



Antosiyenin Pigmentlerin Biyokimyası ve Analizi

Yüksel KELEŞ

Mersin Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, İlköğretim Bölümü, Yenişehir Kampüsü, Yenişehir, Mersin

*Sorumlu Yazar:
E-posta: ykeles@mersin.edu.tr

Geliş Tarihi: 22 Şubat 2015
Kabul Tarihi: 30 Mart 2015

Özet

Bitki pigmentlerinden flavonoidlerin en önemli grubu olan antosiyeninler, çiçekli bitkilerin petal renklenmesindeki önemli rolleri dışında, mikroorganizmalar için sinyal olması, patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik streslerin etkilerini azaltma işlevlerine de sahiptir. Antosiyeninlerin temel yapısı 15 karbondan oluşan iki fenil halkası içermektedir. A ve B olarak adlandırılan iki fenil halkası birbirine 3 karbonlu bir köprü ile bağlanmıştır. Bu köprü üçüncü bir halka oluşturur ve C halkası olarak adlandırılır. Antosiyeninlerin B halkasına bağlı OH gruplarının sayısındaki artış renklerinin mavileşmesine neden olur. Hidroksilasyon derecesine göre sırasıyla pelargonidin (turuncu ve pembe renkli), siyanidin (kırmızı renkli) ve delphinidin (mor ve mavi renkli) türevleri oluşur. Çiçekler bu pigment türevlerinin karışımlarını da biriktirebildiğinden sınırsız sayıda renk varyasyonu oluşturulabilir. Antosiyeninlerin analizi modern tekniklerin ve cihazların gelişmesi ile daha kolay ve duyarlı biçimde yapılabilmektedir. Bilinen antosiyeninlerin sayısı 600 ün üzerinde olduğundan farklı antosiyeninlerin analizi için özel çözücüler ve özel uygulamalar gerekmektedir. Uygun özütleme ve izolasyon süreçlerini, kromatografik ayırım ve saflaştırma teknikleri izlemektedir. Son adımda spektroskopik teknikler ile miktar ölçümleri yapılmaktadır. Antosiyeninlerin karakterizasyonu ve tanımlanması amacıyla NMR teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu makalede antosiyeninlerin kimyasal özellikleri ve bununla bağlantılı analiz teknikleri konu edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Analiz, Antosiyeninler, Kromatografi, Pigment biyokimyası, Vakuol pigmentleri

Biochemistry of Anthocyanin Pigments in Plants

Abstract

Anthocyanins are the most important of flavonoid pigments of plants. Researches shown that anthocyanins have important roles in floral pigmentation, additionally, they serve functions in plants as signalling to micro-organisms, protecting against pathogens, ameliorating biotic and abiotic stress. Anthocyanins have a 15-carbon base structure comprised of two phenil rings as called the A and B ring. Connected by a three carbon bridge that usually forms a third ring as called C-ring. An increased number of hydroxyl groups on B rings of anthocyanins has a blueing effect on the color. Three basic types of anthocyanins, pelargonidin (orange and pink colours), cyanidin (magenta colour) and delphinidin (purple and blue colours) are occurred according to the degree of hydroxylation. Flowers can also accumulate mixtures of anthocyanin types, providing further variation in colour. Improvements in methods and instrumentations used for analysis of anthocyanins have made it easier and more sensitive. The number of identified anthocyanins are excess of 600, thus specific solvents and methods required for individual anthocyanin analysis. Proper extraction and isolation procedure shall be follow by chromatographic separation and purification methods. Last step is quantification with spectroscopic technics. In this article is compiled the chemical properties of anthocyanins and relate to analytic technics.

Key words: Analysis, Anthocyanins, Chromatography, Pigment biochemistry, Vacuolar pigments

GİRİŞ

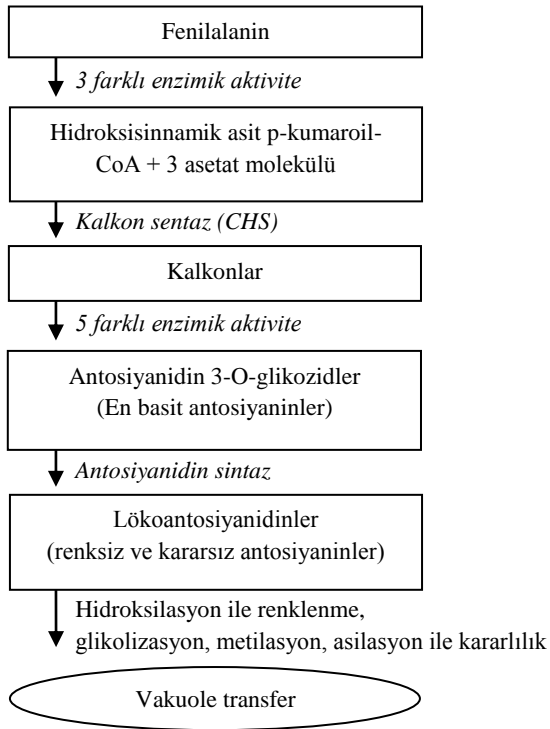
Antosiyeninler, flavonoid pigmentlerin en önemli grubudur. Antosiyenin deyimi ilk kez 1835 yılında kullanılmış olsa da bu maddelerin pH indikatörü olduğu 1664 yılından beri bilinmektedir [1]. 1913 yılında mavi çiçekli *Centaurea cyanus*'ta ilk antosiyenin yapısal olarak tanımlanmış olup, yapısı belirlenmiş antosiyenin sayısı günümüzde 600'ü aşmıştır. Antosiyeninleri de içeren flavonoidlerin bitkilerdeki görevleri, mikroorganizmalar için sinyal, patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik stresleri iyileştirme, oksinlerin taşınmasında ve bitki verimliliğinde etki, böcek ve diğer hayvan polinatörler için çiçekleri görünür yapmak, angiosperm çiçeklerinde renk çeşitliliğinin oluşturulması olarak sıralanabilir [2].

