



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BURSA'DA YETİŞTİRİLEN BAZI AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.) VE BÖĞÜRTLEN
(*Rubus fruticosus* L.) ÇEŞİTLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS) İLE İNCELENMESİ VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNLERİ

Esra SARIBURUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2009



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BURSA'DA YETİŞTİRİLEN BAZI AHUDUDU (*Rubus idaeus* L.) VE BÖĞÜRTLEN
(*Rubus fruticosus* L.) ÇEŞİTLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS) İLE İNCELENMESİ VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNLERİ

Esra SARIBURUN

Prof.Dr.Cevdet DEMİR
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA-2009

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Esra SARIBURUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu Tez 21.02.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.



Prof.Dr.Cevdet DEMİR

Danışman

Prof.Dr.Şeref GÜÇER



Doç.Dr.Cihat TÜRK BEN

ÖZET

Bursa da yetiştirilen beş ahududu (Aksu kırmızısı, Rubin, Newburgh, Hollanda boduru, Heritage) ve dört böğürtlen (Bursa 1, Bursa 2, Chester, Jumbo) çeşidinin fenolik madde içerikleri taze, ilk dondurulmuş ve altı ay süreyle -22°C de muhafaza edildikten sonra LC-MS/MS ile tayin edilmiştir. Ellagik asit ahududu ve böğürtlen türlerinin temel fenolik maddesi olduğu tespit edilmiştir. Ellagik asit (1350,36-727,90 mg/kg taze meyve), ferulik asit (820,78-338,27 mg/kg taze meyve), kafeik asit (754,85-202,78 mg/kg taze meyve), *para*-kumarik asit (361,68-142,63 mg/kg taze meyve), *para*-hidroksibenzoik asit (534,20-233,29 mg/kg taze meyve) and kuersetin (46,97-27,31 mg/kg taze meyve) ahududu çeşitlerinin, ellagik asit (1828,07-1555,13 mg/kg taze meyve), ferulik asit (757,69-413,82 mg/kg taze meyve), kafeik asit (736,85-337,89 mg/kg taze meyve), *para*-kumarik asit (877,45-287,15 mg/kg taze meyve) ve kuersetin (74,69-56,78 mg/kg taze meyve) böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktlarında tayin edilmiştir. Ahududu çeşitlerinin fenolik bileşik içerikleri farklılıkları böğürtlen çeşitlerinden daha fazladır. Altı ay süreyle -22°C de muhafaza edilen ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşik içeriklerinin başlangıç miktarlarına göre ortalama iki kat azaldığı belirlenmiştir.

İkinci olarak ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit miktarları ile ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile antioksidan aktivite değerleri UV-VIS spektrofotometresi ile tayin edilmiştir. Ahududu ve böğürtlen çeşitleri ABTS, DPPH, CUPRAC, toplam fenol ve toplam flavonoid içerikleri metanol ekstraktlarında, toplam antosiyanin ve askorbik asit içerikleri ise su ekstraktlarında yüksek değerlere sahiptir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivitelerinin çeşitlerin fenolik içerikleriyle direk olarak ilişkili olduğu bulunmuştur. Antioksidan aktivite ile toplam fenol, toplam flavonoid ya da askorbik asit arasında doğrusal ilişki olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ahududu ve böğürtlen türlerinin zengin antioksidan kaynağı olduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELELER: Ahududu, Böğürtlen, Donmuş muhafaza, Fenolik bileşikler, LC-MS/MS, Toplam fenol, Toplam flavonoid, Toplam antosiyanin, Askorbik asit, Antioksidan aktivite, ABTS, DPPH, CUPRAC.

ABSTRACT

The phenolic compounds in five raspberry (Aksu kırmızısı, Rubin, Newburgh, Holland boduru, Heritage) and four blackberry (Bursa 1, Bursa 2, Jumbo, Chester) cultivars grown in Turkey were determined by LC-MS/MS in fresh, just frozen and stored fruits at -22 °C for 6 months period. Ellagic acid was determined as main phenolic compounds in raspberry and blackberry cultivars. The major phenolic compounds in water extracted samples were ellagic acid (1350,36-727,90 mg/kg fresh fruit), ferulic acid (820,78-338,27 mg/kg fresh fruit), caffeic acid (754,85-202,78 mg/kg fresh fruit), *p*-coumaric acid (361,68-142,63 mg/kg fresh fruit), *p*-hydroxybenzoic acid (534,20-233,29 mg/kg fresh fruit) and quercetin (46,97-27,31 mg/kg fresh fruit) in raspberry and ellagic acid (1828,07-1555,13 mg/kg fresh fruit), ferulic acid (757,69-413,82 mg/kg fresh fruit), caffeic acid (736,85-337,89 mg/kg fresh fruit), *p*-coumaric acid (877,45-287,15 mg/kg fresh fruit) and quercetin (74,69-56,78 mg/kg fresh fruit) in blackberry. The varietal differences in the phenolic compound contents were larger among the raspberry cultivars than the blackberry cultivars. After storage of raspberry and blackberry at -22 °C for 6 months, the amount of individual phenolic compounds decreased by two times on average.

Raspberry and blackberry cultivars were also assayed for antioxidant activity determined as ABTS, DPPH and CUPRAC, total phenol, total flavonoid, total anthocyanin and ascorbic acid contents. Raspberry and blackberry had the highest ABTS, DPPH, CUPRAC, total phenol and total flavonoid contents in methanol extracts, whereas total anthocyanin and ascorbic acid contents were high in water extracts. The antioxidant activity of the raspberry and blackberry was directly related to the total amount of phenolics found in the raspberry and blackberry. A linear relationship was observed between antioxidant activities and total phenols, total flavonoids or total anthocyanins. The data indicate that raspberries and blackberries are rich source of antioxidants.

KEYWORDS: Raspberry, Blackberry, Freezing and Frozen Storage, Phenolic Compounds, LC-MS/MS, Total phenol, Total flavonoid, Total anthocyanin, Ascorbic acid, Antioxidant activity, ABTS, DPPH, CUPRAC.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Fenolik Bileşikler	3
2.1.1. Flavonoidler	3
2.1.1.1. Flavonoller	5
2.1.1.2. Flavonlar	6
2.1.1.3. Flavanonlar	7
2.1.1.4. İzoflavonlar	8
2.1.1.5. Flavanoller	8
2.1.1.6. Antosiyaninler	10
2.1.2. Fenolik Asitler	14
2.1.2.1. Hidroksibenzoik Asitler	14
2.1.2.2. Ellagik Asitler	16
2.1.2.3. Hidroksisinnamik Asitler	18
2.2. Bitkilerde Flavonoidler ve Fenolik Bileşikler	19
2.2.1. Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler	19
2.2.2. Meyvelerin Fenolik Bileşimine Etki Eden Faktörler	21
2.2.3. Meyvelerin Büyüme ve Olgunlaşma Süresince Fenolik Madde İçeriğindeki Değişim	21
2.2.3.1. Fenolik Asitler	21
2.2.3.2. Flavonoidler	22

2.3. Üzümsü Meyvelerin Tanımı	22
2.3.1. Ahududu ve Böğürtlen	22
2.3.2. Türkiye de Ahududu ve Böğürtlen Yetiştiriciliği	23
2.3.3. Üzümsü Meyvelerde Bulunan Fenolik Asitler ve Flavonoidler	26
2.4. Analitik Metotlar	31
2.4.1. Ekstraksiyon ve Hidroliz İşlemleri	32
2.4.1.1. Fenolik Asitler	33
2.4.1.2. Flavonoidler	35
2.4.2. Kromatografik Teknikler	37
2.4.2.1. Fenolik Asitler	38
2.4.2.2. Flavonoidler	42
2.4.3. Flavonoidler ve Fenolik Asitlerin Belirlenmesi ve Tayini	46
2.4.4. Spektroskopik Teknikler	47
2.4.4.1. Toplam Fenol Tayini	47
2.4.4.2. Toplam Flavonoid Tayini	48
2.4.4.3. Toplam Antosiyanin Tayini	48
2.4.4.4. Askorbik Asit Tayini	49
2.4.4.5. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları	49
2.4.4.5.1. ABTS Metodu	51
2.4.4.5.2. DPPH Metodu	52
2.4.4.5.3. CUPRAC Metodu	52
2.4.5. Kimyasal Yapının Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi	53
3. MATERYAL ve YÖNTEM	56
3.1. MATERYAL	56
3.1.1. Çalışmada Kullanılacak Aletler	56
3.1.1.1. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi	56
3.1.1.2. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi	56

3.1.1.3. pH Metre	56
3.1.1.4. Analitik Terazî	57
3.1.1.5. Saf Su Cihazı	57
3.1.1.6. Döner Buharlaştırıcı	57
3.1.1.7. Manyetik Karıştırıcı	57
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Meyveler	57
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	58
3.1.3.1. Kimyasallar	58
3.1.3.1.1. Analitik Saflıktaki Kimyasallar	58
3.1.3.1.2. Diğer Kimyasallar	59
3.1.3.1.3. Sarf Malzemeler	59
3.1.3.2. Çözeltiler	60
3.1.3.2.1. Standart Fenolik Bileşikler ile Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması	60
3.1.3.2.2. Asidik Hidroliz İçin Kullanılan Çözelti	60
3.1.3.2.3. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.2. YÖNTEM	62
3.2.1. Meyvelerin Toplanması ve Analize Hazırlanması	62
3.2.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu	62
3.2.3. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi Çalışma Koşulları	63
3.2.4. Ekstraksiyon Metotları İçin Geri Kazanım Testleri	64
3.2.5. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Ölçümleri	64
3.2.5.1. Toplam Fenol Tayini	64
3.2.5.2. Toplam Flavonoid Tayini	65
3.2.5.3. Toplam Antosiyanin Tayini	65
3.2.5.4. Askorbik asit Tayini	66
3.2.5.5. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları	67

3.2.5.5.1. ABTS Metodu	67
3.2.5.5.2. DPPH Metodu	68
3.2.5.5.3. CUPRAC Metodu	69
3.2.5.6. İstatistiksel Analiz Yöntemi	69
3.2.5.7. Korelasyon Değerlerinin Hesaplanması	69
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	70
4.1. LC-MS Sonuçları	70
4.1.1. Standart Fenolik Bileşiklerin LC-MS Sonuçları	70
4.1.2. Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin LC-MS Sonuçları	75
4.1.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları	83
4.1.4. Analitik Metot Validasyonu	83
4.2. UV-VIS Sonuçları	84
4.2.1. Toplam Fenol Sonuçları	85
4.2.2. Toplam Flavonoid Sonuçları	87
4.2.3. Toplam Antosiyanin Sonuçları	89
4.2.4. Askorbik Asit Sonuçları	91
4.2.5. ABTS Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları	93
4.2.6. DPPH Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları	95
4.2.7. CUPRAC Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları	97
4.2.8. Standart Fenolik Bileşiklerin Toplam ve Antioksidan Aktivite Sonuçları	99
4.3. Korelasyon Sonuçları	100
4.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları	103
5. TARTIŞMA	104
5.1. LC-MS Sonuçları	104
5.1.1. Ekstraksiyon Metotlarının Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinde Bulunan Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi	104
5.1.2. Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin Fenolik Bileşik İçeriği	105

5.1.3. Donmuş Muhafazanın Ahududu ve Böğürtlende Bulunan Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi	108
5.2. UV-VIS Sonuçları	110
5.2.1. Toplam Fenol, Toplam Flavonoid, Toplam Antosiyanin ve Askorbik Asit Sonuçları	110
5.2.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları	113
5.2.3. Korelasyon Sonuçları	115
5.2.4. Standart Fenolik Maddelerin Toplam Fenol, Antioksidan Aktivite Değerleri ve Korelasyon Sonuçları	116
6. SONUÇ	119
KAYNAKLAR	121
EKLER	139
ÖZGEÇMİŞ	140
TEŞEKKÜR	141

KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS- (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)

APCI- Atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaşma

CUPRAC- Bakır iyonu indirgeme kapasitesi

DPPH-2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EA- Ellagik asit

ESI- Elektrosprey iyonlaşma

FA- Ferulik asit

GC -Gaz kromatografisi

HPLC-Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

HPLC-ESI-MS- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi elektrosprey iyonlaşmalı kütle spektrometresi

HPLC-MS- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi

KA- Kafeik asit

KAM- Kamferol

(+)-KAT- (+)-Kateşin

KU- Kuersetin

LC-Sıvı kromatografisi

LSD- En küçük anlamlı fark

MR- Mirisetin

MS- Kütle spektrometri

PA-Protokatekuik asit

p-HBA- *para*-Hidroksibenzoik asit

p-KA- *para*-Kumarik asit

p<0.01- %99 güven aralığı

x- Tayin edilmedi

ÇİZELGELER DİZİNİ	Sayfa
Çizelge 2.1.1.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	6
Çizelge 2.1.1.2.1. Flavonların kimyasal yapısı.....	7
Çizelge 2.1.1.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı.....	7
Çizelge 2.1.1.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	8
Çizelge 2.1.1.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı.....	9
Çizelge 2.1.1.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı.....	11
Çizelge 2.1.2.1.1. Hidroksibenzoik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.....	15
Çizelge 2.1.2.3.1. Hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.	18
Çizelge 2.2.1.1. Meyvelerde bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidler.....	20
Çizelge 2.3.2.1. Ahududu üretimi ve alanlarının ülkemizde yıllara göre dağılımı ile verimliliğin değişimi.....	25
Çizelge 2.3.3.1. Bazı üzümü meyvelerin flavonoid ve fenolik asit içerikleri (mg/kg kuru ağırlık).....	30
Çizelge 2.4.2.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile meyvelerde bulunan hidroksibenzoik, hidroksisinnamik asitler ve ellagik asit analizleri.....	40
Çizelge 2.4.2.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile meyvelerde bulunan flavonollar ve diğer flavonoid gruplarının analizleri.....	44
Çizelge 3.1.1.2.1. ATI Unicam marka UV2-100 cihazının çalışma şartları.....	56
Çizelge 3.1.2.1. Ahududu ve böğürtlen çeşitleri ve renk özellikleri.....	58
Çizelge 3.2.3.1. LC-MS için analiz çalışma koşulları.....	64
Çizelge 4.1.1.1. Standart fenolik bileşiklerin alıkonma zamanı, molekül ağırlığı ve parçalanma ürünleri.....	75
Çizelge 4.1.2.1. Ahududu örneklerinde su ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve).....	77
Çizelge 4.1.2.2. Ahududu örneklerinde metanol ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve).....	79
Çizelge 4.1.2.3. Böğürtlen örneklerinde su ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve).....	81

