyonlara ayrılmasında en çok kullanılan metot ters faz sıvı kromatografisidir (Costa ve ark., 2000). Spesifik bir ayırmanın sağlanabilmesinde her laboratuvar koşullarında uygun yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir birlikte bazı temel koşullar bulunmaktadır. Bu kapsamda antosiyaninlerin belirlenmesinde genellikle UV-görünür diyot tertipli dedektörler kullanılmaktadır. Antosiyaninlerin UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları, aglikonun yapısı ve açillenmiş olup olmaması hakkında bilgi vermektedir (Hong ve Wrolstad, 1990). Kolon olarak genellikle C₁₈ tipi kolonlar kullanılmaktadır (Giusti ve ark., 1998; Phippen ve Simon, 1998; Waterhouse ve ark., 1999). Bu kolonların ayırma karakteristikleri ise üretim koşullarına bağlı olarak değişiklikler gösterebilmektedir.

Antosiyaninler için ayırma işlemlerinin efektif olabilmesi için dereceli elüsyon programı kullanılmakla

birlikte modifiye edici organik çözücü olarak metanol veya asetonitril tercih edilmektedir. Sistemdeki çözücü pH değeri 2,0'nin altında tutulmakta, bu amaçla formik, asetik veya trifloraasetik asitten birisi asitlendirici olarak kullanılmaktadır (Costa ve ark., 2000).

Aglikon polaritesinin piklerin alıkonma zamanını etkileyen en önemli faktör olduğu bilinmektedir. Normal koşullarda kolondan ilk olarak delfinidin türevleri ayrılmakta bunu takiben sırasıyla siyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin ve malvidin türevleri kolonu terk etmektedir. Alıkonma zamanı artan polarite ile azalmaktadır. Şekerlerin bulunması alıkonma zamanını arttırmakta, diglukozitler monoglikozitlerden daha önce kolondan ayrılmaktadır. Antosiyaninlerin açillenme durumunda alıkonma zamanını arttırmaktadır (Costa ve ark., 2000).

Antosiyanin karışımlarının karakterizasyonu için her bir maddenin ayrılması ve toplanmasını gerektirir ve sonrasında nükleer magnetik rezonans ve kütle spektrometresi ile tanımlamalar yapılabilmektedir. Antosiyaninlerin her biri için uygun standartların bulunmaması nedeniyle HPLC/MS sistemiyle bileşiklerin kütle numaraları belirlenerek tanımlama yoluna gidilmektedir.

Gıda maddelerinde ve bitki ekstraktlarında bulunan antosiyaninlerin tanımlanması ile ilgili çalışmalar yapılmış olup, Glassgen ve ark. (1992), Hindistan tipi kara havuçlardaki (*Daucus carota* L. spp sativus) antosiyaninleri ayırmak ve tanımlamak için HPLC/MS tekniğini kullanmışlardır. Asetonitril, su ve formik asidi çözücü olarak seçtikleri sistemde dereceli elüsyon programını uygulamışlardır. Zıt fazlı LC kolondan sonra MS'te 200 l/dk'lık akış hızında kara havuçta bulunan açillenmiş ve açillenmemiş siyanidin türevi antosiyaninleri tanımlamışlardır. Piovon ve ark. (1998) benzer yöntemle *Catharanthus roseus* ekstraktında bulunan antosiyaninleri belirlemişlerdir.

Tamura ve ark. (1994) LC-MS ile Japon üzümündeki antosiyaninleri tanımladıkları çalışmada, antosiyaninleri ayırmak için HPLC sisteminde 1,5 ml/dk. akış hızı, zıt faz kolonda su asetonitril ve triflora asetik asit çözücülerini ve dereceli elüsyon programını kullanmışlardır. Ayırma işleminden sonra gliserol (% 3'lük) ve 1 mg/g dimetil sülfat içeren metanolü 0,3 ml/dk'lık miktarda taşıyıcı çözgen içine eklemişler ve bu karışımın akış hızını 5 l/dk'ya düşürmüşlerdir. Uyguladıkları bu yöntemle 5 adet malvidin türevini tanımlamışlar, ve ekstraktın m/z değeri 331 olan aglikon içerdiğini saptamışlardır.