Antosiyenin birikimi ile renklenen çiçek organları genellikle petallerdir. Fakat bazı cinslerde (*Hydrangea*, *Limonium*) sepaller renklenmektedir. Bazı cinslerde ise yapraklar, brakteler veya spateler renklenirler. Antosiyenin pigmentler genellikle petal epidermal hücrelerde bulunduğu halde Orchidaceae ve Boraginaceae türlerinde epidermanın altındaki dokularda yerleşmiş olabilirler [3]. Her bitki hücresi özelleşmiş yapılara gereksinim duymadan antosiyenin üretme yeteneğine sahiptir. Hücre içerisinde antosiyeninler vakuolde depolanır. Bazı türlerde antosiyeninler oldukça yüksek seviyelerde birikebilir. Vakuolde biriken pigmentli cisimler, antosiyenoplast veya AVİ olarak adlandırılır [4]. Bunlar, dairesel ya da yoğun pigmentli globüller biçimli antosiyenin – protein kompleksleridir. [5]. Antosiyeninlerin farklı fonksiyonlarının keşfi ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin anlaşılması, antosiyeninler üzerindeki araştırmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur.

Antosiyanin Biyosentezi

Flavonoid sentez yolu fenilpropanoid reaksiyon yolunun bir parçasıdır. Bu yolda ligninler, lignanlar, stilbenler ve hidroksisinnamik asitler gibi başka sekonder metabolitler de üretilmektedir [6]. Fenilpropanoid yolu fenilalanin ile başlamakta ve çok sayıda enzim aktivitesini gerektiren karmaşık reaksiyon dizileri sonucunda antosiyanin temel çekirdekleri oluşmaktadır. Sentezlenen antosiyaninler sonradan değişik derecelerde hidroksilasyona uğramakta ve hidroksilasyon artışı ile renkleri spektrumun kırmızı ucundan mavi ucuna doğru değişmektedir [7]. Antosiyaninlerin renk oluşumunda glikolizasyon, metilasyon ve asilasyon gibi sekonder modifikasyonlar da önemlidir. Sitosolde sentezlenen antosiyaninler pigmentasyon için vakuollere taşınmaktadır. Antosiyanin oluşumunda gerekli biyosentetik adımlar şekil 1'de verilen şemada özetlenmiştir.

Çiçeklerde antosiyanin pigmentasyonu karmaşık bir olaydır. Birçok çiçeğin rengi antosiyaninlerin üretimi ve birikimi ile ortaya çıkarken renk oluşumunda içsel ve dışsal faktörlerin de rolü vardır. Antosiyanin pigmentasyonunun üç bileşeninden söz edilebilir. 1) antosiyaninlerin primer yapısı, 2) pH ve diğer etkiler nedeniyle oluşan sekonder yapısı ve 3) kendi aralarında veya moleküller arası ve molekül içi etkileşimlerden kaynaklanan tersiyer yapılar [2].

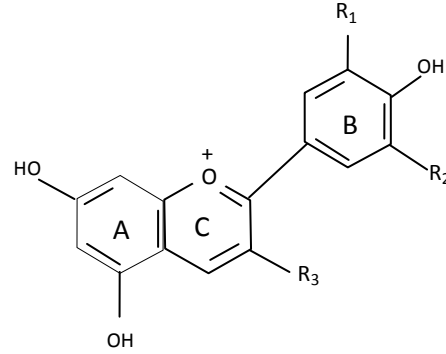


Şekil 1. Antosiyaninlerin sentez sürecinde oluşan ara maddeler ve enzimatik aktiviteler. Karmaşık bir süreç olan antosiyanin sentezi bu şemada basitleştirilerek özetlenmiştir.

Antosiyaninlerin Primer Yapıları

Antosiyaninlerin 15 karbondan oluşan temel yapısında A ve B olarak adlandırılan iki fenil halkası, birbirine üç karbonlu bir köprü ile bağlanmıştır (Şekil 2). Bu köprü genellikle ikinci bir halka oluşturur ve C halkası olarak adlandırılır [8]. Antosiyaninler 400-800 nm arasındaki görünür ışığı soğurma yeteneğine sahiptirler ve bu nedenle pigmenttirler. Pigment molekülleri karakteristik olarak

bağlantısız veya zayıf bağlı elektronlara sahiptir. Böyle moleküllerde elektronların yüksek enerji seviyesine ulaşması için gerekli enerji düşük olduğundan görünür bölgedeki ışık enerjisi yeterli olur. Bir pigmentin rengi görünür ışığın özel bir dalgaboyu ile belirlenir. Bu dalgaboyundaki ışık pigment molekülü tarafından yansıtılır veya dağıtılır. Antosiyaninler en uzun dalgaboylu ışığı absorbe ederler ve turuncu, pembe, kırmızı, magenta, mor, mavi ve mavi-siyah çiçek renklerini oluştururlar. Bu renk çeşitliliğini sağlayabilmeleri, antosiyaninlerin (antosiyaninlerin merkezi kromatoforudur, ağırlık da denir) oksijenasyon derecelerine ve bu kromatoforlara eklenen maddelerin (şekerler gibi) çeşitlerine ve sayılarına bağlıdır [8, 9].



- R₁ = H, R₂ = H ise pelargonidin
- R₁ = OH, R₂ = H ise siyanidin
- R₁ = OH, R₂ = OH ise delfinidin
- R₁ = OCH₃, R₂ = H ise peonidin
- R₁ = OCH₃, R₂ = OH ise petunidin
- R₁ = OCH₃, R₂ = OCH₃, ise malvidin
- R₃ = OH ise 3-hidroksiantosiyanidin

Şekil 2. Antosiyaninlerin temel yapısı (sol üstte). Temel yapıyı oluşturan üç halka A, B ve C harfleri ile işaretlenmiştir. Bu temel yapıya bağlı olan R₁, R₂ ve R₃ ise antosiyanin çeşitlerinin oluşumunu sağlayan değişken grupları göstermektedir. Doğada yaygın görülen antosiyanin çeşitlerinde değişken gruplar sağ tarafta listelenmiştir.