Çizelge 4.1.2.4. Böğürtlen örneklerinde metanol ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve).....	82
Çizelge 4.1.4.1. Standart fenolik bileşiklerin LOD ve LOQ değerleri.....	84
Çizelge 4.1.2.5. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde bulunan fenolik bileşiklerin % geri kazanım değerleri.....	84
Çizelge 4.2.1.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol miktarı (mg gallik asit/100 g taze meyve).....	86
Çizelge 4.2.1.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol miktarı (mg gallik asit/100 g taze meyve).....	86
Çizelge 4.2.2.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı (mg (+)-kateşin/100 g taze meyve).....	88
Çizelge 4.2.2.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı (mg (+)-kateşin/100 g taze meyve).....	88
Çizelge 4.2.3.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı (mg (+) siyanidin-3-glikozit/100 g taze meyve)	90
Çizelge 4.2.3.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı (mg (+) siyanidin-3-glikozit/100 g taze meyve).....	90
Çizelge 4.2.4.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının askorbik asit miktarı (mg askorbik asit/100 g taze meyve).....	92
Çizelge 4.2.4.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının askorbik asit miktarı (mg askorbik asit/100 g taze meyve).....	92
Çizelge 4.2.5.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının ABTS yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (µmol troloks/g taze meyve).....	94
Çizelge 4.2.5.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının ABTS yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (µmol troloks/g taze meyve).....	94
Çizelge 4.2.6.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (µmol troloks/g taze meyve).....	96
Çizelge 4.2.6.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (µmol troloks/g taze meyve).....	96

meyve).....	
Çizelge 4.2.7.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve).....	99
Çizelge 4.2.7.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve).....	98
Çizelge 4.2.8.1 Standart fenolik maddelerin toplam fenol ve antioksidan aktivite sonuçları.....	99
Çizelge 4.3.1. Ahududu çeşitlerinin su ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki.....	100
Çizelge 4.3.2. Ahududu çeşitlerinin metanol ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki.....	101
Çizelge 4.3.3. Böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki.....	101
Çizelge 4.3.4. Böğürtlen çeşitlerinin metanol ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki.....	102
Çizelge 4.3.5. Standart fenolik bileşiklerin toplam fenol ve antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
Şekil 2.1.1.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.1.1.2. Flavonoid sınıflarının temel glikolizlenme yerleri.....	5
Şekil 2.1.1.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.1.1.2.1. Flavonların kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.1.1.3.1. Flavanonların kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.1.1.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.1.1.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.1.1.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.1.1.6.2. Antosiyanin yapısı.....	11
Şekil 2.1.1.6.3. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları R1=H ya da sakkarit, R2 ve R3= H ya da metil.....	12
Şekil 2.1.1.6.4. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu R1=H ya da sakkarit, R2 ve R3= H ya da metil.....	13
Şekil 2.1.1.6.5. Siyanidin-3-glikozit yapısı.....	14
Şekil 2.1.2.1.1. Hidroksibenzoik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.1.2.2.1. Ellagik asidin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.1.2.2.2. Hekzahidroksidifenillerin (HHDP) vasıtasıyla ellagitanninlerin ellagik asite dönüşümü.....	16
Şekil 2.1.2.2.3. Ahududu da bulunan ellagik asit glikozitleri. A) Ellagik asit-4-arabinosit, B) Ellagik asit-4-asetilarabinosit, C) Ellagik asit-4-asetilksilosit.....	17
Şekil 2.1.2.3.1. Hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.3.1.1. Ahududu ve böğürtlen meyveleri.....	23
Şekil 2.4.1. Bitkilerde ve gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri	31
Şekil 2.4.1.1.1. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit glikozitleri ve esterlerinin yapısı.....	34
Şekil 2.4.1.2.1. Flavonoid glikozitlerden kuersetin-3-4'-O-diglikozitin hidroliz yapısı.....	35
Şekil 2.4.5.1. Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar.....	54
Şekil 2.4.5.2. Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren	54

yapılar.....	
Şekil 2.4.5.3. Antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar.....	55
Şekil 4.1.1.1. Standart fenolik bileşiklerin LC-MS kromatogramları.....	71
Şekil 4.1.1.2. a) (+)-Kateşin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,1 dk.....	71
Şekil 4.1.1.2. b) Protokatekuik asit LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,2 dk.....	71
Şekil 4.1.1.2. c) Ellagik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,4 dk.....	72
Şekil 4.1.1.2. d) Kafeik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,4 dk.....	72
Şekil 4.1.1.2. e) <i>para</i> -Hidroksibenzoik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R :3,7dk .	72
Şekil 4.1.1.2. f) <i>para</i> -Kumarik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R :4,3dk	73
Şekil 4.1.1.2. g) Ferulik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 4,6 dk.....	73
Şekil 4.1.1.2. h) Mirisetinin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 5,1 dk.....	73
Şekil 4.1.1.2. ı) Kuersetin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 9,3 dk.	74
Şekil 4.1.1.2. i) Kamferolün LC-MS kütle spektrumu, t_R : 15,3 dk.....	74
Şekil 4.1.2.1. Ekstraksiyon metotlarının ve muhafaza sürelerinin ahududu çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri.....	76
Şekil 4.1.2.2. Ekstraksiyon metotlarının ve muhafaza sürelerinin böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri.....	76
Şekil 4.2.1.1. Standart gallik asit kalibrasyon grafiği.....	85
Şekil 4.2.2.1. Standart (+)-kateşin kalibrasyon grafiği.....	87
Şekil 4.2.4.1. Askorbik asit kalibrasyon grafiği.....	91
Şekil 4.2.5.1. ABTS metodu ile yapılan antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği	93
Şekil 4.2.6.1. DPPH metodu ile yapılan antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği.....	95
Şekil 4.2.7.1. CUPRAC Metodu ile antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği	97

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, insan vücudunda metabolizma sonrası ortaya çıkan, kısa ömürlü fakat olumsuz etkisi fazla olan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek pek çok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonlarını önleyen ve bunun yanında gıdalardaki oksidasyondan kaynaklanan acılaşmayı ve diğere tat bozulmalarını geciktirme ve önleme özelliğine sahip olan maddelerdir. Gıdaların üretimindeki değişik ve yapay işlemler nedeniyle de vücuda serbest radikal alımı artarak bunların reaksiyonu sonucu oluşan toksik maddeler vücudumuzda birikmektedir. Vücudumuzda biriken bu toksik maddeleri atmak ve onların zararlı etkilerinden kurtulmak için antioksidan maddeler içeren besinler alınması gereklidir. Böylece serbest radikallerin meydana getirdiği hücre tahribatı büyük ölçüde önlenmiş olur. Bu nedenle antioksidan özellikli bileşikler içeren doğal ürünlerin araştırılması insan sağlığı açısından oldukça önem taşımaktadır.

Bilinen ve halen ticari olarak kullanılan sentetik antioksidanlar (butilhidroksi toluen-BHT, butilhidroksi anisol-BHA, ter-butil hidrokinoon-TBHQ gibi) kimyasal yapılarında fenolik gruba sahiptirler. Antioksidan etkiden sorumlu yapının da bu fenolik gruplar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, son yıllarda kimyasal yapısında fenolik bileşikler içeren bitki türleri ile yapılan çalışmalar artmıştır. Bitkilerde bulunan tokoferoller, askorbik asit, flavonoidler ve fenolik asitler en önemli doğal antioksidan gruplardır. Ahududu (*Rubus idaeus* L.) ve böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) de yüksek düzeyde içerdiği askorbik asit, flavonoidler ve fenolik bileşikler nedeniyle insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan özellikleri ve fenolik madde içerikleri araştırılmaktadır. Ayrıca, bu meyvelerin kendilerine özgü cezp edici renk ve tat aroması, yapı ve kokusu ile tüketim yanında gıda endüstrisinde çok çeşitli kullanım alanları bulmaktadır. Yüksek oranda su ihtiva eden taşıma ve depolanmaya uzun süre dayanamayan ahududu ve böğürtlenlerin taze tüketimi her zaman mümkün değildir. Bu sebeple çok çeşitli şekillerde; taze tüketimi olmakla birlikte konserve, reçel, marmelât, pasta, dondurma, şeker, yoğurt, meyve suyu, likör gibi çeşitli şekillerde tüketilmektedir. Bu nedenle öteki meyveler arasında çok özel bir yere sahiptirler.

Ahududu (*Rubus idaeus* L.) ve böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) özellikle A.B.D. ile Kanada ve bazı orta ve doğu Avrupa ülkelerinde yetiştirilmektedir. Ülkemizde Doğu Anadolu, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde yetiştirilebilirken özellikle Bursa ve civarında küçük çapta başlayan üretim daha sonra bölgenin ekolojik koşullarının elverişli olması nedeniyle oldukça yaygın olarak yetiştirildiği bilinmektedir.

Bitki türleri arasında, gerek fenolik bileşikler ve bunların bulunma oranları bakımından, gerekse antioksidan aktiviteleri bakımından büyük farklılık vardır. Bu farklılıklar bitkilerin yetiştirilme koşulları, çevre ve iklim özelliklerinden kaynaklanabildiği gibi genetik yapılarından da büyük ölçüde etkilenmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışma Bursa'da yetiştirilen bazı ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşik içerikleri LC-MS ile tayin edilmiştir. Ayrıca, bu çeşitlerin donmuş muhafaza süresine bağlı olarak fenolik bileşik içeriğindeki değişimi incelenmiştir. İkinci olarak ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik içeriği ile antioksidan aktivite değerleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir ve fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki incelenmiştir. Bunun dışında tayin edilen fenolik bileşiklerin (ellagik, ferulik, kafeik, *p*-kumarik, *p*-hidroksibenzoik asit ve kuesetin) ve bu bileşikler ile hazırlanan karışımın toplam fenol ile antioksidan aktivite değerleri değerlendirilmiştir. Fenollerin her biri için bulunan toplam fenol değerleri ve antioksidan aktivite ile karışım için bulunan değerler karşılaştırıldığında metotların toplanabilirlik özelliği olup olmadığı incelenmiştir.

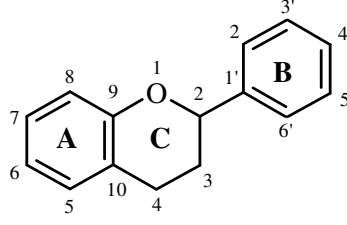
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. FENOLİK BİLEŞİKLER

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 glikozil içeren yapılarını temel olarak tek glikozilli yapılar oluşturur (Manach ve ark. 2004, Shahidi ve Nacz 1995). Glikolizasyonda en yaygın olan şeker yapısı glukoz iken arabinoz, galaktoz, ramnoz ve ksiloz da çoğunlukla kullanılır (Bravo 1998, Klick ve Herrmann 1988). Fenolik bileşikler ayrıca alifatik organik asitlerle, aminlerle, lipidlerle, polisakaritlerle ve diğer substientlerle de bağlanabilir (Bravo 1998). Ayrıca, fenolik bileşiklerin aromatik halka/halkaları hidroksilasyon ve metoksilasyon içerir. Kompleks yapının çeşitliliği, konjugasyonu, hidroksillenmesi ve metoksillenmesi çok geniş aralıkta fenolik moleküllerin oluşumunu sağlar (Harborn ve Williams 2000). Fenolik bileşikler karbon yapısına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılırlar.

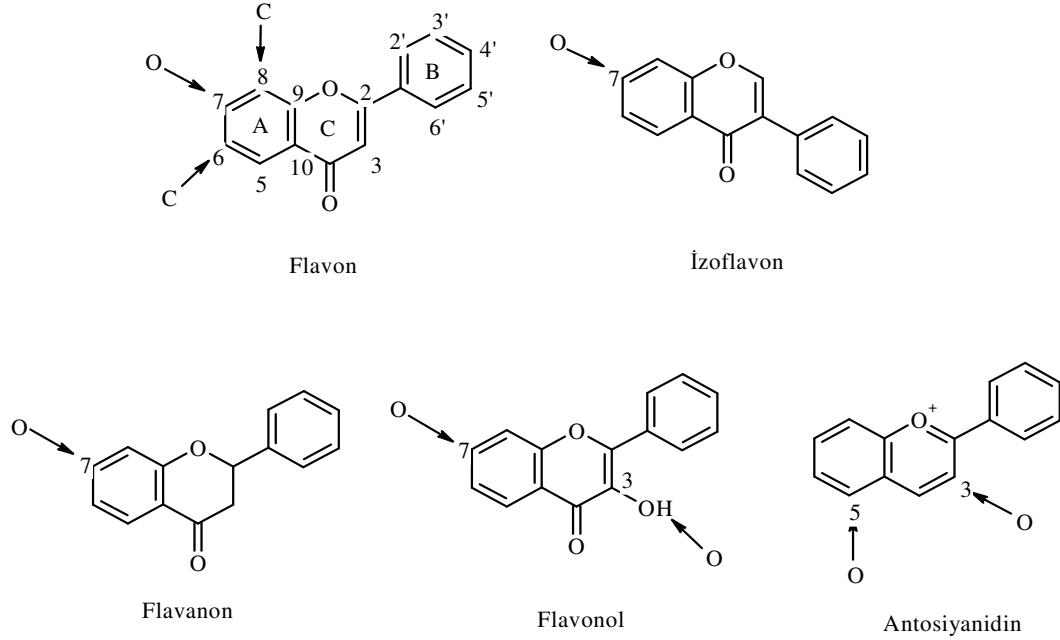
2.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler, iki benzen halkası (A ve B) ve bu halkaları birbirine bağlayan, oksijen içeren piron veya piron halkası (C) ndan oluşan benzer şekilde sıralanmış C₁₅ (C₆-C₃-C₆) yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.1.1.1). Flavonoidler bitkilerde en fazla glikozit türevleri olarak bulunmalarına rağmen aglikonlar olarak da bulunurlar. 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 (Robards ve Antolovich 1997). Ayrıca flavonoid yapısındaki substientler benzil, sinamil, hidroksil, izofenil ve metoksil içerebilirler (Harborn ve Williams 2000). Flavonoidler C halkasındaki değişiklik nedeniyle flavonlar, flavononlar, izoflavonlar, flavonoller, antosiyaninler ve flavanoller olmak üzere alt sınıflara ayrılırlar.