Baldi ve ark. (1995) LC-MS tekniği ile üzüm (*Vitis vinifera* L.) kabuklarında bulunan antosiyaninlerini belirlemek için asitlendirilmiş etanol ile hazırladıkları ekstraktı organik çözücülerle fraksiyonlarına ayırmışlardır. Dereceli elüsyon programı ile su, metanol, asetonitril ve formik asit çözeltilerini kullandıkları sistemde 1,5 ml/dk'lık akış hızında çalışmışlar, MS'den önce bu akış hızını 60 l/dk'ya azaltmışlardır. Siyanidin, delfinidin, petunidin, malvidin ve peonidin türevlerinden 19 farklı antosiyanini bu iyonizasyon tekniği ile tanımlamışlardır.

Antosiyaninlerin özelliklerinin araştırılması üzerine bir çalışma Takeoka ve ark.(1997) tarafından siyah fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ile yapılmıştır. Antosiyaninler %0.5 HCl içeren metanol ile ekstrakte edilmiş, toplam antosiyanin içeriği 537 nm'deki maksimum absorpsiyon değerleri ile hesaplanmıştır.

Siyah fasulyenin pigment içeriği delfinidin-3-glikozit cinsinden 2132 mg/100 g olarak saptanmıştır. Antosiyaninlerin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektroskopisi (MS) ve spektrofotometrik analizler kullanılmış ve siyah fasulyeye rengini veren antosiyaninlerin % 56'sını delfinidin-3-glikozit, %26'sını petunidin-3-glikozit ve % 18'ini malvidin-3-glikozit olduğu belirlenmiştir.

RodríguezSaona ve ark. (1998), çözgen olarak aseton-kloroform kullanarak kırmızı patatesten antosiyaninleri ekstrakte etmişlerdir. Pigment degradasyonunu önlemek için patateslere ekstraksiyon öncesinde 100° C'de 10 dakikalık buharla haşlama işlemi uygulamışlardır. Monomorik antosiyanin içeriğinin pelargonidin-3-glikozit cinsinden 100 gram taze yumruda 2-40 mg arasında olduğunu belirlemişlerdir. Sıvı ekstrakt C-18 mini kolonundan geçirilerek saflaştırmış ve daha sonra asit ve alkali hidrolizi uygulanarak HPLC-MS ile tanımlamalar yapılmıştır. Kırmızı patatesteki baskın antosiyaninin p-kumarik asit ile açillenmiş pelargonidin-3-rutinozit-5-glikozit olduğu ve iz miktarda peonidin varlığı saptanmıştır.

Cabrita ve ark. (2000), *Vaccinium padifolium*'dan % 1 triflorasetik asit içeren metanol ile katı/çözgen oranı 1/10 olacak şekilde antosiyaninleri +4° C'de ekstrakte etmişler, Amberlit XAD-7 kolonu ile saflaştırma yapılan antosiyaninleri NMR tekniği ile tanımlamışlar ve en baskın antosiyaninlerin petunidin ve peonidin türevleri olduğunu belirtmişlerdir.

Costa ve ark. (2000), frenk üzümü (*Ribes nigrum*) ile yaptıkları bir araştırmada ise, 1,5 ml/dk'lık akış hızında zıt faz kolonda su, asetonitril ve formik asidin taşıyıcı çözgen olarak kullanıldığı HPLC-MS tekniği ile siyanidin-3-glikozit ve siyanidin-3-rutinozitin kütle spektrumlarını elde ederek tanımlamalar yapmışlardır.

Stintzing ve ark. (2002) HPLC-MS yöntemi ile kara havuç, böğürtlen, kırmızı lahana ve tatlı patatesdeki siyanidin türevi antosiyaninleri tanımladıkları çalışmada ters faz C₁₈ kolonda her bir hammadde ekstraktı için farklı dereceli elüsyon programı kullanmışlar, su, asetonitril ve formik asitten oluşan çözücülerini kullanmışlardır. MS koşulları olarak ise 120eV'da pozitif iyon modunda püskürtme arafazının bulunduğu sistemde antosiyaninlerin m/z değerlerini belirleyerek tanımlamalar yapmışlardır. 449,2; 581,2; 743,4; 949,4; 916,9; 773,6 ve 1125,8 m/z değerine sahip farklı kaynaklarda bulunan siyanidin türevlerini belirlemişlerdir.