Antosiyanin pigmentlerin renkleri birinci seviyede B halkasının oksijenasyon derecesine bağlıdır. Antosiyaninlerin çoğu üç temel antosiyanin tipinden türemiştir. Bunlardan pelargonidin bir, siyanidin iki ve delfinidin üç OH grubu bulundurur (Şekil 2). B halkasının OH grubu sayısındaki artış antosiyaninlerin oluşturduğu rengin mavileşmesine neden olur. Genellikle çiçek rengi ile biriktirdikleri baskın antosiyanin tipi arasında sıkı bir ilişki vardır. Turuncu ve pembe renkler pelargonidin türevlerinden, kırmızı renkler siyanidin türevlerinden ve mor - mavi renkler delfinidin türevlerinden kaynaklanmaktadır [1]. Çiçekler antosiyanin tiplerinin karışımını da biriktirebilir, böylece çok sayıda renk varyasyonları oluşturabilirler. Bir OH grubunun (özellikle C halkasının 3. karbonundaki) eksikliği pigmentin rengini çok etkilemektedir. Çoğu antosiyanidinler genelde C halkasının üçüncü karbonunda hidroksilasyona sahiptir. Bu OH grubu eksik olan 3-deoksiantosiyanidinlerin soğurdıkları dalgaboyu önemli ölçüde farklılaştığından sarı, turuncu, parlak kırmızı çiçek renklerini oluştururlar [2, 10].

Antosiyenin modifikasyonu tipik olarak O-glikolizasyon, O-asilasyon ve O-metilasyon gerektirir. Bu maddeler kromatoforum bir veya daha fazla OH grubuna veya bu gruplara tutunmuş yapılara bağlanır. Antosiyeninler çoğunda hidroksilasyon C halkasının 3. karbonunda A halkasının 5. ve 7. karbonlarında ve B halkasının 4. karbonunda gerçekleşir.

Antosiyeninlerde görülen modifikasyonların ilki O-glikolizasyondur ve çoğunlukla ilk olarak C halkasının 3. karbonunda gerçekleşir. 3- deoksiantosiyeninlerde ise A halkasının 5. karbona bağlı hidroksil grubu hedeflenir. Sonraki glikolizasyonlar ya A halkasına bağlı diğer hidroksil gruplarına ya da önceden tutunmuş olan şeker kalıntılara eklenirler. Yapıya en fazla katılan şeker glikozdur fakat galaktoz, glukronik asit ve ramnoz da bulunmuştur [2].

Şeker kalıntıları doğası gereği antosiyeninlerin rengini etkilemez fakat sonraki yapısal modifikasyonları etkileyebilir. Glikolizasyon pozisyonu renk oluşumunda daha önemlidir. Antosiyeninlerin çoğu 3-glikozid veya 3,5-diglikoziddir. 3,5-diglikozidler bazı süs çiçeklerinde (örn. *Pelargonium*, *punica*, *matthiola*) 3-glikozidlerden daha yoğun renkler üretirler [11]. Pek yaygın olmamakla birlikte renk üzerinde önemli etkisi olan başka glikolizasyon örnekleri de vardır. Antosiyeninlerde B halkasının 3. Karbonunda oluşan 3'-O-glikolizasyon, 3,5,3'-triglikozidleri oluşturarak *Bromeliaceae*'de parlak kırmızı renklere dönüşmeye neden olur [12]. Gelincik (*Papaver*) türlerinde pelargonidin 3'den 3,7-diglikolizasyona değişmesi çiçek rengini kırmızıdan turuncu sarıya değiştirir [1].

Glikolizasyon pozisyonunun etkisi genellikle sonradan gerçekleşen O-asilasyon etkilerine bağlıdır. Yaygın bir modifikasyon olan O-asilasyon antosiyeninlerin şeker kalıntılara asit (asil) gruplarının eklenmesidir ve antosiyeninler tek veya çoklu asil gruplarına sahip olabilirler. Bu özellikle değerli bir modifikasyondur, çünkü pigmentin tersiyer yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynar [2]. Bir asil katılımı aromatik bir asit (hidroksisinnamik veya hidroksibenzoik) veya alifatik bir asidin (çoğunlukla malonik veya sükkinik veya asetik) glikozile bir ester bağı yardımıyla bağlanmasıdır. Hidroksisinnamik asidin asilasyonu, ileri evrimleşme düzeyine sahip olan bazı familyalarda bulunmuştur. *Senecio* ve *Commelina* gibi bazı bitkilerin çiçeklerinde bulunan antosiyeninler hem aromatik hem alifatik asilasyona sahip olabilmektedir [13].

O-metilasyon çok yaygın rastlanan bir modifikasyondur ve çoğunlukla B halkasındaki hidroksil gruplarında oluşur. Metilasyon molekülün rengi üzerinde çok küçük bir kırmızılaşma etkisine sahiptir, fakat bu çiçek rengini etkileyen diğer faktörler tarafından maskelenebilir. Bununla birlikte bazı durumlarda O-metilasyon tek başına çiçek rengini değiştirebilir. Örneğin *Primula sinensis*'in yardımcı pigmentleri eksik olan mutantları sadece delfinidin içerir ve çiçek rengi mavidir. Delfinidin metilenmiş türevlerinde ise pembe veya kestanerengi olur [2].

Bir antosiyenin modifikasyonu olmasa da, A halkasının artan hidroksilasyonu pigmentte bir kırmızılaşma etkisi oluşturur. Doğada nadir olan bu pigmentler, *Impatiens* ve *Histromeria* türlerinin çiçeklerinde bulunmuştur [14]. Başka flavonoidlerin antosiyeninlere tutunması da bir modifikasyon olarak ele alınabilmektedir. Bu yapılar, bir antosiyenin bir glikozid ve bir flavonoide ester bağları aracılığıyla bağlanmaları sonucunda oluşmaktadır. Bu flavonoid, flavon olabilir ve malonil ya da süksinil gibi

organik dikarboksilik asitlerin karboksilleri aracılığıyla antosiyanine esterleşir. Böyle yapılar orkide çiçeklerinde bulunmuştur [15].