Şekil 2.1.1.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Flavonoid yapılarında herhangi bir hidroksil grubu glikolizlenir ancak belli pozisyonlar glikolizleme için tercih edilir. Örneğin flavonların, izoflavonların ve flavanonların 7-hidroksil grubu, flavonollerin ve flavonollerin 3- ve 7-hidroksilleri ve antosiyanidinlerin 3- ve 5-hidroksilleri yaygın olan glikolizlenme yerleridir (Şekil 2.1.1.2). Glukoz en yaygın karşılaşılan; galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz yaygın olmayan; mannoz, fruktoz, glukuronik ve galakturonik asitler nadir bulunan şekerlerdir. Disakkaritler de flavonoidlerle ilişki içindedir ve yaygın olarak bulunanlar rutinoz (6-*O*- α -L-ramnosil-D-glukoz) ve neohesperidozdur (2-*O*- α -L-ramnosil-D-glukoz). Glikolizasyon asit-dirençli C-C bağı tarafından şekerin flavonoid in temel çekirdeklerine (flavonoid C-glikozit) direkt bağlanması ile meydana gelebilir. Glikolizasyon etkisi flavonoidleri serbest radikallere karşı daha az reaktif ve daha fazla suda çözülebilir hale getirir. Glikozilleme bitkileri stoplazmik zarardan engeller ve çoğunlukla hücre boşlukları içinde bulunan flavonoidlerin depolanmasına da olanak verir (Robards ve Antolovich 1997).



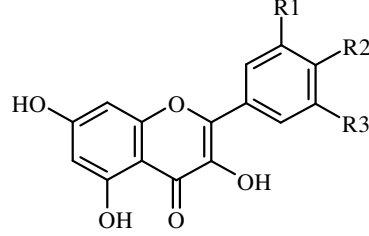
Şekil 2.1.1.2. Flavonoid sınıflarının temel glikolizlenme yerleri

2.1.1.1. Flavonoller

Flavonoller meyvelerde en fazla bulunan flavonoidlerdir (Şekil 2.1.1.1.1). Bu bileşikler genellikle *O*-glikozitler olarak en yaygın C halkasının 3 pozisyonunda hidroksil grubuyla konjuge olmuş ve 5, 7, 4', 3' ve 5' pozisyonlarında uygun sübstituentlerle glikozit yapıda bulunurlar (Kris-Etherton ve ark. 2002, Nichenametla ve ark. 2006). Bu yapının şeker kısmını çoğunlukla glikoz ya da ramnoz oluştururken galaktoz, arabinoz, ksiloz, glukuronik asit gibi şeker yapıları da bulunabilmektedir. Meyvelerde en yaygın bulunan flavonoller kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetindir. Glikolizasyon tercihli olarak 3-hidroksil grubunda meydana gelir. Meyvelerde hakim olan flavonol türler 3-*O*-monoglikozitler > 3-glikozitler > 3-galaktozitler > 3-ramnositler ve 3-glukuronitler olarak sıralanmaktadır (Robards ve Antolovich 1997).

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 (Manach ve ark. 2004).

Rosaceae meyvelerinden olan çilek, ahududu ve böğürtlenin flavonol içeriğini kuersetin, kamferol ve bunların glikozitleri oluşturmaktadır (Rommel ve Wrolstad 1993b). Flavonol glikozit içeriği çeşitli *Rosaceae* meyveleri arasında çok büyük farklılık göstermezler. (Robards ve Antolovich 1997).



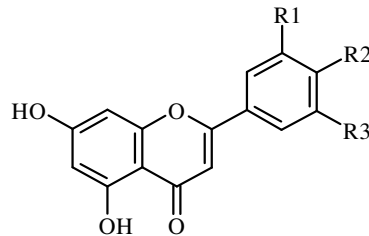
Şekil 2.1.1.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.1.1.1. Flavonollerin kimyasal yapısı

Flavonol	R1	R2	R3
Kuersetin	OH	OH	H
Kamferol	H	OH	H
Mirisetin	OH	OH	OH

2.1.1.2. Flavonlar

Flavonlar meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunmazlar (Şekil 2.1.1.2.1) Flavonlar temel olarak luteolin ve apigenin glikozitlerden oluşur. Maydanoz ve kerevizin önemli flavon kaynağı olduğu belirlenmiştir (Manach ve ark. 2004). Turunçgil meyvelerinin kabukları oldukça fazla miktarda polimetoksilat flavonları: tangeretin, nobiletin ve sinensetin içerirler. Nobiletin ve sinentin taze, şekerli, portakal kabuğunda ve tangeretin ise mandalina yağında bulunduğu bilinmektedir (Robards ve Antolovich 1997, Shahidi ve Nacz 1995). Ayrıca bu polimetoksilat flavonlar en hidrofobik flavonoidlerdir (Manach ve ark. 2004).



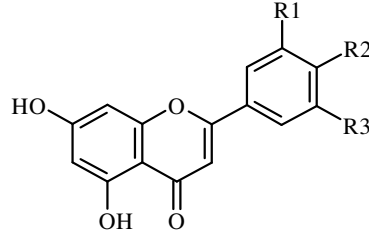
Şekil 2.1.1.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.1.2.1. Flavonların kimyasal yapısı

Flavon	R1	R2	R3
Luteolin	OH	OH	H
Apigenin	H	OH	H

2.1.1.3. Flavanonlar

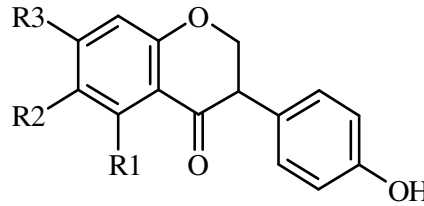
Flavanonlar, bitkilerde diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında daha az miktarda bulunurlar. Flavanonlar hidroksilli glikozitler ve *o*-metilli türevleri olarak bulunurlar (Crozier ve ark. 2006, Espin ve ark. 2007, Scalbert ve ark. 2005). Turunçgil meyvelerinin temel flavonoidleridir. Temel aglikonları naringenin, eriodiktiol ve hesperetindir (Şekil 2.1.1.3.1). Diğer bitkilerin flavanonları nadiren glikozidik şekilde bulunurken turunçgil flavanonları genellikle glikozitleri olarak bulunur. Flavanon temeline dayanarak ekşi portakal için ekşi flavanon olan neohesperidoz, greyfurt için naringin, tatlı portakal, mandalina, limon için ise hesperidindir başlıca flavanonlardır (Robards ve Antolovich 1997).

**Şekil 2.1.1.3.1.** Flavanonların kimyasal yapısı**Çizelge 2.1.1.3.1.** Flavanonların kimyasal yapısı

Flavanon	R1	R2	R3
Naringenin	H	OH	H
Eriodiktyol	OH	OH	H
Hesperetin	OH	OCH ₃	H

2.1.1.4. İzoflavonlar

İzoflavonlar östrojenlere yapısal benzerlik gösteren flavonoidlerdir. İzoflavonlar, steroid olmamalarına rağmen estradiol molekülü içinde 7 ve 4' konumlarında hidroksil gruplarına sahiptirler. İzoflavonlar gerçek olmayan hormonal özellik taşırlar ve östrojen alıcıları bağlama yeteneğindedirler. Bundan dolayı bitkisel kaynaklı östrojenik etkiye sahip yapılar olarak sınıflandırılırlar. Temel izoflavonlar genistein, daidzein ve glisiteindir (Şekil 2.1.1.4.1). İzoflavonlar özellikle baklagiller de bulunurlar. Soya ve soyanın işlenmiş ürünleri insanlar için temel izoflavon kaynağı olarak bilinir. Bu izoflavonların; aglikon, 7-*O*-glikozit, 6''-*O*-asetil-7-*O*-glikozit ve 6''-*O*-malonil-7-*O*-glikozit olmak üzere 4 şekilde bulunduğu bilinmektedir (Manach ve ark. 2004).



Şekil 2.1.1.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.

Çizelge 2.1.1.4.1. İzoflavonların kimyasal yapısı.

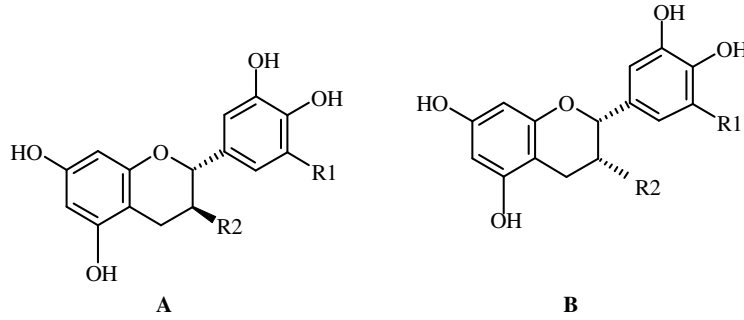
İzoflavonlar	R1	R2	R3
Daidzein	H	H	OH
Genistein	OH	H	OH
Glisitein	H	OCH ₃	OH

2.1.1.5. Flavanoller

Flavanoller en karmaşık flavonoidlerdir ve heterosiklik C halkasının C2 ve C3 iki kiral merkezleriyle karakterize edilirler (Crozier ve ark. 2006, Iriti ve Faoro 2006, Nichenametla ve ark. 2006). Flavanoller hem monomerik (kateşinler) hem de polimerik (proantosyanidinler) yapıda bulunurlar (Şekil 2.1.1.5.1) ve meyvelerin önemli bileşenleridir. Kateşinler prosiyanidinler için monomer birimleridir. Monomerler arasından (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin ve (-)-epigallokateşin meyvelerde

bulunur (Robards ve Antolovich 1997). Flavonoidlerin diğ er sınıflarının tersine flavanoller meyvelerde glikozit yapılarından çok serbest halde bulunurlar (Manach ve ark. 2004). Yeş il ç ay ve ç ikolata en zengin kateş in kaynağı olarak bilinir. Gallokateş in, epigallokateş in ve epigallokateş in galatlar bazı baklagillerde, ü züm llerde ve daha önemlisi ç ayda bulunuyorken kateş inler ve epikateş inler meyvelerin temel flavanolleridir (Arts ve ark. 2000a,b). Kateş inler hem doç al polifenoloksidaz substratları olmaları hem de kahverengileş me olayı ile ilgisi olması sebebiyle önemlidir (Manach ve ark. 2004).

Proantosiyanidinler, C4 ve C8 (ya da C6) arasında bağ lar tarafından bağ lanan kateş inlerin dimerleri, oligomerleri ve polimerleridir ve kondense taninler olarak bilinirler. Yoğ unlaş mış taninler, meyve (ü züm, ş eftali, elma, armut ve ü zümsü meyveler), meş rubat (ş arap, elma ş arabı, ç ay, bira) ve acı ç ikolatadaki acılık veren tattan sorumlu olduğu bilinmektedir (Manach ve ark. 2004).



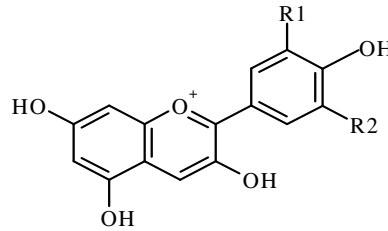
Ş ekil 2.1.1.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı.

Ç izelge 2.1.1.5.1. Flavanollerin kimyasal yapısı.

Flavonol (A/B)	R1	R2
(+)kateş in/(-)epikateş in	H	OH
(+)kateş in galat /(-)epikateş in gallat	H	O-gallat
(+)gallokateş in/(-)epigallokateş in	OH	OH
(+)gallokateş in gallat/(-)epigallokateş in gallat	OH	O-gallat

2.1.1.6. Antosiyaninler

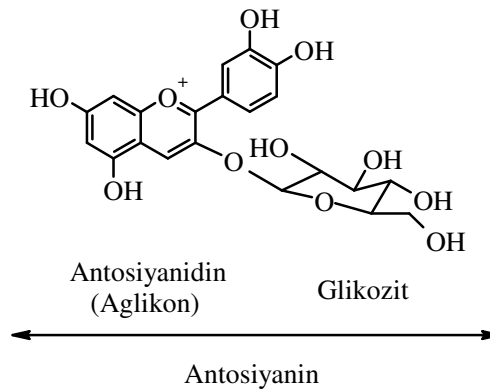
Antosiyaninler suda çözülebilir pigmentlerdir ve çoğu bitki türünün pembe, kırmızı, mavi ya da mor renginden sorumlu olan flavonoidlerdir (Castañeda-Ovando ve ark. 2009). Antosiyanin moleküllerinin sağladığı renkler ilk kez 1939 yılında Pauling tarafından açıklanmıştır. Pauling antosiyaninlerin renk şiddetine rezonans yapıdaki flavilyum iyonunun sebep olduğunu ileri sürmüştür (Wrolstad ve ark. 2005). Antosiyaninlerin temel yapıları antosiyanidinlerdir. Antosiyanidinler (ya da aglikonlar); bir aromatik halka (A) nın oksijen içeren heterosiklik halkaya (C) bağlanması ve yapının da karbon-karbon bağlarıyla üçüncü aromatik halkaya (B) bağlandığı yapılardır (Şekil 2.1.1.6.1) (Konczak ve Zhang 2004). Antosiyanidinler oldukça kararsız yapılardır. Antosiyanidinler glikozit yapılarında bulduklarında (bir şekere bağlandıklarında) antosiyaninler olarak bilinirler (Şekil 2.1.1.6.2) (Castañeda-Ovando ve ark. 2009). Glikolizasyon antosiyaninlere kararlılık sağlar. Bağlanma C-3 ve daha sık olarak da C-5 pozisyonlarında meydana gelebilir (Mazza ve Miniati 1993, Springob ve ark. 2003). En yaygın olan glikozil gruplar monosakkaritlerdir özellikle de glukoz, galaktoz, ramnoz ve arabinozdur. Açılme için ise en yaygın olan açıl grupları antosiyaninlere bağlı bulunan hidroksisinnamik asitler (özellikle kafeik, ferulik ve *para*-kumarik asitler), alifatik dihidrokarboksilat ve malonik asittir (Williams ve Grayer 2004). Açılme suda çözülebilirliği artırır ve enzim katalizli glikozidaz bozunmalarına karşı koruma sağlayabilir (Springob ve ark. 2003).