Slimestad ve Solheim (2002), frenk üzümünden (*R. Nigrum* cv. Titania) antosiyaninleri katı/çözücü oranı 1:4 olacak şekilde % 0,1 triflorasetik asitle asitlendirilmiş sulu metanol ile 24 saat boyunca ekstrakte etmişler, etil asetat su karışımını çözücü olarak kullanmış ve Amberlit XAD-7 kolonunda saflaştırmışlar, etil asetat fraksiyonunu döner evaporatörde konsantre etmişlerdir. HPLC-MS tekniği kullanılarak 15 adet antosiyanin tanımlamışlar, bu toplam antosiyaninin % 97'sini delfinidin ve siyanidin 3-0-glikozit ve 3-0-rutinozitin oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Antosiyaninlerin Antioksidant Kapasiteleri Üzerine

Yapılmış Çalışmalar

Meyve ve sebzelerin antioksidant kapasitesi üzerinde son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır. Antioksidant etkinin, meyve sebzelerle rengini veren antosiyaninler, flavonlar, izoflavonlar, kateşin ve epikateşini içeren flavonoid grubu maddeler tarafından gerçekleştirildiği saptanmıştır. Bu maddeler serbest radikallere karşı koruyucu bir etki göstermektedirler (Skrede ve ark., 2000; Takeoka ve ark., 1997).

Meyve ve sebzelerde bulunan vitamin ve minerallere ek olarak flavonoid ve fenolikler gibi diğer fitokimyasal maddelerin, kolesterolün indüklediği kalp rahatsızlığı riskini ve çeşitli kanser riskini insan vücudunda antioksidant etki göstererek azalttığı bildirilmiştir (Mazza ve Miniati, 1993; Stavric, 1994; Wada ve Ou, 2002; Kalt ve ark., 2000, Anchos ve ark., 2000; Clifford, 2000; Espin et al, 2000). Sağlık üzerinde bilinen bu olumlu etkileri nedeniyle birçok meyve sebzelerin antioksidant kapasiteleri farklı yöntemlerle belirlenmiş ve üzümü meyvelerin antioksidant kapasitesinin yüksek olduğu belirtilmiştir.

Wang ve ark. (1997), antosiyaninler içinde en yüksek antioksidant kapasiteye siyanidin 3-glikozitin sahip olduğunu ve bunu sırasıyla siyanidin-3-ramnoglikozit, siyanidin, siyanidin-3-glikozit ve malvidinin izlediğini belirtmişlerdir. Heinonen ve ark. (1998), LDL (düşük yoğunluklu kolesterol) oksidasyonunun inhibisyonunda antioksidant aktivitesi en yüksek antosiyanidin delfinidin olduğunu bunu ise siyanidin, malvidin ve pelargonidin takip ettiğini saptamışlardır.

Kırmızı ve siyah frenk üzümü, kırmızı ve siyah ahududu, böğürtlen ve yaban mersini meyvelerinde serbest radikalleri tutma ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme özelliği olduğu, bu meyve ekstraktlarının kimyasal yolla açığa çıkan süperoksit radikallerine karşı yüksek aktivite gösterdiği ve hücrede serbest radikal oluşumunu başlatan ksantinoksidaz enzimine (EC 1.1.3.22) karşı inhibitör etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Gültaş ve Turantaş, 2000; Satue-Gracia ve ark., 1997).

Cao ve ark. (1998), üzümü meyveler grubundan 240 g çilek tüketmiş olan ve yaş ortalaması 66,9 olan sağlıklı bayanlarda kontrol grubuna göre serum antioksidant kapasitesinin tüketimin 0-4 saat sonrasında % 10-13 civarında arttığını saptamışlardır.

Wang ve Lin (2000), böğürtlen, kırmızı ve siyah ahududu ile çileğin farklı olgunluk devrelerinde antioksidant kapasitelerini saptamışlar, antioksidant kapasitesinin böğürtlen, çilek ve siyah ahududularda yeşilken, kırmızı ahududularda ise tam olgun durumdayken en fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Wang ve Zheng (2001), çileğin antioksidant kapasitesi üzerine yetiştirme sıcaklığının etkisini inceledikleri çalışmalarında, sıcaklık arttıkça meyvelerin antioksidant kapasitesi, fenolik asit, flavonol ve antosiyanin içeriklerinin yükseldiğini saptamışlardır.