Antosiyeninlerin Sekonder Yapıları

Antosiyeninlerin önemli bir özelliği pH ya bağlı olarak renk yoğunluğunun ve tonunun değişmesi ve hatta rengin kaybolmasıdır. Bunun nedeni sulu çözeltilerde antosiyenin molekülünün geçirdiği karmaşık yeniden düzenlenmelerdir. Bu sayede pH ya bağlı olarak farklı renkler veya renksiz formlar ortaya çıkmaktadır [16]. Bir antosiyenin sadece asidik pH değerlerinde kararlı renk oluşturur. Asit ortam flavilyum katyonu oluşumuna yol açarak kırmızı veya turuncu renk oluşturmaktadır. Daha yüksek pH değerlerinde kararlı olmayan başka formlar ortaya çıkar. pH değeri nötrale doğru ilerledikçe genellikle mor nötral kinonoidal bazlar oluşur ve alkalın pH değerlerinde mavi anyonik kinonoidal bazların oluşumu gerçekleşir. Flavilyum katyon ve kinonoidal baz oluşumunun her ikisi de çiçek pigmentasyonu için önemlidir [17].

İlimli asidik koşullarda (pH 3-6) renksiz antosiyeninlerin varlığı bu pigmentlere has bir kimyasal özelliktir. Bu koşullarda antosiyenin flavilyum katyonlar hidrasyondan zarar görebilir ve hızlı bir reaksiyonla renksiz hemiasetaller ve sonra da kalkan formlarına dönüşebilir. Antosiyeninler çoğu türlerde petal hücrelerinin hafif asidik vakuollerinde birikir. Bu ortamda çeşitli mekanizmalar hidrasyonu engeller ve renkli antosiyenin formlarına kararlılık kazandırır. Bu mekanizmaların çoğu tersiyer yapıların oluşumu ile ilgilidir [18]. Malonil antosiyeninlerin diğerlerine göre daha kararlı olduğu gözlenmiştir. Malonilasyon, malonil gruplarının proton kaybindan kaynaklanan asitlik nedeniyle antosiyeninlerin renksizleşmesini engelleyebilir. Malonilasyon birçok familyada görülmektedir ve yaygın bir kararlılık mekanizması olabilir [13].

Antosiyeninlerin Tersiyer Yapıları

Son yıllarda flavonoid tersiyer yapılarının çiçek renklerinin oluşumunda primer öneme sahip olduğu gösterildi. Tersiyer yapılar, antosiyeninlerin kararlılığını sağladığı gibi renklerin çeşitlenmesini sağlayan bir mekanizma da oluşturmaktadır. Antosiyeninlerde hem soğurulan ışığın miktarı, hem de dalgaboyu renklerinin değişmesine neden olur [16].

Flavonoidlerin tersiyer yapılarının çiçek rengi oluşumundaki rolü intermoleküler kopigmentasyon (intermoleküler yığınlama da denir) ile açıklanmaktadır. Antosiyeninleri kararlı hale getiren bu tip etkileşimler mavileşme etkisine de sahiptir ve renk yoğunluğunu artırır. Mavi çiçek rengi oluşumunda en yaygın mekanizma olarak bilinmektedir [19]. Molekülün düşey yığınlanmasıyla oluşan intermoleküler kopigmentasyonda iki kopigment molekülü arasına antosiyenin molekülü yerleşmektedir [20]. Kopigmentler genellikle flavonoller ve flavonlar gibi başka pigmentlerdir. Fakat antosiyeninlerin varlığı bu kopigmentasyon komplekslerini daha kararlı hale getirir.

İntermoleküler kopigmentasyon aromatik asitlerle poliester oluşturan çok kompleks antosiyeninler için kararlılık sağlamaktadır [20]. Tersiyer yapı ya antosiyenin molekülünün iki asil grubu arasına yerleşmesinden veya bir asil grubu ile örtülmüş antosiyenin çekirdeğinden oluşur. Örneğin, Orkidaceae nin kırmızı- mor çiçeklerinde antosiyenin 7 ve 3' pozisyonunda şekere bağlı aromatik asil grupları pigmentin kararlılığını artırır. Her asil grubunun renk oluşturmadaki rolü farklı olabilir [21].

Bir başka kararlılık mekanizması antosiyaninlerin kendi kendine oluşturdıkları bağlardır. Yüksek konsantrasyonlarda antosiyanin molekülleri düşey yığınlar oluşturarak farklı çiçek renklerinin ortaya çıkmasını sağlar. Bazı türlerde antosiyaninler çok yüksek miktarlarda biriktirebilir. Bazı çiçeklerde kuru ağırlığının %14'ü kadar antosiyanin birikimi belirlenmiştir [1].

Bazı türlerin vakuollerinde antosiyanin ve protein içerikli kararlı ya da kararsız kompleksler oluşabilmektedir. Bu yapılar, antosiyanin vakuolar inklüzyonlar (AVİ) olarak adlandırılmaktadır [4]. AVİ oluşumu çiçek rengini önemli ölçüde değiştirebilir. Örneğin, normalde pembe olan bir *Dianthus* kültürünün pelargonidin türevli pigmenti, petal yaşlanması sırasında AVİ oluşması ile mavi-gri renge döner [4]. Petal yaşlanması sırasında AVİ oluşumu *Rosa hybrida* kültürlerinden mavi-rapsodinin çiçek rengini, canlı kırmızı-mordan daha açık bir soluk mora değiştirir [22]. Bununla birlikte protein - antosiyanin etkileşiminin asıl fonksiyonu belirlenmemiştir. Flavonoidleri vakuole taşıyan proteinlerin antosiyaninlere bağlanması AVİ oluşumu için bir açıklama olabilir.