Şekil 2.1.1.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı

Çizelge 2.1.1.6.1. Antosiyanidinlerin kimyasal yapısı

Antosiyanidin	R1	R2
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin	H	H
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OH	OCH ₃

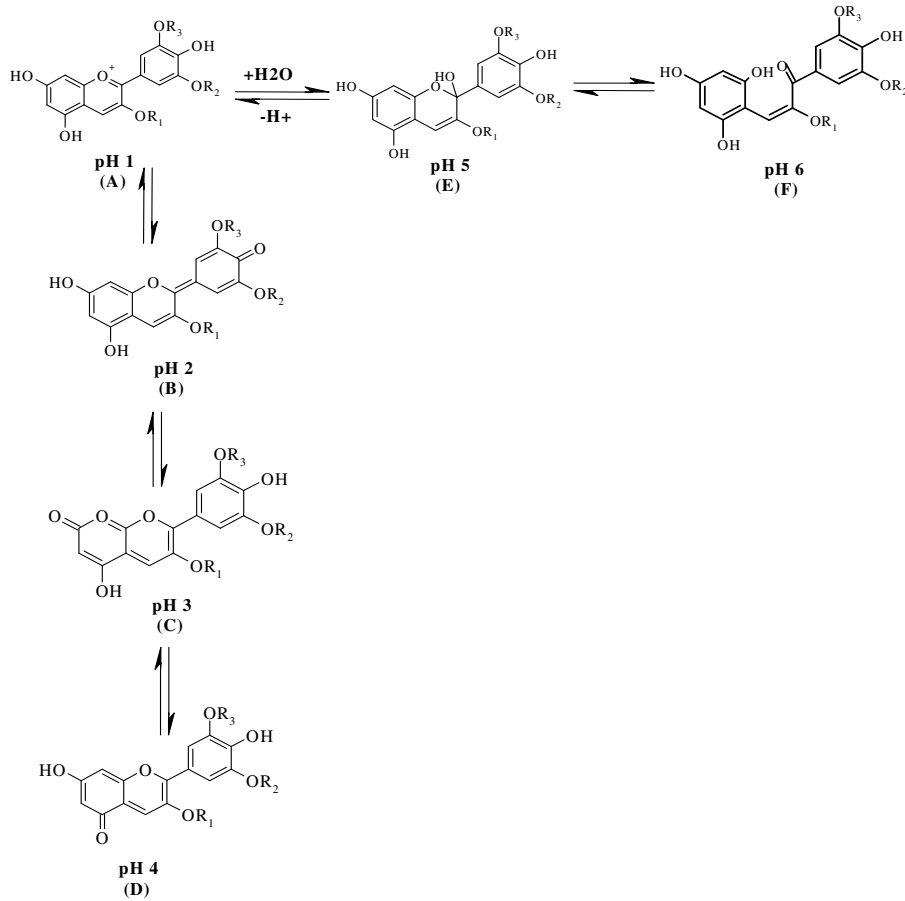
**Şekil 2.1.1.6.2.** Antosiyanin yapısı

Antosiyaninlerin kararlılığı pH, muhafaza sıcaklığı, kimyasal yapı, miktar, ışık, oksijen, çözücüler ve enzimlerin, flavonoidlerin, proteinlerin ve metalik iyonların bulunması gibi faktörlerden etkilenir (Rein 2005).

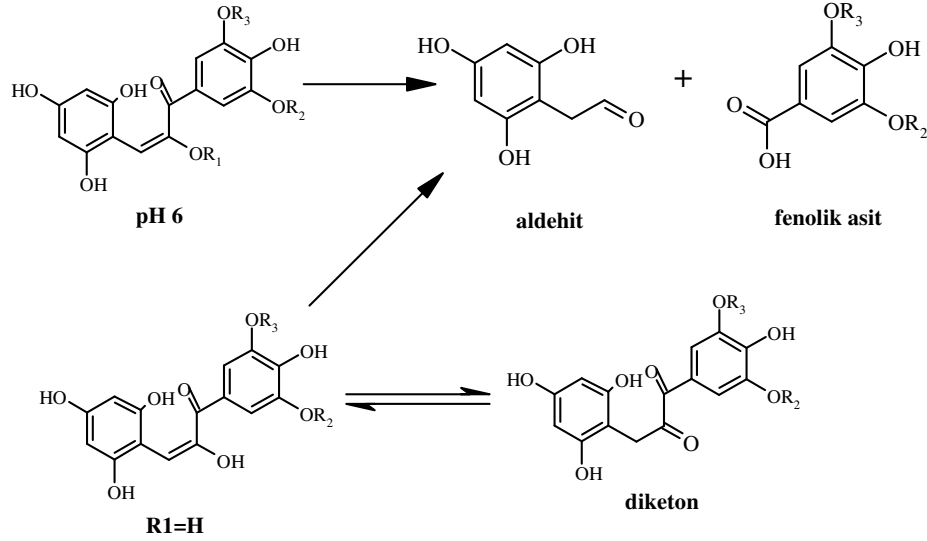
Farklı çözeltiler (asetonitril:su, etanol, propilenglikol, dioksan ve 2-butanon) içindeki sentetik flavilyum tuzlarının hem konsantrasyonlarına hem de çözücüye bağlı olarak renk değiştirdiği belirtilmektedir (Ito ve ark. 2002).

Antosiyaninler çözeltinin pH değerine bağlı olarak farklı kimyasal yapılarda bulunabilirler (da Costa ve ark. 1998, Fleschhut ve ark. 2006). 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 substüent gruplarına bağlı olarak bozunurlar (Şekil: 2.1.1.6.3). 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 2.1.1.6.3 D, A ve E yapıları). pH arttırıldığında, susuz bazın miktarı arttığında ve daha asidik koşullarda baskın türler kırmızı flavilyum iyonudur (Cooper-Driver 2001). 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 (Fleschhut ve ark. 2006) (Şekil 2.1.1.6.4)



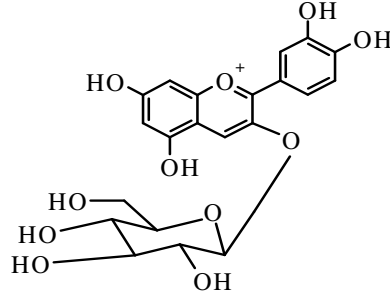
Şekil 2.1.1.6.3. Antosiyaninlerin pH değerine bağlı kimyasal yapıları $R_1=H$ ya da sakkarit, R_2 ve $R_3=H$ ya da metil (Castañeda-Ovando ve ark. 2009).



Şekil 2.1.1.6.4. Antosiyaninlerin bozunma reaksiyonu R1=H ya da sakkarit, R2 ve R3=H ya da metil (Castañeda-Ovando ve ark. 2009).

Doğada çok fazla sayıda ve çeşitte antosiyanin vardır. Antosiyaninler arasındaki temel farklar; hidrosillenmiş grupların sayısı, yapıya bağlı olan şekerlerin sayısı, moleküldeki şeker bağlanan aromatik ve alifatik karboksilatlar ve bu bağların pozisyonudur (Kong ve ark. 2003). Bitkilerde en yaygın bilinen antosiyadiniler ise pelargonidin, peonidin, siyanidin, malvidin, petunidin ve delfinidindir (Clifford 2000).

Antosiyanidininin metillenmemiş üç glikozit türevi (siyanidin, delfinidin ve pelargonidin) yaprakların pigmentinde %80, meyvelerde %69 ve çiçeklerde %50 bulunma değerleriyle doğadaki en yaygın antosiyanidinlerdir (Dey ve Harborne 1993). Daha yaygın olan altı antosiyanidininin meyvelerde ve bitkilerdeki dağılımının %50 siyanidin, %12 delfinidin, %12 pelargonidin, %12 peonidin, %7 petunidin ve %7 malvidin olduğu belirtilmiştir. Doğada 3-monositler, 3-biositler; 3,5 ve 3,7-diglikozitler olan glikozit türevleri daha yaygındır ancak en yaygın olan antosiyaninin siyanidin-3-glikozittir olduğu belirtilmektedir (Şekil 2.1.1.6.5) (Kong ve ark. 2003).



Siyanidin-3-glikozit

Şekil 2.1.1.6.5. Siyanidin-3-glikozit yapısı

Meyvelerde en yaygın bulunan ve katkı sağlayan altı antosiyanidin vardır. Bulunma sıklıkları bakımından değerlendirildiğinde birinci sırada siyanidin gelmektedir ve bunu azalan sırayla delfinidin, peonidin, pelargonidin, petunidin ve malvidin izlemektedir. Ahududu 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-galaktosit, 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 (Boyles ve Wrolstad 1993, Withy ve ark. 1993).

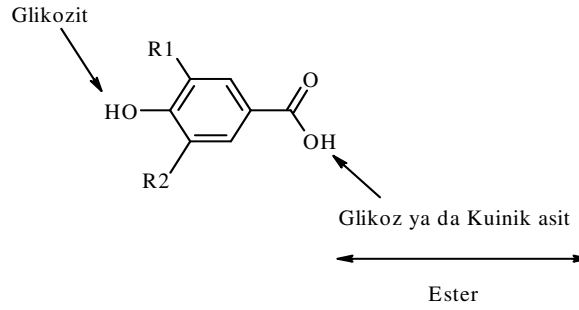
2.1.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler olarak iki guruba ayrılır.

2.1.2.1. Hidroksibenzoik Asitler

Hidroksibenzoik asitler benzoik asitten türemiş C6-C1 yapısında bir fonksiyonel karboksilik aside sahip fenolik bileşiklerdir. Hidroksibenzoik asitlerin yapısal farklılıkları aromatik halkanın hidroksilasyonundan ve metilasyonundan kaynaklanır (Macheix ve ark. 1990). Hidroksibenzoik asitler hem serbest hem de esterleşmiş

yapılarda bulunurlar. Bilinen en yaygın hidroksibenzoik asitler; gallik, *para*-hidroksibenzoik, vanilik, siringik ve protokatekuik asittir. Hidroksibenzoik asitler genellikle malik asit ya da tartarik asit gibi alifatik organik asitlerle (Schuster ve Herrmann 1985) ya da flavonoidler (Winter ve Herrmann 1986) gibi daha büyük yapıli fenolik bileşikler ile konjuge bağıli şekilde glikozitleri ya da esterleri halinde bulunurlar. Gallik asit hidrolizlenebilir taninlerin (gallotanninler ve ellagitanninler) temel fenolik maddesi olup trihidroksil türevleridir (Haddock ve ark. 1982, Strack 1997).



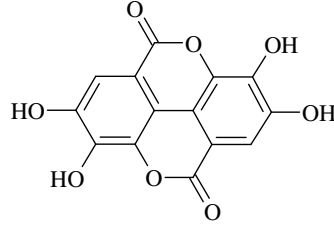
Şekil 2.1.2.1.1. Hidroksibenzoik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.

Çizelge 2.1.2.1.1. Hidroksibenzoik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı

Hidroksibenzoik asitler	R1	R2
<i>para</i> -Hidroksibenzoik asit	H	H
Vanilik asit	OCH ₃	H
Siringik asit	OCH ₃	OCH ₃
Gallik asit	OH	OH
Protokatekuik asit	OH	H

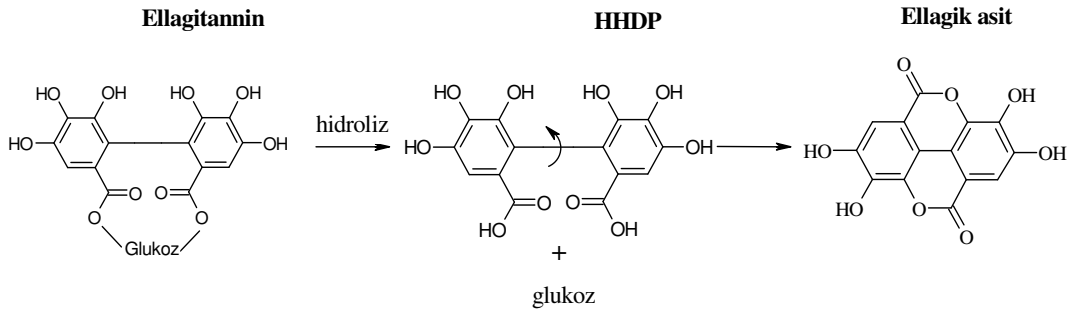
2.1.2.2. Ellagik Asit

Ellagik asit gallik asitin dimerik kondenzasyon ürünü (heksahidroksidifenik asit) ve dilakton olarak bilinen bitki metabolitidir.



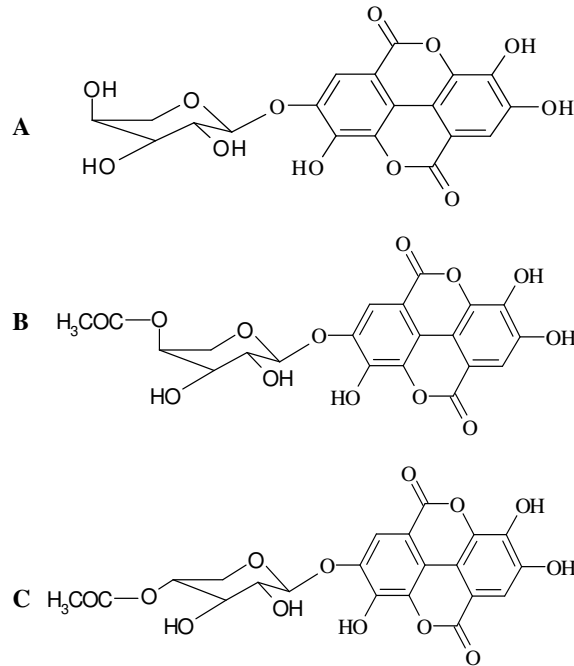
Şekil 2.1.2.2.1. Ellagik asidin kimyasal yapısı.

Ellagik asit, ellagik asit glikozitleri ve ellagitannin türevlerinden hidrolizle serbest kalan yapıdır. Ellagik asit glikozitleri ellagik asidin 4 pozisyonundaki hidroksile tek şeker molekülünün bağlandığı yapılardır. (Mullen ve ark. 2002, 2003). Ellagitanninler, şekerle esterleşen bir ya da daha fazla heksahidroksifenol grubu içeren hidrolizlenebilir bileşikler olarak tanımlanır. Ellagitanninlerin yapısal farklılıkları HHDP birimlerinin sayılarından, gallol ester gruplarının konumundan ve glukoz halkasının konformasyonundan kaynaklanır (Quideau ve Feldman 1996). Ellagik asit, HHDP grupları hidrolizlendiğinde kendiliğinden meydana gelen laktonlaşmayla temel yapıdan serbest kalır (Şekil 2.1.2.2.2).



Şekil 2.1.2.2.2. Heksahidroksidifenillerin (HHDP) vasıtasıyla ellagitanninlerin ellagik asite dönüşümü (Quideau ve Feldman 1996).