Kalt ve ark. (2000), yaban mersininin çeşitli üretim koşullarına tabi tutulması sonucunda antioksidant kapasitesinde meydana gelen değişimleri incelemişler, dondurulmuş, konserve edilmiş, fırın ürünleri, kurutulmuş ve meyve suyuna işlenmiş bu ürünlerden en yüksek antioksidant kapasiteye sahip olan işleme yönteminin 31,2-39,3 Mmol troloks eşdeğeri /100 g kuru madde ile dondurulmuş ürünler olduğunu belirtmişlerdir.

Wada ve Ou (2002), beş farklı çeşit üzümü meyveden *Rubus lacinatus*, *Rubus ursinus*, *Rubus ursinus idaeus*, *Rubus idaeus* ve *Rubus occidentalis*'in antioksidant aktivitesini oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi ile belirlemişler, tüm meyvelerde 24'den 77,2 µmol troloks eşdeğeri/gram taze meyve değerinde antioksidant kapasitesine sahip olduğunu saptamışlardır.

Sanchez-Moreno ve ark. (1998), kırmızı, pembe ve beyaz şarapların serbest radikalleri yakalama kapasitesi üzerinde çalışmışlar ve bu etkiyi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanarak saptamışlardır. Sırasıyla kırmızı>pembe>beyaz şaraplarda görülen bu etkinin ürünün toplam polifenol içeriğiyle arasındaki korelasyondan kaynaklandığını ($r=0,951454$) bulgulamışlardır.

Prior ve ark. (1998), farklı *Vaccinium* türlerinin toplam fenolik madde, toplam antosiyanin ve antioksidant kapasitesini (oksijen radikal absorbans kapasitesi, ORAC) belirlemişlerdir. Antioksidant kapasitesinin türlere göre 13,9-45,9 µmol troloks eşdeğeri/g meyve, kuru madde bazında ise bu değerlerin 63,2-2823 µmol troloks eşdeğeri/ g KM olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Olgunlaşmanın artmasıyla, toplam fenolik, antosiyanin madde miktarının ve dolayısıyla antioksidant kapasitesinin arttığını saptamışlardır. Antosiyanin içeriği ile ORAC değeri arasında ($r_{xy}=0,77$), fenolikler ve ORAC değeri arasında ($r_{xy}=0,92$)'lik lineer bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.

Yaban mersinlerinin (Lowbush blueberry) işlem görmesi sonucu sıcaklık, pH ve oksidasyonun antosiyanin içeriği, fenolik maddeler ve antioksidant kapasitesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 60° C'da yapılan ekstraksiyonun 25° C yapılarına göre daha yüksek miktarda antosiyanin kazanımına ve bu ekstraktın yüksek antioksidant kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Antioksidant kapasitesinin pH değeri 1,0 olan ekstraktta pH değeri 4,0 ve 7,0 olan ekstraktlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Kalt ve ark., 2000).

Connor ve ark. (2002), *Vaccinium* türleri ile yaptıkları soğuk depolamanın etkisinin de incelendiği benzer bir çalışmada antioksidant aktivite, fenolik madde içeriği ve antosiyanin içeriği arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ($r^2=0,87-0,99$), aynı şekilde olgunlukla artan fenolik madde ve antosiyanin içeriğinin artmasıyla antioksidant aktivitenin de yükseldiğini belirtmişlerdir.

Ersus ve ark. (2004), kara havuçların antioksidant aktivitesine mikrodalga ve tepsili kurutucu kullanılarak uygulanan kurutma işleminin etkisini incelemek üzere yaptıkları çalışmada 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali kullanmışlardır. Taze havuçların EC₅₀ değeri 30,23±1,65 bulunurken kurtulmuş havuçlarda kuru maddedeki artışa bağlı olarak bu değer 7,80-8,79 arasında olduğunu belirtmişlerdir.

Nada ve ark. (2002), nar ekstraktında bulunan delfinidin, siyanidin ve pelargodinin antioksidant aktivitesini belirlemişlerdir.

Leong ve Shui (2001), Singapur marketinde bulunan meyvelerin antioksidant kapasitelerinin belirlenmesi üzerinde çalışmışlar, en yüksek etkiye sahip olan meyvenin "ciku", en düşük etkinin de hindistan cevizi suyunda görüldüğünü bulgulamışlardır.