Bazı türlerde antosiyanin kopigment kompleksleri metal iyonları ile etkileşir. Demir, alüminyum, magnezyum gibi metallerle etkileşim kararlı mavi pigment yapıları oluşturur. Örneğin *Commelina communis* çiçeklerinde kometinin denen pigment supramoleküllü delfinidin bazı altı antosiyanin molekülünden oluşmaktadır [23] ve Mg iyonları içermektedir. Co-pigmentasyon benzeri metal kelatasyonları, pigmentin soğurma spektrumunun daha uzun dalgaboyuna doğru değişmesine neden olur. *Commelina cyanus*'da Mg ve Fe kelatasyonları mavi pigmentasyonu verir. Kommelinine benzer bir kompleks *Salvia patens*'de mavi renk oluşturur. *Hydrangea macrophylla*'da Al^{3+} kelatasyonu mavi pigmentasyonda rol oynar [8].

Antosiyaninlerin Renklerini Etkileyen Dışsal Faktörler

Hücrelerin biçimleri gibi, pigmentli dokuların yapısal özellikleri ışığın kırılması ve yansımaları üzerindeki etkileri nedeniyle pigmentasyon için önemlidir. *Antirrhinum majus*'da pigmentli epidermal hücrelerin şekilleri *Mixta* geninin kontrolü altındadır [24]. Yabancı tipin çiçeklerinde epidermal hücreler konik şekillidir ve çiçek renkleri koyu kırmızıdır. *Mixta*'nın çekinik olduğu hatlarda hücreler düzleştiklerinden epidermal hücrelerin yüzeyinden ışık yansımaları artar ve ışığın kırılımı değişir [25]. Kırılmada meydana gelen değişim, epidermisdeki pigmentli hücrelerin vakuollerini yerine, pigmentsiz hücrelerin vakuollerine ışığı odakladığından çiçek renklerinin solgunlaşmasına yol açar. Petallerinde antosiyanin üreten birçok tür diğer pigmentlerle kombinasyonlar oluşturabilmektedir. Epiderma altındaki karotenoidlerin epidermis hücrelerinde bulunan antosiyaninler ile birlikte renk oluşturması yaygın bir durumdur. Böyle kombinasyonlar siyaha yakın özel petal renklerinin oluşmasında önemli olabilir [24].

Antosiyaninlerin Analizi **Pigment Analizinde Genel Uygulamalar ve Örnek Hazırlama**

Bitki pigmentleri büyük polarite farklılıklarına sahip olduklarından her grup için özel özütlenme (ekstraksiyon) işlemleri uygulanmalıdır. Bu, pigmentlerin çoğu asitlere ve/veya bazlara, oksijene ve ışığa duyarlı olduğundan özütlenme için mutlaka ön hazırlık testlerinin yapılması gerekmektedir. İncelenecek dokunun küçük bir örneğini almak için, küçük parçalar halinde kesmek ve bunları,

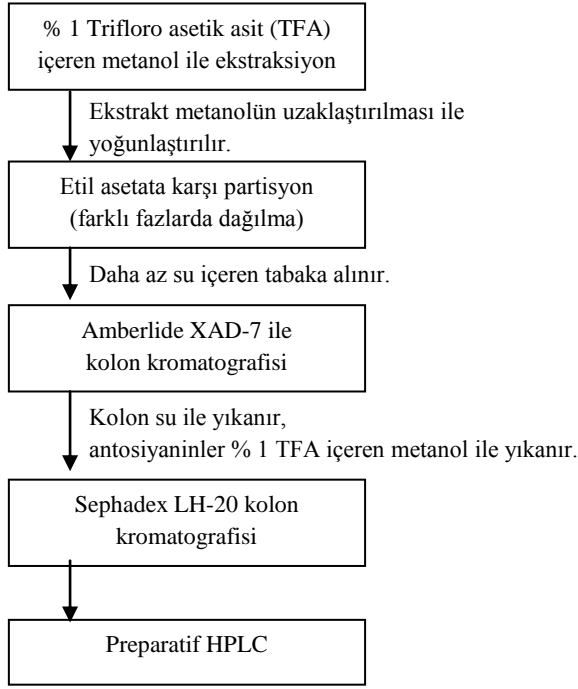
giderek artan polariteye sahip organik çözücü serilerinin içinde özütleyerek en uygun çözücüleri belirlemek gerekebilir. Organik çözücü serilerinin polariteleri su miktarlarını ayarlamakla düzenlenebilir. Eğer özütlenme nötr ortamlarda yeterince tatmin edici değilse, asitli metanol kullanılabilir. Özütün soğurma spektrumunu almak, hangi ana pigment sınıfına dahil olduğunun tanımlanmasını mümkün kılar, böylece özütlenme yöntemine karar verilebilir. Aynı veya farklı sınıflardan birkaç pigmentin bir arada bulunması durumunda bir tek özütlenme metoduyla her birinin belirlenmesi mümkün olmayabilir. Özütlenme işlemi daima çok dikkatli bir biçimde gerçekleştirilmelidir ve hızlı çalışmak da dikkatli çalışmak kadar önemlidir [26].

Herhangi bir özüt veya saflaştırılmış olan herhangi bir pigment saflığı bozucu maddelerden gelen renkler bakımından daima incelenmelidir. Bunlar, güçlü bir oksitleyici ile bir test kromatogramını spreylemekle kolayca belirlenebilir [27]. Saflık bozucuların varlığı adsorban etkinliğini engelleyici aktif yerleri nedeniyle kromatografi sırasında sorun yaratırlar. En yaygın temizleyici uygulamalar, az polar özütlerden polar saflık bozucuların özütlenmesi veya tersi yani mum veya benzeri maddelerle özütlenme öncesi ya da sonrası ortadan kaldırılmasıdır. Çözücü kalıntılarının ortadan kaldırıldığından emin olunması da önemlidir, çünkü bunlar analizler sırasında ciddi problemler çıkarırlar. Az miktardaki su kalıntıları bile hidrofobik pigmentlerin ayrımında ve analizinde sorun oluşturabilir [26].