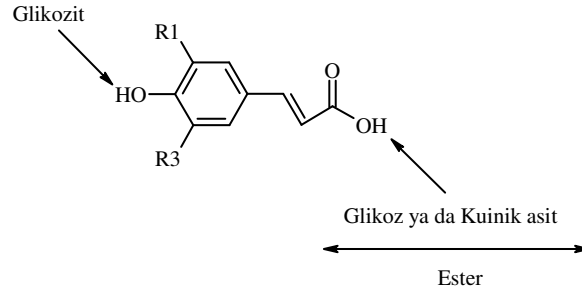
Ellagik asit ceviz, çilek, böğürtlen ve ahududu gibi çeşitli meyvelerde bulunur. Ahududu da serbest ellagik asit, ellagik asit glikozitleri ve ellagitanninler olmak üzere üç farklı yapıda bulunur (de Ancos ve ark. 2000, Häkkinen ve ark 1999b, Rommel ve Wrolstad 1993a). Ayrıca kırmızı ahududuların temel fenolik maddesi olduğu ve fenolik madde içeriğinin %88 ini oluşturduğu belirtilmektedir (Häkkinen ve ark. 1999b). Ahududu da beş ya da altı çeşit ellagik asit glikoziti tayin edilmiştir (Mullen ve ark. 2003):ellagik asit 4-asetilksilosit, ellagik asit 4-arabinosit ve ellagik asit 4-asetilarabinosit (Şekil 2.1.2.2.3) örnek olarak verilmektedir. Gıdalarda bulunan ellagik asidin çok az kısmı serbest halde bulunur (Zafrilla ve ark. 2001). Ellagik asit miktarı ellagik asit türevlerinin asit hidrolizle serbest kalan ellagik asidin eşdeğerinde verilir (Daniel ve ark. 1989). Asit hidrolizi sonrası ellagik asit miktarı çilek (630 µg/g), ahududu (1500 µg/g), böğürtlen (1500 µg/g), ceviz (590 µg/g) ve yaban mersininde (120 µg/g) olarak tayin edilmiştir. Çilekte ellagik asidin %95,7 değerinde etli kısmında geri kalanı da çekirdeğinde bulunmaktadır. Ahududunun ellagik asit içeriğinin %87,5 çekirdeğinde ve %12,2 etli kısmında olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2.1.2.2.3. Ahududu da bulunan ellagik asit glikozitleri. A)Ellagik asit-4-arabinosit, B)Ellagik asit-4-asetilarabinosit, C)Ellagik asit-4-asetilksilosit (Mullen ve ark. 2003).

2.1.2.3. Hidroksisinnamik Asitler

Hidroksisinnamik asitler bitki dokularında en yaygın bulunan fenolik asitlerdir (Robbins 2003). Başlıca hidroksisinnamik asitler *para*-kumarik, ferulik, kafeik ve sinapik asitlerdir. (Şekil 2.1.2.3.1). Hidroksisinnamik asitler dondurma, sterilizasyon ve fermantasyon gibi işlenmiş gıdalar dışında nadiren serbest halde bulunurken (Manach ve ark. 2004) çoğunlukla kuinik, sikimik ve tartarik asitlerle (Herrmann 1989), flavonoidler gibi daha büyük yapıli fenolik bileşiklerle ya da selüloz, lignin ve protein gibi bitki yapı maddeleri ile hidroksiasit esterleri olarak bulunurlar (Clifford 1999, Scalbert ve Williamson 2000).



Şekil 2.1.2.3.1. Hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.

Çizelge 2.1.2.3.1. Hidroksisinnamik asitler ve türevlerinin kimyasal yapısı.

Hidroksisinnamik asitler	R1	R2
<i>para</i> -Kumarik asit	H	H
Kafeik asit	H	OH
Ferulik asit	OCH ₃	H
Sinapik asit	OCH ₃	OCH ₃

Hidroksisinnamik asit türevi olan kafeik asit hem serbest hem de esterleşmiş olarak bulunur. Çoğu meyvenin toplam hidroksisinnamik asit içeriği %75 ve %100 arasında değişen değeriyle ne fazla miktarda bulunan fenolik asittir. Hidroksisinnamik asitler olgun meyvelerin dış yüzünde en fazla miktarda bulunmasına rağmen meyvenin tüm bölümlerinde bulunur. (Manach ve ark. 2004).

2.2. BİTKİLERDE FLAVONOİDLER VE FENOLİK BİLEŞİKLER

2.2.1. Meyvelerde Bulunan Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

Fenolik bileşikler meyvelerin ya hücre altı düzeyinde ya da dokularında bulunurlar ve meyve içerisinde tamamen dağılmış değillerdir (Macheix ve ark. 1990). Meyve ve sebze bölümlerinin içeriklerini bilmek işlenmiş ürünlerde fenolik bileşik verimini en iyi şekilde belirlemek için önemlidir (McRae ve ark. 1990, Sapers ve ark. 1983a). Bazı meyvelerin fenolik asit ve flavonoid içerikleri Çizelge 2.2.4.1' de verilmiştir. Fenolik bileşikler büyük ölçüde hücre duvarında depolanır. Hücre duvarında lignin ve daha basit moleküller (flavonoidler ve ferulik asit esterleri) biriktirilir ve boşluklar da çözülebilir fenolik bileşikler ve onların türevleri saklanır (İbrahim ve Barron. 1989, Monties 1989).

Çözülebilir fenolik bileşikler etli meyvelerde dış dokularda (üst ve alt deri tabakaları) iç dokulardan (posa) oldukça fazla miktarda depolanmaktadır (Macheix ve ark. 1990). Fenolik bileşiklerin oluşumu ışığa bağlı olduğundan fenolik bileşikler meyvelerin ve üzüm sü meyvelerin kabuklarında bulunurlar. Birçok meyvede (kuşüzümü, üzüm, elma, şeftali) flavonol glikozitler temel fenoliklerdir ve meyvelerin yalnızca dış yüzeyinde bulunurlar (Price ve ark. 1999, Wildanger ve Herrmann 1973). Antosiyaninler çilek, kırmızı ahududu, kuru üzüm/kuş üzümü ve bunlar gibi diğer meyvelerde çoğunlukla meyvenin kabuğuna yerleşmiştir (Macheix ve ark. 1990). Kateşinler ve taninlerde çoğunlukla meyvelerin dış dokularında iç dokularından daha fazla miktardadır. Ayrıca olgun meyvelerin en fazla hidroksisinnamik asitleri özellikle de kafeik asit türevleri dış yüzeylerinde bulunur (Herrmann 1989, Macheix ve ark. 1990).

Meyvelerde bulunan hidroksibenzoik asitlerin yerleri çok fazla bilinmemektedir (Macheix ve ark. 1990). Hidroksibenzoik asitler üzümde olduğu gibi ya kabukta ya da karpuz da olduğu gibi meyvenin etinde bulunurlar (Schmidtlein ve Herrmann 1975, Singleton ve Trousdale 1983). Ellagik asit çilek de %96 meyve etinde, %4 çekirdeğinde

ve kırmızı ahududular %88 çekirdeklerinde %12 meyve etinde ellagik asit içermektedir (Daniel ve ark. 1989).

Meyvelerde yaygın olarak bulunan fenolik asitler ve flavonoidler Çizelge 2.2.3.1 de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2.1.1. Meyvelerde bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidler

Fenolik Bileşikler		Gıda Kaynağı
Hidroksibenzoik asitler	Protokatekuik asit, gallik asit, <i>para</i> -hidroksibenzoik asit	Ahududu, böğürtlen, çilek, frenk üzümü
Hidroksisinnamik asitler	Kafeik asit, klorojenik asit, kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit	Yaban mersini, kivi, kiraz, armut, elma, elma suyu, üzüm
Flavonlar	Apigenin, luteolin	Greyfurt, portakal ve limon, kırmızı üzüm, karpuz, kavun
Flavonollar	Kuersetin, kamferol, mirisetin	Üzümsü meyveler, yaban mersini, frenk üzümü, kayısı, elma, siyah üzüm, greyfurt
Flavanonlar	Hesperitin, naringenin	Greyfurt, portakal ve limon
Flavan-3-oller	Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin galat, epigallokateşin galat	Çay, elma, kiraz, armut, kayısı, üzüm, şeftali, böğürtlen, elma şarabı
Antosiyaninler	Siyanidin, pelargonidin, peonidin, delfinidin, malvidin	Böğürtlen, ahududu, frenk üzümü, yaban mersini, siyah üzüm, kiraz, çilek

Kaynak: Crozier ve ark. 2006, Espin ve ark. 2007, Harnly ve ark. 2006, Manach ve ark. 2004, Robards ve Antolovich 1997, Sakakibara ve ark. 2003, Scalbert ve ark. 2005.

2.2.2. Meyvelerin Fenolik Bileşimine Etki Eden Faktörler

Bitkilerin fenolik madde içerikleri genetik faktörlerden ve çevresel koşullardan etkilenir ve oldukça çeşitlilik gösterir. Bitki türü, çeşit, olgunluk, işleme ve muhafaza etme gibi diğer faktörlerde bitkilerin fenolik içeriklerine etki eder (Parr ve Bolwell 2000).

2.2.3. Meyvelerin Büyüme ve Olgunlaşma Süresince Fenolik Madde İçeriğindeki Değişim

Fenolik bileşik çeşitlerinin birikmesi meyvenin fiziksel durumuyla oldukça ilgilidir ve dönüşme ve katabolizmayı için alan daha ileri metabolizma ve biyosentez arasındaki dengenin sonucudur. Fenolik metabolizmanın en önemli kontrol mekanizmaları enzimlerin miktarı ve enzim aktivitelerinin düzenidir (Harborne 1994, Macheix ve ark. 1990).

Birçok araştırma fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının genellikle genç meyvelerde ve dokularda daha yüksek olduğunu belirtmektedir (Britton 1983, Macheix ve ark. 1990). Özellikle antosiyaninler genç filizlerde ve yapraklarda daha fazla miktarda üretilmektedirler (Britton 1983).

2.2.3.1. Fenolik Asitler

Kafeik asit, *para*-kumarik asit ve ferulik asit konsantrasyonlarında genellikle kırmızı ahududular, frenk üzümü ve çileklerin genç meyvelerinde yüksek, olgunlaşma ve hasat sonrası depolama sırasında başlangıçta hızlıca sonra da daha yavaş düşme gözlenir (Mosel ve Herrmann 1974, Stöhr ve Herrmann 1975a,b). Çilekte *para*-hidroksibenzoik asit meyve gelişiminin son döneminde görülmektedir (Stöhr ve Herrmann 1975b). Çileklerin ellagik asit içeriği yeşil meyvenin etinde kırmızı meyvenin etinden daha fazladır (Maas ve ark. 1991).

2.2.3.2. Flavonoidler

Kırmızı ve siyah ahududuların toplam fenol ve antosiyanin içerikleri meyve olgunlaştıkça artar (Wang ve Lin 2000). Yaban mersini ve çay üzümü meyveleri de hasat zamanı daha olgun meyvelere sahiptirler ve toplam fenol ve antosiyanin konsantrasyonu artar (Prior ve ark. 1998). Benzer şekilde flavonolların miktarı örneğin kuersetin glikozitler ve özellikle mirisetin frenk üzümünün olgunluk zamanında önemli derecede artar (Stöhr ve Herrmann 1975a). Ekilebilir yaban mersinlerinin mirisetin içeriği olgun meyvelerde ham meyvelerden daha yüksektir. Buna karşın çoğu meyvenin (kırmızı ve beyaz frenk üzümleri, vişne, ekilebilir yaban mersini, mürver) kamferol ve kuersetin glikozit konsantrasyonları olgun meyvelerde ham meyvelerden daha düşüktür (Stöhr ve Herrmann 1975a). Ayrıca, böğürtlen ve çilek gibi olgun meyvelerde toplam fenol konsantrasyonu önemli derecede düşer (Wang ve Lin 2000). Çileklerin ve kırmızı ahududuların flavan-3-ollerin konsantrasyonları büyüme ve gelişme süresince düşer (Mosel ve Herrmann 1974, Stöhr ve Herrmann 1975b).

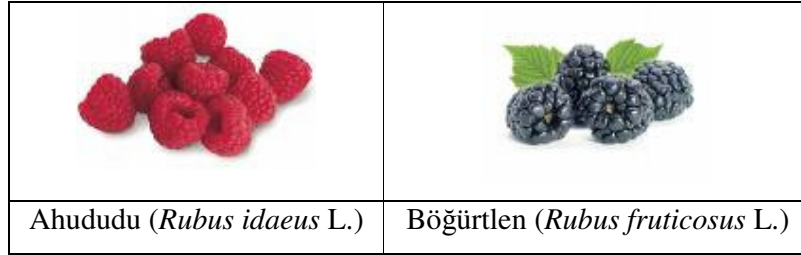
2.3. ÜZÜMSÜ MEYVELERİN TANIMI

Üzümsü meyveler denildiği zaman daha çok üzüm, (*Vitis*), çilek (*Fragaria*), ahududu ve böğürtlen (*Rubus*), frenk üzümü ve Bektaşi üzümü (*Ribes*), bataklık yaban mersini (*Vaccinium*), kuşburnu (*Rosa*) gibi türler akla gelmektedir. Üzümsü meyve tanımını tam olarak tarif etmek mümkün olmamaktadır. Çünkü bu gruba giren bütün cinsleri bir arada simgeleyen bir özellik bulunmamaktadır. Botanik anlamda üzümsü meyveler yarı çalimsı ya da çalimsı bitkilere sahip, yumuşak etli, sulu, çoğu kez küçük, yenebilen meyveleri olan bitkiler olarak tarif edilmektedir (Ağaoğlu 1986).

2.3.1. Ahududu ve Böğürtlen

Ahududu (*Rubus idaeus* L.) ve böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) meyveleri *Rosaceae* familyası *Rubus* cinsine aittirler. Ahududu yaz ve sonbahar mevsiminde kırmızı renkli ve tatlı meyveler veren bir bitki türüdür. Böğürtlen de çiçeklenme genellikle mayıs ayında başlayıp ağustos ayına kadar devam etmektedir. Ahududu ve

böğürtlen çoğu iklim koşullarında yetiştirilebilseler de, ılıman, nemli ve asitli topraklarda daha iyi gelişirler. Ülkemiz de ahududu ve böğürtlen türlerinin yetiştirilme sınırları içerisindedir. Ahududu ve böğürtlen Türkiye’de özellikle Karadeniz Bölgesi ve Bursa’da yetişmektedir.