Bonillo ve ark. (1999), kırmızı üzüm cibresinden fenolik maddeleri etil asetat ve su kullanarak ekstrakte ederek, gıdalarda yağ antioksidantı olarak kullanımı üzerinde çalışmışlardır. Sentetiklere göre daha düşük antioksidant aktivite gösteren fenolikler yine de BHT'ye yakın sonuçlar vermişlerdir, bu etkinin ise kateşin içeriğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Stintzing ve ark. (2002), siyanidin bazı antosiyanin pigmentlerinin renk ve antioksidant özellikleri üzerinde çalışmışlardır. Böğürtlen, *Sambucus nigra*, kara havuç, kırmızı lahana ve tatlı patateslerden elde ettikleri ekstraktları kullanmışlardır. Sinamik asitle açillenmenin renk tonunu mora doğru çevirdiğini ve önemli ölçüde antioksidant kapasitesini arttırdığını belirtmişlerdir. Yüksek antosiyanin içeriğiyle doğru orantılı olarak artış gösteren antioksidant kapasitesinin aynı zamanda açillenmiş sinamik asit içeren pigmentlerde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç

Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda en etkili çözünenin metanol olduğu yapılan birçok çalışmada belirlenmiştir. Ancak metanolün toksik etkisi nedeniyle ekstraksiyonlarda etanol kullanılması önerilebilir. Antosiyaninlerin düşük pH derecelerinde stabil olmaları nedeniyle ekstraksiyon çözeltilerinin asitlendirilmesi uygundur ve bu amaçla zayıf organik asitler (formik, asetik, sitrik ve tartarik) tercih edilmektedir.

Antosiyaninlerin tanımlanmasında C₁₈ kolonlar kullanılmaktadır. Dereceli elüsyonun uygulandığı analizlerde mobil faz olarak asitlendirilmiş metanol-asetonitril tercih edilmektedir. Antosiyaninlerin kimyasal yapılarının farklılıklar göstermesi ve bu maddelerin her birine ait satndartların bulunmasının mümkün olmaması nedeni ile HPLC-MS sistemi kullanılarak bileşiklerin kütle numaraları belirlenerek bu maddeler isimlendirilebilmektedir.

Flavonoid grubu maddelerden antosiyaninlerin serbest radikallere karşı koruyucu etkisi olduğu, kalp rahatsızlıkları ve kanser riskini insan vücudunda antioksidant etki göstererek azalttığı bilinmektedir. Dolayısıyla antosiyanin içeren kırmızı üzüm, çilek, böğürtlen, ahududu, kiraz, vişne, kara havuç, pancar meyve ve sebzelerin tüketimine diyetle önem verilmesi sağlık açısından olumlu etkiler gösterecektir.

Kaynaklar

- Anchos, B., Gonzales, E., Cano, M.P. 2000, Ellagic Acid, Vitamin C and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit, *J.Agric. Food Chem*, 48: 4565-4570p.
- Baldi, A., Romani, A., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Casetta, B., 1995, HPLC-MS Application to Anthocyanins of Vitis Vinifera, *J. Agric. Food Chem.*, 43:2104-2109p.
- Bonillo, F., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 1999, Extraction of Phenolic Compounds from Red Grape Marc for Use as Food Lipid Antioxidants, *Food Chemistry*, 66: 209-215p.
- Bronnum-Hansen, K., Jacobsen, F., Flink, J.M., 1985, Anthocyanin Colourants from Elderberry (*Sambucus nigra L.*) 1. Process Consideration for Production the Liquid Extract, *J. of Food Tech.*, 20: 703-711p.
- Cabrera, L., Froystein, N.A., Andersen, O., 2000, Anthocyanin Trisaccharides in Blueberries of *Vaccinium padifolium*, *Food Chemistry*, 69: 33-36p.
- Cao, G., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L., 1998, Serum Antioxidant Capacity is Increased by Consumption of Strawberries, Spinach, Red Wine or