Antosiyaninlerin ayrımı ve analizi için kullanılan cihazların ve yöntemlerin iyileşmesi, az miktardaki materyalin daha kolay kullanımı ve daha yüksek hassasiyetle ölçülmesini sağlamıştır. Bu sayede tanımlanan antosiyanidin ve antosiyanin yapıların sayıları son yıllarda hızla artmış ve 600 ü aşmıştır. Her antosiyanin bir aglikon (antosiyanidin)(Şekil 2), şeker ve çoğu durumlarda asil grubu veya grupları içermektedir [28]. Antosiyaninlerin özütlenmesi, ayrımı ve karakterizasyonu için analitik yöntemleri içeren kapsamlı derlemeler yayınlanmıştır [26, 29, 30, 31, 32, 33].

Antosiyanin özütlemek bulunduğu dokulara ve antosiyaninin tipine göre farklı tekniklerin uygulanmasını gerektirebilir. Analiz amacının nitel ya da nicel olması da teknik seçiminde önemli olabilir. Antosiyanin özütlemek için bitki dokuları taze olarak kullanılabilir gibi, kuru ya da liyofilize (soğukta vakumla kurutulmuş) materyalin öğütülmesiyle elde edilen toz da kullanılabilir. Çözücü olarak suyun metanol, etanol veya aseton ile kombinasyonları kullanılabilir. Alkolün % 50 den yüksek oranda kullanılması istenmeyen enzim aktivitelerini sınırlar. Antosiyaninlerin çoğunun oksijen ve yüksek sıcaklık koşullarında kararsız olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Antosiyaninler özellikle zayıf asidik ve nötral sulu çözeltilerde özellikle kararsızdır [28]. Özütlenme işlemleri daima iki veya üç kez tekrarlanmalıdır. Antosiyaninler için genel bir izolasyon şeması Şekil 3'de verilmiştir.

Polar karakterleri nedeniyle antosiyaninler çoğunlukla su ve asit içeren alkollerde (metanol) özütlenir. Çözücünün asidik koşullar altında buharlaştırılması kısmi veya toplam antosiyanin hidrolizi ile sonuçlanabilir [34]. Çözücülerdeki zayıf organik asitler (formik, asetik veya trifloroasetik asit) antosiyaninlerin alifatik asitler ile asile olması durumunda tercih edilmelidir. Hiçbir çözücü antosiyaninler için özel olmadığından özütlerde saflaştırma gerekebilir. Sulu özütler vakumda yoğunlaştırıldıktan sonra içerdiği yağlar, karotenoidler ve klorofil kalıntıları petrol eteri veya dietil eter ile yıkanarak ayrılabilir.



Şekil 3. Antosiyenin genel izolasyon şeması. Bu şemada temel adımlar özetlenmiş olup alternatif tekniklere yer verilmemiştir [26].

Antosiyenin Kromatografisi

Temiz bir özüt elde etmek pigmentleri tek tek izole etmek için gereklidir. Pigment sınıfına bağlı olarak farklı metotların kullanımı gerekmektedir, fakat sıvı kromatografisi yöntemleri en yaygın olanlarıdır. Solvent partiyonu (dağılımı), asit ve/veya baz ile özütleme, zon rafinerizasyon, süblimasyon ve ayrimsal kristalizasyon yöntemleri ise nadir olarak kullanılmaktadır. Şu anki uygulamalarda en yaygın kromatografik metotlar HPLC ve TLC'dir. bununla birlikte açık kolon ve flaş kromatografi (FC) de başlangıç ayrımlarında sıkça kullanılmaktadır. Elektroforez ve zit akım (counter - current) kromatografi tekniklerini içeren bazı yöntemler özel durumlarda uygulanabilmektedir. Bir ayırım tekniğinin pigmentleri tek tek elde etmeye yetmediği durumlarda aynı yöntem tekrarlanır ya da bir veya daha fazla kromatografik adım eklenebilir (Şekil 3). İzole edilen pigmentler kristalize edilerek son karakterizasyon için analitik örnekler elde edilir [26].

Kolon Kromatografisi Uygulamaları

C₁₈ silika materyal içeren küçük tek kullanımlı kartuşlar antosiyenin saflaştırılması için basit ve kullanışlı materyallerdir [35]. Daha iyi izolasyon için amberlit XAD-7 polar ve polar olmayan bileşikleri ortadan kaldırmak için kullanılabilir [36]. Kolon yüklendikten sonra 2 L su ile temizlenir. Sonra 300 mL % 0.5 TFA içeren metanol (MeOH) ile antosiyenler yıkanır. Benzer olarak, amberlit XAD-7 içinde *Crocus* çiçeklerinden özütlenen antosiyenler % 0.5 TFA içeren % 4-20 sulu CH₃CN ile yıkanmıştır [37]. Antosiyenlerin tek tek saflaştırılması için sefadex LH 20 kolonlar (100x5 veya 100x1 cm) kullanışlı materyallerdir [38]. Bu materyal için hareketli faz olarak hem metanol-su-TFA (30.5:70:0.5, sabit akış), hem de %20-60 metanol-su (%0.1 TFA, değişken akış) kullanılabilir. Bu kolon materyali 0.2 M NaOH ile temizlenerek yeniden kullanılabilir. Toyopearl

HW-40F jel, sefadex LH-20 den daha iyi ayırım sağlayabilir [39]. Antosiyenlerin semi preparatif izolasyonu için ters faz C₁₈ HPLC kolonu yaygın olarak kullanılmaktadır, bu durumda mobil faz olarak su-metanol karışımı içinde formik asit kullanılabilir.