Şekil 2.3.1.1. Ahududu ve böğürtlen meyveleri

Üzümsü meyveler grubunda yer alan ahududu ve böğürtlenler kendilerine özgü cezp edici renk ve tat aroması, yapısı ve kokusu ile tüketim yanında gıda endüstrisinde çok çeşitli kullanım alanları bulmaktadır. Yüksek oranda su ihtiva eden taşıma ve depolanmaya uzun süre dayanamayan ahududu ve böğürtlenlerin taze tüketimi her zaman mümkün değildir. Bu sebeple çok çeşitli şekillerde; taze tüketimi olmakla birlikte konserve, reçel, marmelât, pasta, dondurma, şeker, yoğurt, meyve suyu, likör gibi çeşitli şekillerde tüketilmektedir. Bu nedenle öteki meyveler arasında çok özel bir yere sahiptirler (Pehlivan ve Güteryüz 2000). Ayrıca ahududu ve böğürtlenler bünyelerinde bulundurdukları bazı pigmentler, fenoller, flavonlar, flavonoidler ve vitaminler ve liflerin diğer meyve türlerinden konsantrasyon bakımından çok yüksek oldukları belirtilmektedir.

2.3.2. Türkiye de Ahududu ve Böğürtlen Yetiştiriciliği

Üzümsü meyveler konusu ülkemiz için çok yenidir. Ancak son yıllarda gittikçe artan bir önem kazanmıştır. Üzümsü meyveler dünyada çok sevilen, çok tüketilen ve çeşitli şekillerde değerlendirilen meyve türleridir. Türkiye bu türlerin doğal yayılma alanı içinde bulunmakta, hemen bütün bölgelerde bir veya birkaç türe rastlanmaktadır (Ağaoğlu 1986, Onur ve ark. 1999). Her yıl düzenli ürün vermeleri ve

yetiştiriciliklerinin kolay olması nedeniyle tarım işletmelerinin değerli birer tamamlayıcı bitkileridirler. Meyve suyu yapımında, derin dondurulma ve konserve yapımında kullanılmaları; ev ve küçük bahçe işletmelerinde taze olarak satış imkanlarının da bulunması, bunun yanında büyük işletmelerde endüstriye yönelik büyük ölçüde yetiştirilebilmeleri bakımından çok önemli bir bitkiler grubunu oluşturmaktadırlar. Hasattan sonra saklanmaları diğer meyvelere oranla zor ve uzun müddet soğuk depolarda muhafazaları mümkün olmamakla beraber; endüstride büyük alıcı kesimine sahip olması nedeniyle pazarlanmalarında önemli sorunlar çıkmamaktadır. Alkollü içkiler, meyve suyu ve konserve fabrikaları, reçel, marmelat, jöle, şeker, pasta, dondurma, mısır gevrekleri ve kurutma endüstrileri ile meyveli yoğurt ve meyve çayı üreten işletmeler gibi birçok sanayi kuruluşuna hammadde vermektedirler.

Üzümsü meyveler iç ve dış ticaret açısından sürekli talep gören ve yüksek fiyatla satılabilen türlerdir (Onur 1996). Türkiye'de üzümsü meyvelerin yetiştiriciliği sosyo-ekonomik açıdan da çok önemlidir. Özellikle gelir düzeyi düşük ve çok göç veren Doğu Anadolu, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde yetiştirilebilirler. Üzümsü meyvelerin yetişmesi için optimum koşullara sahip ülkemizde çilek dışındaki üzümsü meyveler günümüzde henüz ekonomik bir düzeye erişememişlerdir.

Ülkemizde, çilek dışında üretim istatistikleri saptanan ikinci üzümsü meyve türü ahududu'dur. İlk defa 1995 yılında bu tür ile ilgili bilgiler toplanmış ve resmi kayıtlarına girmiştir. 1980'li yıllarda Bursa ve civarında ahududu fidanları ile küçük çapta başlayan üretim daha sonra yörenin ekolojik koşullarının olağanüstü olması nedeniyle hızlı bir artış göstermiştir. Şüphesiz bu hızlı artışta, yörede mevcut tarıma dayalı sanayinin gelişmiş olması ve dolayısı ile üretilen ürünün kolayca değerlendirilebilmesine olanak sağlaması da büyük rol oynamıştır. Yaklaşık 10-15 yıl önce ahududu ile başlayan üretim yaklaşık 1600 tona ulaşmıştır. Son yıllarda böğürtlen ile de kapama bahçeler kurulmaktadır. Elde edilen ürünün büyük bir çoğunluğu ihraç edilmektedir. Sadece Almanya'nın ahududu meyvesine olan talebi yılda ortalama 15.000 tondur. Avrupa' daki diğer tüketici ülkeler dikkate alındığında üzümsü meyvelerin büyük bir ihraç potansiyeli olduğu görülmektedir. Avrupa ülkelerinin el emeği gerektiren tarımsal faaliyetlerden

işçilik ücretlerinin pahalı olması nedeniyle giderek kaçındığı ve ihtiyaçlarını ihracat yoluyla karşılamak istediği düşünülürse ülkemizde üzüksü meyvelerin yetiştiriciliği ulusal ekonomimiz için büyük önem taşımaktadır (Kaplan ve ark. 1999). Dolayısıyla Türkiye uluslar arası ahududu ve böğürtlen pazarından pay alabilecek potansiyele sahiptir. İklim özellikleri ve meyvelerin hassasiyeti gereği önemli bir faktör olan pazara yakınlık en önemli avantajıdır.

Ahududu'nun 1995 yılından 2002 yılına kadar ülkemizdeki üretim alanı ve üretim miktarlarının değişimi Çizelge 2.3.2.1' de gösterilmiştir. İstatistiki rakamların incelenmesinden de görüleceği gibi, üretim alanlarında son yıllarda bir azalma dikkati çekmektedir. Başlangıçtaki yüksek değerler daha sonraki yıllarda sürekli bir azalış göstermiştir. Üretim miktarındaki değişim de aynı şekilde olmakla beraber verimde nispeten bir artış gözlenmiştir (Ağaoğlu 2003).

Çilek ve ahududu dışında kalan diğer üzüksü meyvelerin üretimi şu aşamada yok denecek kadar az olduğundan, resmi belgeler tarafından bir veri toplanamamıştır. Türkiye geneli üzüksü meyveler ihracat kayıtlarında çilek ve ahududu türleri dışında taze, dondurulmuş ve işlenmiş böğürtlen, frenk üzümü, beктаşi üzümü gibi türler bulunmaktadır. (Kaynak: <http://www.uzumsu.com>)

Çizelge 2.3.2.1. Ahududu üretimi ve alanlarının ülkemizde yıllara göre dağılımı ile verimliliğin değişimi

Yıl	Üretim (Ton)	Verim (1kg için değer)
1995	1.319	376,9
1996	1.969	545,4
1997	1.975	554,8
1998	1.700	507,5
1999	1.780	565,1
2000	1.800	571,4
2001	1.840	566,2
2002	1.850	569,2

KAYNAK:<http://www.uzumsu.com>.

Günümüzde tarıma dayalı sanayi ve özellikle gıda sanayiindeki büyük gelişmeler, üretilen her türlü meyve ve sebzenin değerlendirilmesine imkan sağlamaktadır. Bu nedenle, hasattan sonra saklanmaları güç olan meyve ve sebzelerin değerlendirilmesindeki bu gelişmeler, üzüksü meyvelerin de yetiştiriciliğinin gelişmesinde büyük bir güç olmuştur. Üzümsü meyvelerin gıda sanayiinde taze ve/veya dondurularak kullanımının çeşitlenmesi ve özellikle süt ürünleri endüstrisi, dondurma üreticileri, şekerleme ve pasta üreticileri açısından öneminin artması nedeniyle; üzüksü meyveler bu sektörde taze, püre edilmiş, şurup veya su olarak düzenli bir şekilde tüketilmektedir. Önde gelen şekerleme, pasta üreticileri günümüzde çok miktarda üzüksü meyve kullanmaktadırlar. Gelecekte, tüketicilerin hazır gıdalara ve kolaylığa olan talebinin artması ile birlikte hiç kuşkusuz ki üzüksü meyveler gıda sanayiinde daha çok kullanılacaktır (KAYNAK:<http://www.uzumsu.com>).

2.3.3. Üzümsü Meyvelerde Bulunan Fenolik Asitler ve Flavonoidler

Üzümsü meyveler özellikle flavonoid ve fenolik asitler içeriğiyle önemli fenolik madde kaynaklarıdır. Bir tür içindeki fenolik bileşiklerin çeşitliliği ve miktarı aynı tür içerisinde çeşitler arasındaki farklılıklarından (Amiot ve ark. 1995, Bilky ve Sapers 1986, Maas ve ark. 1991, Prior ve ark. 1998, Schuster ve Herrmann 1985) yetiştirme koşullarından (Dixon Paiva 1995, Macheix ve ark. 1990) yöntemsel farklılıklardan (Hertog ve ark. 1992a, Heinonen ve ark. 1998, Hollman ve Venema 1993) ve meyvelerin olgunluk durumundan (Amiot ve ark. 1995, Prior ve ark. 1998, Starke ve Herrmann 1976, Stöhr ve Herrmann 1975b) kaynaklanır.

Üzümsü meyvelerin temel fenolik bileşik grubunu antosiyaninler oluşturur. Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin içeriği yaban mersini, frenk üzümü, kıvılcık, çilek ve kırmızı ahududu meyvelerinde araştırılmıştır (Çizelge 1.3.3.1). Genellikle, üzüksü meyvelerde flavonoller flavan-3-oller den daha fazla miktarda bulunmaktadır.

Yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*) fenolik madde içeriği en zengin olan üzüksü meyvelerden biridir. Yaban mersini meyvesinin temel fenolik maddesi antosiyanindir ve meyve bileşiminin %75 den fazlasını oluşturmaktadır (Kähkönen ve

ark. 2001, Matta-Riihinen ve ark. 2004). Hidroksinnamik asit içeriğinin 113-231 mg klorojenik asit/100 g örnek, hidroksibenzoik asit içeriğinin 3-6 mg gallik asit/100 g örnek ve flavanol içeriğinin ise 54-130 mg rutin/100 g örnek değerinde olduğu belirtilmiştir. (Kähkönen ve ark. 2001).

Yüksek boylu yaban mersini (*Vaccinium corymbosum*) için toplam fenol değerinin 115-191 mg gallik asit/100 g taze ağırlık arasında (Taruscio ve ark. 2004) ve antosiyanin miktarının ortalama 100 mg/100 g taze ağırlık değerinde olduğu bildirilmiştir (Kalt ve ark. 2001). Alçak boylu yaban mersininin (*Vaccinium angustifolium*) yüksek boylu yaban mersini ile karşılaştırıldığında daha fazla miktarda toplam fenol içeriğine sahip olduğu (376 mg gallik asit/100 g örnek) bulunmuştur (Kalt ve ark. 2001). Ayrıca, klorojenik asidin yüksek boylu yaban mersini ve alçak boylu yaban mersini meyvelerinin temel fenolik asidi olduğu belirtilmiştir (Gao ve Mazza 1994, Schuster ve Herrmann 1985).

Yaban mersini meyvelerinin fenolik made içeriğini antosiyaninler (Hong ve Wrolstad 1990, Kähkönen ve ark. 2001), flavanollar (Taruscio ve ark. 2004), flavonollar (Yan ve ark. 2002), fenolik asitler (Zuo ve ark. 2002) ve proantosiyanidinler (Foo ve ark. 2000) oluşturmaktadır. Temel aromatik asitleri ise benzoik asit (470 mg/100 g taze örnek), *para*-kumarik asit (25 mg/100 g taze örnek), sinapik asit (21 mg/100 g taze örnek), kafeik asit (15 mg/100 g taze örnek), ferulik asit (9 mg/100 g taze örnek) ve vanilik asittir (9 mg/100 g taze örnek) (Zuo ve ark. 2002). Avrupa yaban mersinlerin flavanol içeriğinde 2,4-8,2 mg/100 g taze örnek kateşin ve 0,7-11,9 mg/100 g taze örnek epikateşin bulunmaktadır (Matta-Riihinen ve ark. 2004, Taruscio ve ark. 2004). Amerikan yaban mersinlerinde miktarsal olarak flavanol miktarı belirtilmemesine rağmen kateşin ve epikateşin tayin edilmiştir (Prior ve ark. 2001).

Frenk üzümü (*Ribes nigrum L.*) meyve suyu, reçel ve meyve yoğurdu üretimi için ticari olarak yetiştirilir (Shahidi ve Nacz 2004). Frenk üzümünde en fazla miktarda bulunan fenolik maddenin antosiyanin olduğu ve değerinin 156-319 mg siyanidin-glukozit/100g örnek aralığında olduğu belirtilmektedir (Moyer ve ark. 2002). Meyvenin temel antosiyaninleri siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinosit, delfinidin-3-glukozit

ve delfinidin-3-rutinosittir (Mazza ve Miniati 1993). Frenk üzümünde en fazla miktarda bulunan flavonol mirisetindir (8,9-24,5 mg/100 g taze örnek) ve bunu kuersetin (5,2-12,2 mg/100 g taze örnek) ve kamferol (0,9-2,3 mg/100 g taze örnek) izlemektedir (Mikkonen ve ark. 2001). Hidroksisinnamik asit türevleri 58-93 klorojenik asit/100 g kuru ağırlık ve hidroksibenzoik asit türevlerinin ise 6-12 mg gallik asit/100g kuru ağırlık olarak bulunmuştur (Kähkönen ve ark. 2001). Temel hidroksisinnamik asitlerinin kaferik asit, *para*-kumarik asit; hidroksibenzoik asitlerinin ellagik, gallik, *para*-hidroksibenzoik ve vanilik asit olduğu belirtilmiştir (Häkkinen ve ark. 1999a, Sellappan ve ark. 2002).

Çilek (*Fragaria spp.*) için temel fenolik maddeler antosiyaninler ve ellagitanninlerdir. Toplam fenol değeri gallik asit eşdeğeri 160 mg/100 g taze örnek olarak bulunmuştur (Sun ve ark. 2002). Kähkönen ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada kuru ağırlık olarak toplam fenol değerini ellagik asit eşdeğerinde 1600-2400 mg/100 g, antosiyanin değerini siyanidin-3-glukozit eşdeğerinde 184-232 mg/100 g ve ellagitannin değerini ellagik asit eşdeğerinde 81-184 mg/100 g olarak tayin etmişlerdir.