- Vitamin C in Elderly Woman, *J.Nutr.*, 128: 2383-2390p.
- Clifford, M.N., 2000, Chlorogenic Acids and Other Cinnamates-Nature, Occurance, Diatery Burden, Absorbition and Metabolism, *J.of Food Sci of Food and Agriculture*, 80: 1033-1043p.
- Connor, A.M., Luby, J.J., Hancock, J.F., Berkheimer, S., Hanson, E.J., 2002, Changes in fruit Antioxidant Activity among Blueberry Cultivars During Cold storage, *J.Agric. Food Chem.* 50: 893-898p.
- Costa, C.T., Horton, D., Margolis, S.A., 2000, Analysis of Anthocyanins in Foods by Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis, *J.of Chromatography A.*, 881:403-410p.
- Du, C.T. and Francis, F.J., 1974, Anthocyanin of Rosella, *J.of Food Sci.*, 38, 810-812p.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H., Garcia-Viguera, C., 2000, Anthocyanin based Natural Colorants: A new Source of Antiradial Activity for Foodstuff, *J. Of Agric. And Food Chemistry*, 48: 1588-1592p.
- Fuleki, T. and Francis, F.J., 1968, Qualitative Methods for Anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries, *J.of Food Sci.*, 33:72-77p.
- Gao, L. and Mazza, G., 1996, Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls, *J. of Food Sci.*, 61(3): 600-603p.
- Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., Baggett, J.R., Reed, G.L., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., 1998, Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV Visible Spectroscopy, *J. of Food Sci.*, 63:219-224p.
- Glassgen, W.E., Wray, V., Dieter, S., Metzger, J.W., Seitz, H.U., 1992, Anthocyanins from Cell Suspension Cultures of *Daucus carota*, *Phytochemistry*, 31(5): 1593-1601p.
- Güldaş, M. ve Turantaş, F., 2000, Meyvelerin Beslenmedeki Önemi ve Üzümsü Meyvelerin Sağlık Üzerine Etkileri, Gıda Dünya Yayınları, 12:97-100p.
- Heinonen, M., Rein, D., Satue-Gracia, M.T., Huang, S.W., German, J.B., Frankel, E.N., 1998, Effect of Protein on the Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in a Lecithin-Liposome Oxidation Systems, *J. Agric. Food Chem.*, 46(3): 917-922p.
- Hernandez-Perez, M., Hernandez, T., Gomez cordovez, C., Estrella, I., Rabanal, R.M., 1996, Phenolic Composition of the Mocan (*Visnea mocanera*, L.f), *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3512-3515p.
- Hong, V. and Wrolstad, R.E., 1990, Use of HPLC Separation/Photodiode Array Dedection for Characterization of Anthocyanins, *J. Agric. Chem.*, 38:708-715p.
- Jackman, R.L. and Smith, J.L., 1992, Anthocyanins and Betalains, 183-217p.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, M.A. and Speers, R.A., 1987, Anthocyanins as Food Colorants-A Review, *J. of Food Biochem.*, 11: 201-247p.
- Kalt, W., McDonald, J.E., Donner, H. (2000): Anthocyanins, Phenolics and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products, *J.of Food Sci.*, 65(3): 390-393p.
- King, R.D., 1980, The Determination of Food Colours, 79-106p.
- Kocabiyık, S. ve Yurdagel, Ü., 1987, Kırmızı Üzüm Cibresinden Boyar Bileşiklerin Eldesi ve Gıda Sanayiinde Kullanım Olanakları Üzerine Araştırma, *Gıda*, 12(1): 47-53s.
- Leong, L.P. and Shui, G., 2002, An Investigation of Antioxidant Capacity of fruits in Singapore Markets, *Food Chem.*, 76: 69-75p.
- Liao, F.W.H. and Luh, B.S., 1970, Anthocyanin Pigments in Tinto Cao Grapes, *J.of Food Sci.* 35: 41-46p.
- Mazza, G. and Miniati, E. 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press, London.
- Metivier, R.P., Francis, F.J., Clydesdale, F.M., 1980, Solvent Extraction of Anthocyanins from Wine Pomace, *J. of Food Sci.*, 45: 1099-1100p.
- Moore, A.B., Francis, F.J., Clydesdale, F.M., 1982b, Changes in Chromatographic Profile of Anthocyanins of Red Onions During Extraction, *J. Food Protection*, 45:738-743p.
- Moore, A.B., Francis, F.J., Jason, M.E., 1982a, Acylated Anthocyanins in Red Onions, *J. Food Protection*, 45:590-593p.
- Nada, Y., Kaneyuki, T., Akitane, M., Packer, L., 2002, Antioxidant Activities of Pomegranate Fruit Extract and its Anthocyanins: delphinidin, Cyanidin and Pelargonidin, *J.Agric. Food Chem.*, 50: 166-171p.