İnce Tabaka Kromatografisi Uygulamaları

Antosiyenlerin analizi için TLC yaygın biçimde kullanılmaktadır [40]. TLC çözücüsü olarak konsantre HCl-formik asit-su (25 : 24 : 51) (HFS) selüloz tabakalarda antosiyenlerin ve onların mono-, di ve triglikozidlerinin eşzamanlı ayırımı için kullanılmıştır. Bu sistem hidroliz tekniklerinin kullanılması ile antosiyenlerin yapısal ayrımları için özellikle değerlidir. Antosiyenin yapılarının değerlendirilmesi için önce HFS gibi sulu bir çözücü karışımı ve sonra BAS (bütanol-asetik asit-su) (4 : 1 : 5, üstteki tabaka) gibi alkolik çözücü karışımı ile selüloz tabakayı geliştirmek. Başka benzer yapılarla, asil kalıntılarının artması ile normalde hem HFS hem de BAS ile geliştirilen antosiyenlerin RF değerleri artar. Şeker birimlerinin sayısındaki artışla RF değerleri HFS de artarken, BAS da azalır. Selüloz TLC ve PC (kağıt kromatografisi) de antosiyenlerin kromatografik davranışı karşılaştırılabilir ve bu amaçla PC den sağlanan RF değerleri kullanılmaktadır. Zengin bir antosiyen kaynağı (2.4 g/100 g) olan, *Garcinia indica* meyvelerinde antosiyen karakterizasyonu amacıyla selüloz plakalarla TLC'de hareketli faz olarak asetik asit-HCl- su (15 : 3 : 82) karışımı kullanıldı. Sonuçta iki siyanidin türevi iki kırmızı bant (RF 0.26 ve 0.52) olarak başarılı bir şekilde ayrıldı [41]. Ebegümeci çiçeklerinin antosiyenlerinin selüloz tabaka üzerinde kantitatif ayırımı için kullanılan bir HPTLC densitometrik metodun oldukça başarılı olduğu belirlendi [42].

Antosiyenler kromatogram üzerinde ölçülebilir konsantrasyon seviyelerinde görünür haldedir. UV ışık altındaki deneyler pelargonidin, peonidin ve malvidinin 3, 5-diglikozidlerinin 3-glikozidlerinden ayırımı için daha uygun olmaktadır. Kurutulmuş kromatogramları alüminyum klorür (Metanol içinde %3) ile spreylenece aglikonun B halkasındaki yakın serbest hidroksiller nedeniyle maviye döner.

UV-görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

Pigmentlerle nicel çalışmalar neredeyse daima spektroskopik yöntemlerin kullanımını gerektirir ve iyi seçilmiş standartlarla her türlü spektroskopik teknik kullanılabilir. Karışımlarda ve yıkım ürünlerinde ve diğer etkileşen maddelerin varlığında kromatografi (HPLC, TLC) yöntemleri spektroskopi ile bütünleştirilmelidir. Böylece tek tek pigmentlerin miktarları ölçülebilir. Antosiyenler asidik koşullarda 520 nm civarındaki görünür ışığı soğururlar. Karakterizasyon amacıyla kontrollü çözücü koşulları altında, bu bölgedeki soğurma maksimumu aglikonun doğası, eklenmiş şekerlerin pozisyonu, aromatik asil gruplarının varlığı, kopigmentasyon ve birlikte bulunmaları gibi özellikler ile ilişkilidir [41, 43]. Saf antosiyenlerin UV-görünür ışık soğurma spektrumu ölçümlerinde standart işlem %0.01 HCl içeren metanolde çözmektir.

Karakterizasyon ve Tanımlama

Tarihsel ve kimyasal tanımlamalar antosiyenlerin aglikon alanlarını (yani glikozil grupları içermeyen temel antosiyenin yapısını) antosiyenin olarak ifade eder. Bir antosiyenin yapısının tanımlanmasındaki temel adım asit ve enzim hidrolizleri yardımıyla glikozil gruplarının ve asil

kalıntılarının uzaklaştırılması ve antosiyanidin tanımlanmasıdır.

Çoğu bitki dokularında mevcut olan pigmentlerin miktarları oransal olarak en düşük olduğu zaman bile görünüş etkinliği oldukça çarpıcıdır. Olgun kırmızı domateslerin toplam karotenoid içeriği 100 µg/g taze ağırlık kadar iken ıspanak yapraklarında klorofillerin miktarı 1000 µg/g taze ağırlık kadar olabilmektedir [44]. Bu nedenle her bir pigmentin karakterizasyon yöntemi geleneksel olarak kullanılabilir materyallerin ve pigment karakterizasyonunda önemli bir yeri olan duyarlı kromatografi ve spektroskopik tekniklerin eksikliğini yansıtmaktadır. Bütünleşik yöntemlerin ortaya çıkışı, özellikle HPLC ile bütünleşen diyod array dedektör, bir kütle spektrofotometresi veya her ikisi bu durumda önemli bir araç olabilmektedir. Görünür ışık soğurma spektroskopisi her bir pigmentin tanımlanması sürecinin normal bir parçasını oluştururken diğer yöntemler incelenen bileşiğin sınıfına bağlı olacaktır.

Yeni gelişmeler Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) tekniklerini orta ölçekte (mg düzeyinde) izole edilmiş birçok pigmentin tam yapısının açıklanmasında en önemli araç haline getirdi. Standart 1-D ¹H NMR tekniği bir flavonoide uygulandığında ağırlık, mevcut monosakkaritlerin sayısını ve monosakkaritlerin anomerik konfigürasyonlarını belirlemeye yardımcı olabilir. Fakat çoğu pigment için bu bilgi tam yapının aydınlatılması için yeterli olmadığından 1-D ¹³C NMR deneyleri ile bütünleşik 2-D NMR deneyleri ağırlık, şekerlerin sayı ve tipini ve potansiyel asil eklentilerini tanımlamak için kullanılmalıdır [45].

KAYNAKLAR

[1] Harborne JB, Williams CA. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep*, 18: 310-333.

[2] Schwinn KE, Davies KM. 2004. Flavonoids, in *Plant Pigments and Their Manipulation*, Annual Plant Reviews, Vol 14 (Ed. K Davies), Blackwell Publishing, pp, 92-149.

[3] Matsui S, Nakamura M. 1988. Distribution of flower pigments in perianth of *Cattleya* and allied genera I. *Species. J Jap Soc Hort Sci*, 57: 222-232.

[4] Markham KR, Gould KS ve ark. 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions-their nature and significance in flower colouration. *Phytochem*, 55: 327-336.

[5] Nozue M, Kubo H ve ark. 1995. Detection and characterization of a vacuolar protein (VP24) in anthocyanin producing cells of sweet potato in suspension culture. *Plant Cell Physiol*, 36: 883-889.

[6] Springob K, Nakajima J ve ark. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep*, 20: 288-303.

[7] Nakajima J-I, Tanaka Y ve ark. 2001. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glycoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. *J Biol Chem*, 276: 25797-25803.

[8] Yoshida K, Mori M, Kondo T. 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat Prod Rep*, 26: 884-915.

[9] Prior RL, Wu X. 2006. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Res*, 40: 1014-1028.

[10] Taiz L, Zaiger E. 2008 *Bitki Fizyolojisi*. (Çev. Ed. İ. Türkan), Palme Yayıncılık, s: 293-295.

[11] Forkmann G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant Breed*, 106: 1-26.

[12] Saito N, Harborne JB. 1983. A cyanidin glycoside giving scarlet coloration in plants of the *Bromeliaceae*. *Phytochem*, 22: 1735-1740.

[13] Harborne JB. 1986. The natural distribution in angiosperms of anthocyanins acylated with aliphatic dicarboxylic acids. *Phytochem*, 25: 1887-1894.

[14] Tatsuzawa F, Saito N ve ark. 2003. 6-Hidroksipelargonidin glycosides in the orange - red flowers of *Alstroemeria*. *Phytochem*, 62: 1239-1242.

[15] Strack D, Busch E, Klein E. 1989. Anthocyanin patterns in European Orchids and their taxonomic and phylogenetic relevance. *Phytochem*, 28: 2127-2139.

[16] Brouillard R, Dangles O. 1993. Flavonoids and flower colour. in *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986* (Ed. JB Harborne), Chapman and Hall, UK, pp, 565-587.

[17] Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54: 733-749.

[18] Honda T, Saito N. 2002. Recent progress in the chemistry of polyacylated anthocyanins as flower color pigments. *Heterocycles*, 56: 633-692.

[19] Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem*, 55: 481-504.

[20] Goto T, Kondo T. 1991. Structure and molecular stacking of anthocyanins – flower color of variation. *Ang Chemie – Int. Ed. Eng.*, 30: 17-33.

[21] Yoshida K, Toyama Y ve ark. 2000. Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecules of gentiodelphin to blue color development. *Phytochem*, 54: 85-92.

[22] Gonnet JF. 2003. Origin of the color of cv. rhapsody in blue rose and some other so-called 'Blue' roses. *J Agric Food Chem*, 51: 4990-4994.

[23] Kondo T, Yoshida K ve ark. 1992. Structural basis of blue-color development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature*, 358: 515-518

[24] Noda K-I, Glover BJ ve ark. 1994. Flower colour intensity depends on specialized cell shape controlled by a Myb-related transcription factor. *Nature*, 369: 661-664.

[25] Gorton HL, Vogelmann TC. 1996. Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of *Antirrhinum* petals at visible and ultraviolet wavelengths. *Plant Physiol*, 112: 879-888.

[26] Andersen OM, Francis GW. 2004. Techniques of pigment identification, in *Plant Pigments and Their Manipulation*, Annual Plant Reviews, Vol 14 (Ed. K Davies), Blackwell Publishing, pp, 293-341.

[27] Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. 1984. *Plant Drug Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

[28] Andersen OM. 2001. Anthocyanins, in *Encyclopedia of Life sciences*. www.els.net, Macmillan Publishers, New York, USA.

[29] DaCosta CT, Horton D, Margolis SA. 2000. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 881: 403-410.

[30] Delgado-Vargas F, Jimenez AR, Paredes-Lopez O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Cri Rev Food Sci Nutr*, 40: 173-289.

- [31] Takeoka G, Dao L. 2002. Anthocyanins, in *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, (Ed. WJ Hurst), CRC Press, USA, pp, 219-241
- [32] Wrolstad RE, Durst RW ve ark. 2002. Analysis of anthocyanins in nutraceuticals. *ACS Symposium Series*, 803: 42-62.
- [33] Rivas-Gonzalo JC. 2003. Analysis of anthocyanins, in *Methods in Polyphenol Analysis*, (Eds. C Santos-Buelga, G Williamson), Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp, 338-358.
- [34] Revilla E, Ryan JM, Martin-Ortega G. 1998. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *J Agric Food Chem*, 46: 4592-4597.
- [35] Kraemer-Schafhalter A, Fuchs TH, Pfannhauser W. 1998. Solid-phase extraction (SPE)- a comparison of 16 materials for the purification of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* var Nero. *J Sci Food Agric*, 78: 435-440.
- [36] Andersen OM. 1988. Semipreparative isolation and structure determination of pelargonidin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-glucopyranoside and other anthocyanins from the tree *Dacrycarpus dacrydioides*. *Acta Chem Scand*, 42: 462-468.
- [37] Norbaek R, Kondo T. 1998. Anthocyanins from flowers of *Crocus* (Iridaceae). *Phytochem*, 47: 861-864.
- [38] KimJH, Nonaka G ve ark. 1989. Anthocyanidin malonylglucosides in flowers of *Hibiscus syriacus*. *Phytochem*, 28: 1503-1506.
- [39] Froytlog C, Slimestad R, Andersen OM. 1998. Combination of chromatographic techniques for preparative isolation of anthocyanins – applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *J Chromatogr A*, 825: 89-95.
- [40] Francis GW, Andersen OM. 2003. Natural Pigments. in *Handbook of Thin Layer Chromatography*, (Eds. J. Sherma, B Fried), Marcel Dekker, USA, pp, 697-732.
- [41] Nayak CA, Srinivas P, Rastogi NK. 2010. Characterisation of anthocyanins from *Garcinia indica* Choisy. *Food Chem*, 118: 719-724.
- [42] Farina A, Doldo A ve ark. 1995. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva silvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 14: 203-211.
- [43] Strack D, Wray V. 1989. Anthocyanins. in *Methods in Plant Biochemistry* (Eds. PM Day, JB Harborne), Academic Press, UK, pp, 325-355.
- [44] Schoefs B, Determination of pigments in vegetables. *J Chromatogr A*, 1054: 217-226.
- [45] Andersen OM, Fossen T. 2003. Characterization of anthocyanins by NMR. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (Ed. R. Wrolstad), John Wiley, USA, pp, 1-24.