- Palmidis, N. and Markakis, P., 1975, Stability of Grape Anthocyanin in Carbonated Beverage, *J. of Food Sci.*, 40: 1047-1052p.
- Phippen, W.B. and Simon, J.E., 1998, Anthocyanins in Basil (*Ocinum basilicum L.*), *J. Agric. Food Chem.*, 46:1734-1738p.
- Piovan, A., Fillipini, R., Favretto, D., 1998, Flow Injection Analysis Mass Spectrometry, a Tool To Investigate The Problems in the Quantitative Analysis of Hypericin Using RP-HPLC, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12:361p.
- Price, C.L. and Wrolstad, R.E., 1995, Anthocyanin Pigments of Royal Okanogan Huckleberry Juice, *J. of Food Sci.*, 60(2): 369-374p.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischer, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M., 1998, Antioxidant Capacity As Influenced by Total phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species, *J. of Food Sci.* 46: 2686-2693p.
- Rodriguez-Saona, L.E., Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 1998, Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes, *J. of Food Sci.* 63(3): 459-465p.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998, A Procedure to Measure the Antiradial Efficiency of Polyphenols, *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 76: 270-276p.
- Satue-Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, H.N., 1997, Anthocyanins as Antioxidants on Human Low density Lipoprotein and Lecithin Liposome Systems, *J. Agric. Food Chem.*, 45(9): 3362-3367p.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 2000, Changes in Anthocyanins and Phenolics During Juice Processing Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*), *J. of Food Sci.* 65(2): 357-364p.
- Slimestad, R. and Solhem, H., 2002, Anthocyanins from Black Currants (*Ribes nigrum L.*), *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3228-3231p.
- Stavric, B., 1994, Role of Chemopreventers in Human Diet, *Clin. Biochem.* Vol.27: 319-332p.
- Stintzing, F.C., Stintzing, A.S., Carlei R., Frei, B., Wrolstad, R.E., 2002, Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-Based Anthocyanin Pigments, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6172-6181p.
- Takeoka, G.R., Dao, L.T., Full, G.H., Wong, R.Y., Harden, L.A., Edwards, R.H., Berrios, D.J., 1997, Characterization of Black Bean (*Phaseolus vulgaris L.*) Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3395-3400p.
- Tamura, H., Hayashi, Y., Sugisawa, H., Kondo, T., 1994, LC-SSI-MS Techniques as Efficient Tools of Characterization of Nonvolatile Phenolic Compounds of Special Hungarian Wine, *Phytochem Anal.*, 5:190-196p.
- Timberlake, C.F. and Bridle, P., 1980, Anthocyanin-occurrence, Extraction and Chemistry, *Food Chem.*, 5, 69-80p.
- Ersus, S., Baysal, T., Yurdagel, U., El, S.N., 2004, Effects of Drying Process on Antioxidant Activity of Purple Carrots, *Nahrung* 48(1): 57-60p.
- Wang, H., Cao, G., Prior, R.L., 1997, Total Antioxidant Capacity of Fruits, *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705p.
- Wang, S.Y. and Lin, H.S., 2000, Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry Varies with Cultiver and Development Stage, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 140-146p.
- Wang, S.Y. and Zheng, W., 2001, Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4977-4982.
- Waterhouse, A.L., Price, S.F., McCord, J.D., 1999, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Methods of Analysis of Wine Polyphenols, *Methods Enzymol.*, 113p.
- Woo, A.H., Elbe, J.H., Amundson, C.H., 1980, Anthocyanin Recovery From Cranberry Pulp Wastes by Membrane Technology, *J. of Food Sci.* 45(4): 875-879p.
- Yıldız, F. ve Dikmen, D., 1988, Kırmızı Üzüm ve Kırmızı Üzüm Kabuğundan Antosiyaninlerin Özütleme, TOAG-649, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Grubu, TÜBİTAK, Ankara, 51S.

Değerli Bilim Adamları

“Kitaplarınızı Biz Yayınlayalım”

Sidas Yayıncılık Ltd. Şti.

Fevzipaşa Blv. Çelik İş Merkezi No: 162/302 Çankaya - İZMİR
0 232 441 60 01 - Fax : 0 232 441 61 06

akademikgida@mynet.com