Böğürtlenin temel fenolik maddesini 75-225 mg siyanidin-3-glukozit/100 g taze örnek değeriyle antosiyaninler oluşturduğu bilinmektedir (Fan-Chiang ve Wrolstad 2005, Siriwoharn ve Wrolstad 2004). Temel antosiyanin siyanidin-3-glukozit olduğu ayrıca siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinosit ve siyanidin-3-ksilozil in malik asit esterlerinin de bulunduğu belirtilmiştir (Fan-Chiang ve Wrolstad 2005). Böğürtlenin (*Rubus sp.*) fenolik madde içeriğinin 383-844 mg gallik asit/100 g taze örnek değerinde olduğu belirtilmiştir (Fukumoto ve Mazza 2000, Moyer ve ark. 2002, Sellappan ve ark. 2002, Siriwoharn ve Wrolstad 2004). Yapılan çok sayıda çalışma böğürtlenin sinamik asitler: *para*-kumarik, kafeik, ferulik, klorojenik, ve kuinik asitler ve hidroksisinnamik asitlerin glukoz esterleri bulunur (Mosel ve Herrmann 1974, Schuster ve Herrmann 1985), antosiyaninler, flavonollar, flavanoller ve ellagitanninlerin bulunduğunu göstermektedir. Böğürtlen meyvelerinde temel ellagitannin Sanguinin H-6 dır (Clifford ve Scalbert 2000). Böğürtlen de bulunan başlıca flavonoller kuersetin ve kamferol glikozitleridir (Bilky ve Sapers 1986). Flavanoller ise glikoz değil serbest halde

bulunurlar. (-)-Epikateşin böğürtlenin temel flavanoludur ve ardından da (+)-kateşin gelir (Arts ve ark. 2000a, Mosel ve Herrmann 1974).

Ahududu (*Rubus idaeus*) meyvesinin fenolik madde miktarının kuru örneklerde 2390-2990 mg gallik asit/100 g (Kähkönen ve ark. 1999, 2001) ve taze örneklerde 193-359 mg gallik asit/100g olduğu bulunmuştur (Anttonen ve Karjalainen 2005). Ahududunun yüksek miktarda hidroksibenzoik (*para*-hidroksibenzoik protokatekuik, vanilik, gallik ve siringik asit), hidroksisinnamik (*para*-kumarik, kafeik ve ferulik asit) asitler (Rommel ve Wrolstad 1993b) ile flavonol (kuersetin, kamferol ve mirisetin) (Häkkinen ve ark. 1999b, Rommel ve Wrolstad 1993c) ve flavan-3-ol ((+)-kateşin ve (-)-epikateşin) (Rommel ve Wrolstad 1993b) içerdiği bilinmektedir Ayrıca, ellagik asidin ahududu meyvesinin temel fenolik maddesi olduğu ve meyve bileşiminin %88 nin ellagik asitten oluştuğu belirtilmiştir (Häkkinen ve ark. 1999a, Rommel ve Wrolstad 1993a).

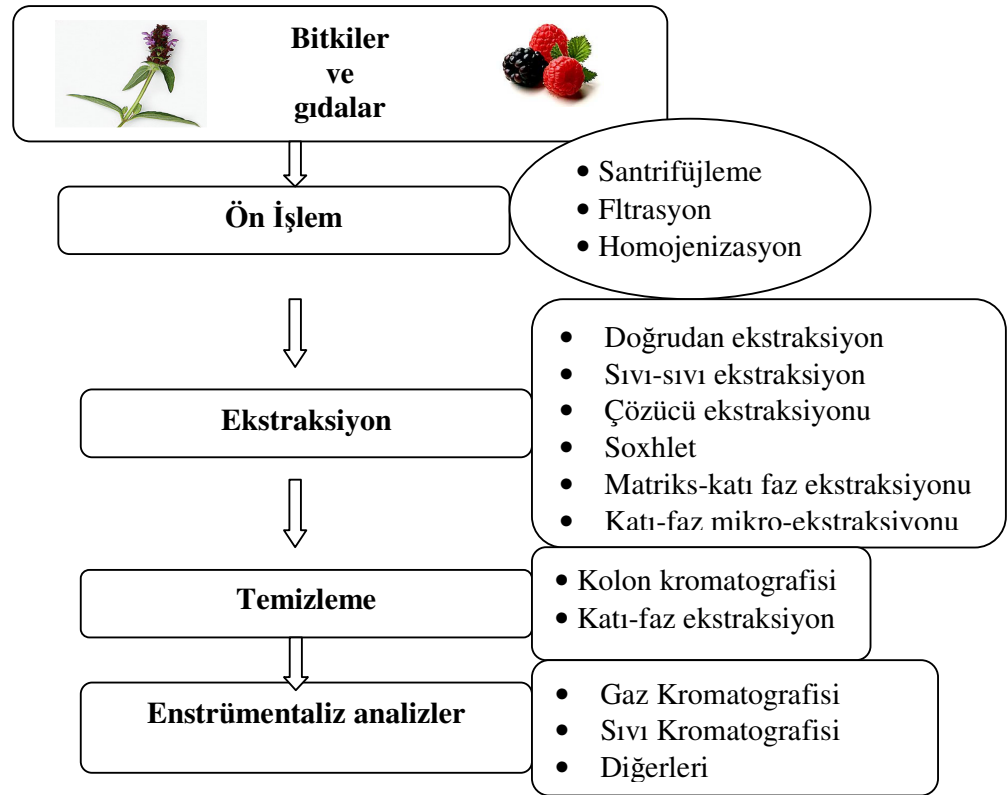
Çizelge 2.3.3.1. Bazı üzüksü meyvelerin flavonoid ve fenolik asit içerikleri (mg/kg kuru ağırlık)

Flavonoidler (mg/kg taze ağırlık)						
	Kamferol	Kuersetin	Mirisetin	Antosiyanin (Toplam)	Flavan-3-ol (Toplam)	
Mavi yemiş	0	24-160	9-69	626-4840	11-70	
Yaban mersini	0	32-37	0-37	2990	-	
Frenk üzümü	<0,1-10	33-68	41-55	2350	3-12	
Kırmızı kuş üzümü	0,1-2	2-27	<0,1	119-186	4-36	
Beyaz kuş üzümü	0,2-2	3-28	<1	-	4-13	
Kızılcık	0-3	104-250	11-249	577-1720	577-1720	
Bektaşi üzümü	0	<0,1	0	-	15-36	
Kırmızı yaban mersini	<1-5	34-210	0	322	-	
Kırmızı ahududu	<0,1	8-29	0	230-9950	32-480	
Çilek	5-12	6-8,6	-	786-3851	6-126	
Fenolik asitler (mg/kg taze ağırlık)						
	<i>para</i> -Kumarik asit	Kafeik asit	Ferulik asit	<i>para</i> -Hidroksibenzoik asit	Gallik asit	Ellagik asit
Mavi yemiş	6-20	1860-2090	13-14	5-6	3-7	-
Yaban mersini	-	-	-	-	-	-
Frenk üzümü	20-44	68-84	18-24	4-13	4-13	4-11
Kırmızı kuş üzümü	5-15	3-8	1-3	9-13	3-	-
Beyaz kuş üzümü	-	-	-	-	-	-
Kızılcık	42	-	-	-	-	120
Bektaşi üzümü	12-15	10-19	2-11	2	9-14	-
Kırmızı yaban mersini	-	-	-	-	-	-
Kırmızı ahududu	6-25	4-10	3-17	15-59	19-38	19-38
Çilek	7-27	<0,5-7	2	10-36	1-44	90-402

KAYNAK: Arts ve ark. 2000a, Bilyk ve Sapers 1986, Daniel ve ark. 1989, Heinonen ve ark. 1998, Herrmann 1992, Hertog ve ark. 1992a, Hertog ve ark. 1992b, Hollman ve Venema 1993, Justesen ve ark. 1998, Kumpulainen ve ark. 1999, Lees ve Francis 1972, Linko ve ark. 1983, Mosel ve Herrmann 1974, Prior ve ark. 1998, Øydvin 1974, Sapers ve ark. 1983b, Schuster ve Herrmann 1985, Starke ve Herrmann 1976, Stöhr ve Herrmann 1975a, Stöhr ve Herrmann 1975b, Torre ve Barrit 1977, Wang ve Lin 2000, Wildanger ve Herrmann 1973.

2.4. ANALİTİK METOTLAR

Günümüzde bitkilerde ve bitki kaynaklı gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin analizi için yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Harborne 1989, Harborne 1998, Lee ve Widmer 1996, Macheix ve ark. 1990, van Sumere ve ark. 1978, Waterman ve Mole 1994). Ham ya da işlenmiş gıdalardaki fenoliklerin analizi ekstraksiyon işlemi ile başlar (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.4.1. Bitkilerde ve gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin tayin yöntemleri

Ekstraksiyon işlemi gıdanın çeşidine, tayin edilmek istenen fenolik bileşiklere ve kullanılan analitik metoda bağlıdır (Lee ve Widmer 1996). Ekstraksiyon işleminde ilk basamak olan gıdanın ezilmesi, preslenmesi ya da öğütülmesi gıdanın yüzey alanını artırır ve böylece gıdanın ekstraksiyon çözeltisiyle daha iyi etkileşmesini sağlar (Waterman ve Mole 1994). 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.

2.4.1. Ekstraksiyon ve Hidroliz İşlemleri

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu kimyasal yapılarından, uygulanan ekstraksiyon metodundan, muhafaza süresi ve koşullarından ve girişim yapan maddelerin bulunmasına kadar pek çok faktörden etkilenir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler basit fenoller, fenolik asitler (hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler ve ligninleri olmak üzere oldukça geniş bir aralık içermektedir (Shahidi ve Nacz 2004). 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 sistemi içerisinde çözünebilir farklı fenolik sınıflar içermektedir. Ekstraksiyon işlemine ilave edilen basamaklarla tayin edilmek istenmeyen fenolikler, vakslar, yağlar ve terpenler gibi fenolik bileşik olmayan maddeler uzaklaştırılabilir. Aside dayalı katı faz ekstraksiyon tekniği ve fraksiyonlama işlemi istenmeyen bu maddelerin uzaklaştırılması için yaygın olarak kullanılır (Robbins 2003).

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. Metilalkol, etilalkol, aseton, su, etil asetat, az miktarda kullanılan propanol, dimetilformamid ve bunların birleşimleri fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılır (Antolovich ve ark. 2000). Ekstraksiyon süresinin 1 dakikadan (Price ve Butler 1977) 24 saate (Cork ve Krockenberger 1991, Maxson ve Rooney 1972) kadar değiştiği ve daha uzun ekstraksiyon süresinin çözücü sistemine indirgeyici reaktifler eklenmediğinde fenoliklerin oksidasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Khanna ve ark. 1968).

2.4.1.1. Fenolik asitler

Bitkilerde bulunan fenolik asitlerin ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan çözümler; etil asetat (Azar ve ark. 1987, Fernández de Simón ve ark 1990,1992), dietil eter (Fernández de Simón ve ark 1990,1992), metanol ya da sulu metanoldür (Kuninori ve Nishiyama 1986, McRae ve ark. 1990, Tomás-Lorente ve ark. 1992). Fenolik asitlerin analizi için β -glukosidaz (Kanes ve ark 1993) ve hidrosinnamoil-quinat esteraz (Goupy ve ark. 1990) enzimleri ile hidroliz yapılabilmektedir. Ancak fenolik asitlerin tayini için asidik ya da bazik hidroliz daha yaygın kullanılmaktadır (Lee ve Widmer 1996).

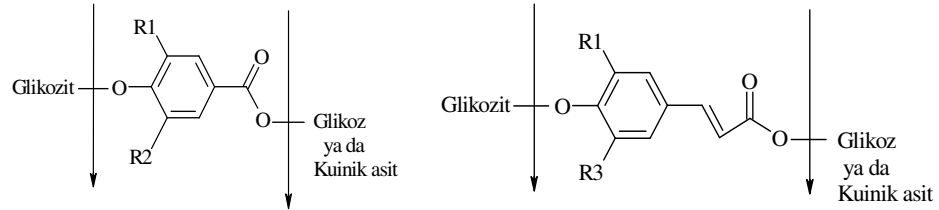
Asit hidrolizi örneğin HCl ile 2 saat ya da fazla sürede ısıtılmasıyla yapılmıştır (Kuninori ve Nishiyama 1986). Benzoik ve sinamik asit esterlerinin baz hidrolizi oda sıcaklığında 4-24 saat (Seo ve Morr 1984) ya da azot gazı ortamında 60 °C de 90 dakika NaOH ile muamele edilerek yapılmıştır (Kuninori ve Nishiyama 1986). Rommel ve Wrolstad (1993a) ahududu meyve suyunun fenolik bileşimini (ellagik asit, hidroksibenzoik asitler, hidroksisinnamik asitler, flavonollar ve flavan-3-oller) tayin etmek için örneğe asit (HCl) ve baz (NaOH) hidroliz uygulanmıştır. Meyve suyunun asit ve baz hidrolizinin benzer fenolik içeriğe sahip olduğu bulunmuştur. Hollman ve Venema (1993) üzümü meyvelerde (çilek, böğürtlen ve ahududu) bulunan ellagik asidin, farklı HCl ve sulu metanol miktarlarını birlikte kullanarak farklı hidroliz zamanlarında analizini yapmıştır. Ellagitanninlerin hidroliz özelliklerinin üzümü meyvelerde farklılık gösterdiğini optimum koşulların %72,5 sulu metanol içerisinde 3,5 M HCl 4-8 saat hidroliz ile sağlandığını belirtmiştir.

Krygier ve ark. (1982) oda sıcaklığında metanol-aseton-su (7:6:7, v/v/v) karışımlarını kullanarak yağ tohumundan serbest ve esterleşmiş fenolik asitleri ekstrakte etmişlerdir. Daha sonra da sulu fazda bulunan esterleşmiş fenolik bileşiklerin serbest hale geçmesi için ekstrakt azot gazı ortamında 4M NaOH ile muamele edilerek elde edilen bazik ekstrakt dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Alkali hidrolizin hidroksisinnamik asit türevlerinde önemli derecede kayıplara sebep olduğu belirtilmiştir (Krygier ve ark. 1982) Yapılan başka bir çalışmada ise bazik hidroliz esnasında ortama

eklenen askorbik asit (%1) ve etilendiamintetraasetik asidin (10 mM) fenolik asitlerin bozunmasını engellediği bulunmuştur (Nardini ve ark. 2002). Ayrıca fenolik bileşiklerin ekstraksiyon işlemi için farklı miktarda su içeren etanol, aseton ve kloroform çözücü karışımları da kullanılmaktadır (Antolovich ve ark. 2000).

Ligninler ve hidrokisisinnamik asitler hücre duvarı fenolikleri olarak bilinirler ve çeşitli hücre bileşenlerine bağlı olarak bulunurlar (Baucher ve ark. 1998, Wallace ve Fry 1994). Hücre duvarı fenoliklerinin ekstraksiyonu için ardışık alkali hidroliz metodu geliştirilmiştir (Hartley ve Morrison 1991, Rodriguez-Arcos ve ark. 2002). İlk olarak hücre duvarı materyali bitki dokusundan izole edilir ve daha sonra 0,1 M NaOH (1 saat, 25°C), 0,1 M NaOH (24 saat, 25°C), 1 M NaOH (24 saat, 25°C), ve 2 M NaOH (24 saat, 25°C) ile sırasıyla ekstrakte edilir. Her alkali ekstraktı pH<2 olacak şekilde HCl ile asitlendirilir ve serbest fenolik bileşikleri elde etmek için üç kez etil asetat ile ekstrakte edilir.

Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin asit ya da baz hidrolizle ekstrakte işlemlerinde miktar, süre ve sıcaklık gibi farklı uygulamaların yapıldığı görülmektedir. Genel olarak meyvelerden ya da diğer bitkilerden fenolik maddeler miktarsal değerlendirildiğinde ekstraksiyon ve hidroliz koşulları optimize edilmelidir (Lee ve Widmer 1996).

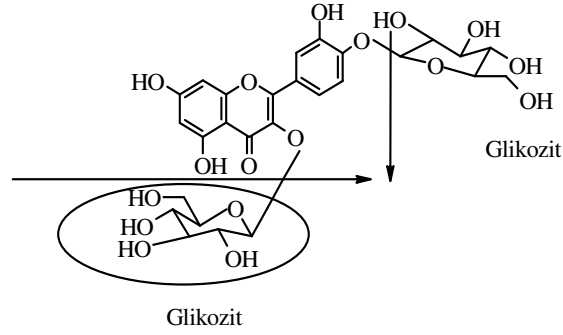


Şekil 2.4.1.1.1. Hidroksibenzoik ve hidrokisisinnamik asit glikozitleri ve esterlerinin yapısı

2.4.1.2. Flavonoidler

Bitki ve gıda örneklerinin flavonoid analizinde çözücü ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyon, sokslet ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu, katı-faz mikro-ekstraksiyonu ve matriks-katı faz ekstraksiyonu teknikleri kullanılmaktadır.

Flavonoidler bitkilerden genellikle metanol, etanol, su, aseton, dimetilformamit ya da bunların birleşimleri kullanılarak ekstrakte edilirler (Robards ve Antolovich 1997). Flavonoidlerin analizinde bazı durumlarda çözücülerin asitlendirilmesi gerekebilir (Hertog 1994, Robards ve Antolovich 1997). Flavonol glikozitlerin çoğunun referans maddeleri olmadığı için kantitatif analizlerini yapmak zordur. Yapılan çalışmalarda meyvelerde 30 dan fazla farklı flavonol glikozitin tayin edildiği belirtilmektedir (Macheix ve ark. 1990). Gıdalarda bulunan flavonolların miktar tayininde flavonol glikozitlerin aglikonlarına dönüştürülmesi pratik olarak önerilen bir metottur (Hertog 1994, Robards ve Antolovich 1997). Flavonoid aglikonların HCl ile asitlendirilmiş sulu metanol ekstraksiyon ve hidroliz yöntemi meyvelerin ve sebzelerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ewald ve ark. 1999, Justesen 1998). Yapılan bir çalışmada flavonoidler bitkiden %62,5 (v/v) su-metanol karışımı kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstrakt 6 M HCl ile 1:4 oranında asitlendirildikten sonra azot gazı ortamında 90°C de 2 saat tutulmasıyla flavonoid glikozitlerin hidrolizinin gerçekleştirildiği belirtilmiştir (Mattila ve ark. 2000). Glikozitlerin asit/alkali hidroliz hızları kullanılan asit/baz gücüne, şekerin yapısına ve şekerde bulunan flavonoid çekirdeğinin pozisyonuna bağlıdır.



Şekil 2.4.1.2.1. Flavonoid glikozitlerden kuersetin-3-4'-*O*-diglikositin hidroliz yapısı

Gıdalarda yapılan antosiyanin analizlerinde ise molekülün polar özellikte olması sebebiyle en yaygın kullanılan çözücülerin sulu etanol, metanol, aseton (Kähkönen ve ark. 2001) ya da bunların asitli çözeltileri olduğu belirtilmektedir (Amr ve Al-Tamimi 2007).

Diğer bir hidroliz tekniği olan enzimatik hidroliz, flavonoid *O*-glikozitlerinden monosakkaritlerin ayrılması için önerilen hızlı bir tekniktir. İnsan plazmasında bulunan flavonollerin β -gluronidaz ve sülfataz enzimleri kullanılarak enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiştir (Erlund ve ark. 1999).

Katı faz ekstraksiyon (SPE) yönteminde, genellikle alkil-bağlı silika ya da kopolimer sorbentler üzerine sulu örnekler ya da sulu ekstraktlar uygulanmaktadır. Sorbent C18 bağlı silika ve örnek çözeltilisi ve çözücüler asitlendirilerek flavonoidlerin iyonlaşması engellenir ve alıkonma zamanını yavaşlatılır. Yapılan bir çalışmada zeytinlerin metanol ekstraktları kullanılarak flavonoid analizleri yapılmıştır (Vinha ve ark. 2005).

Son zamanlarda moleküler kalıp polimerin (MIP) sorbent olarak kullanıldığı yeni bir SPE metodu geliştirilmiştir. Moleküler kalıp polimerler, genellikle hedef analite oldukça yüksek seçiciliktir ve ısıl kararlılığa sahiptir (Molinelli ve ark. 2002, Ramström ve ark. 2001). Kırmızı şarapta kuersetin tayininde moleküler kalıp polimer kullanılmıştır (Molinelli ve ark. 2002). Ancak, moleküler kalıp polimerler kuersetin için tamamen seçici olmadığı bulunmuştur. Kuersetinle yapısal ilişkisi olan morin ve (+)-kateşin gibi moleküllerde benzer sonuçlar vermektedir. moleküler kalıp polimer-katı faz ekstraksiyonun dezavantajı her uygulama için spesifik moleküler kalıp polimerler

yapılması gerektirir.

Matriks-katı faz dağılma ekstraksiyonu (MSPD), C18 ya da C8 bağlı silika katı destek içerisine homojen dağılmış örneklerden analitlerin ekstrakte edilmesini sağlar. Matriks-katı faz dağılma ekstraksiyonu genellikle meyve, sebze ve diğer gıda ürünlerinde pestisit tayini için kullanılmaktadır (Fernández ve ark. 2000, Kristenson ve ark. 2001). Ancak son zamanlarda bu yöntemle flavonoid analizlerinin yapıldığı belirtilmiştir (de Rijke ve ark. 2006).

Katı-faz mikro-ekstraksiyonu (SPME); erimiş-silika kaplanmış poliakrilit ya da polimetilsiloksanın durgun faz olarak kullanıldığı sistem sıvı ya da gaz örneklerden analitlerin ekstrakte edilmesi için kullanılır. SPME kolay ve organik çözücü tüketimi daha az olan bir tekniktir Katı-faz mikro-ekstraksiyonu ile sıvı kromatografisi (LC) ile birleştirilerek uçucu olmayan ve/veya polar bileşiklerin analizi (Pawliszyn 1999) için kullanılır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bu tekniğin flavonoidlerin analizinde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Kolon kromatografisi fenolik ekstraktların ayrılması için kullanılan diğer bir tekniktir. Kırmızı şaraptan antosiyanin türevi pigmentlerin ayrılması kolon kromatografisi tekniği kullanılarak yapılmıştır. Fractogel (Toyopearl) HW-40(s) jel kolonu (200mm×1.6, iç çap) su-etanol (%20, v/v) çözücü karışımı 0,8 ml/dk akış hızıyla geçirilmiş ve elde edilen elüentin malvidin-3-glukozit, malvidin-3-asetilglukozit ve malvidin-3-kumarilglukozitin içerdiği belirtilmiştir (Mateus ve ark. 2001).

2.4.2. Kromatografik Teknikler

Fenolik bileşiklerde bulunan farklı yapısal grupları tayin etmek için kullanılan metotların dayandığı temel ilkeler birbirinden farklıdır. Kromatografik teknikler fenolik bileşiklerin ayrılması ve kantitatif tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. GC fenolik asitlerin ve flavonoidlerin tayinlerinde kullanılan kromatografik tekniklerden biridir. Bitki ya da gıda örnekleri analize hazırlanma aşamasında glikoz ya da ester içeren fenolik bileşikler asit (Zadernowski 1987), baz (Krygier ve ark. 1982) ya da

enzim (Liggins ve Bluck 1998) hidrolizi ile serbest hale getirilir. Fenolik bileşikler gaz kromatografisi ile analizleri öncesinde metilleme (Kosuge ve Furuta 1970), trifloroasetilleme (Sweeley ve ark. 1963) ve trimetilsilil (Krygier ve ark.1982) gibi uçucu türevlerine dönüştürülürler. Ancak bu işlem esnasında fenolik bileşikler için uygun türevlendiricilerin seçilememesi yada yeterince türevlerine dönüştürmemesi GC ile tayinlerini kısıtlayabilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği ise fenolik bileşiklerin ayrılmasında ve miktar tayinlerinde son yıllarda en yaygın kullanılan tekniktir. Çeşitli durgun ve hareketli fazlar kullanılarak fenolik asitler ve flavonoidler (antosiyantinler, prosiyanidinler, flavononlar, flavonollar, flavan-3-oller, flavonlar) tayin edilir (Senter ve ark. 1989). Fenolik bileşiklerin farklı sınıflarının ayrılmasında ters faz kolonları oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda bulunan fenolik bileşiklerin tayininde genellikle UV-vis, fotodiodarray (DAD) ve UV-floresans detektörleri kullanılır (Arts ve ark. 2000a, Rodriguez-Arcos ve ark. 2002). Kullanılan diğer metotlar ise; elektrokimyasal koulometrik serili dedektör (EC) (Mattila ve ark. 2000) on-line bağlı DAD ve elektro serili dedektör (Mattila ve ark. 2000) ve fluometrik dedektördür (Arts ve Hollman 1998) Yüksek performanslı sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (HPLC-MS) fenolik bileşiklerin yapısal tayininde oldukça yaygın olarak kullanılır. Elektrosprey iyonlaşma kütle spektrometresi (ESIMS) meyvelerde bulunan fenolik bileşiklerin yapısal tayini ve metal ile kompleksleşen flavonoidlerin tayin edilmesini sağlamıştır. Kütle spektrumlarında metal-flavonoid komplekslerinin verdiği kütle spektrumu oldukça şiddetlidir ve ilgili flavonoidler daha kolay yorumlanır. Ayrıca, fenolik bileşiklerin hızlı atom bombardıman kütle spektrometresi (FABMS) (Edenharder ve ark. 2001) elektron impakt kütle spektrometresi (Edenharder ve ark. 2001) ve matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonlaşma kütle spektrometresi (MALDI-MS) (Wang ve Sporns 1999) ile de tayinleri yapılmıştır. Doğal antioksidan kaynağı olarak bilinen ahududu ve böğürtlen meyvelerinin de kalitatif ve kantitatif fenolik madde tayinlerinin HPLC teknikleri kullanılarak başarılı şekilde yapıldığı belirtilmiştir (de Ancos ve ark. 2000, Häkkinen ve Auriola, 1998, Häkkinen ve ark. 1999b, Häkkinen ve ark. 2000a, Hertog ve ark. 1992a, Määttä-Riihinen ve ark. 2004).

2.4.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitlerin kantitatif analizi için yapılan ince tabaka kromatografisi uygulamalarında durgun faz olarak selüloz ve silika tabakalar, mobil faz olarak hidrokarbon karışımları (toluen, diokzan ve benzen) ve polar organik modifierler olarak aseton, butanol, etanol ve asetik asit kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Agbor-Egbe ve Rickard 1990, Azar ve ark. 1987, Regnault-Roger ve ark. 1987). HPLC öncesi ince tabaka kromatografisi ile örnek ekstraktının taranması tayin edilen maddelerin durgun faz tarafından absorbe edilebilmesi ya da başarılı bir ayırım için uygun çözücü karışımları kullanılması avantaj sağlamaktadır (Fernández de Simón ve ark. 1992, Lee and Widmer 1996).

Bitkilerde ve meyvelerde bulunan fenolik asitlerin analizi için GC ve HPLC teknikleri kullanılmaktadır. Fenolik asitlerin tayinlerinde sıvı kromatografisi tekniklerinden terz-faz sıvı kromatografisi (RP-HPLC) tekniği daha çok tercih edilmektedir. HPLC tekniklerinde ikili gradient çözücüler olarak sulu asetik, formik ya da fosforik asit ve organik modifier ler olarak da metanol ya da asetonitril kullanılır. Mobil fazın pH'ı ve iyonik şiddeti, protonlama ve çözünmeye bağlı olarak fenolik bileşiklerin alıkonmalarını etkilemektedir (Marko-Varga ve Barcelo 1992). Örneğin iyonlaşmasını arttırılabilmek için yapılan pH değişimleri sonucu ters-faz ayırımında alıkonma süresi azalır. Bu nedenle; fenolik ve karboksilik asitlerin iyonlaşmasını baskılamak ve çözünürlüğü arttırmak için asetik asit (%2-5), formik, fosforik ve trifloroasetik asit (%0,1) mobil faza eklenir. Çizelge 2.4.2.1.1' de fenolik asitlerin HPLC ile yapılan bazı analizleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.4.2.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile meyvelerde bulunan hidroksibenzoik, hidroksisinnamik asitler ve ellagik asit analizleri

Fenolik bileşikler	Meyve	Kolon	Çözücü sistemi	Dedektör	Kaynak
Hidroksisinnamik asitler	Elma, kayısı, şeftali, armut, erik ve tatlı kiraz	250×4mm LiChrosorb RP-18	%2 sulu asetik asit ve metanol	UV 320 nm	Möller ve Herrmann 1983
Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitler	Yaban mersini meyve suyu	250×4mm LiChrosorb C18	%2 sulu asetik asit ve %2 asetik asit/su/asetonitril (2:68:30, v/v/v) çözücü karışımları	UV 280 nm	Azar ve ark. 1987
Ellagik asit	Yaban mersini, böğürtlen, ahududu, çilek	250 × 4.6 mm Alltech C18 RP	30mM amonyumdihidrojen fosfat/metanol (50:50,v/v) çözücü karışımı ve 10mM amonyum dihidrojen fosfat	UV 254 nm	Daniel ve ark. 1989
Hidroksisinnamik asitler	Portakal, greyfurt	LiChrospher 100-RP-18	%1.5 sulu asetik asit/metanol (77:23, v/v) çözücü karışımı	UV 300 nm	Peleg ve ark.1991
Hidroksisinnamik asitler	Elma ve elma suyu	250×4.6mm Spherisorb ODS2	%0,2 suda hazırlanmış HCl (1M) ve %0,2 metanolde hazırlanmış HCl (1M)	UV 260, 310 nm	Delage ve ark. 1991
Hidroksisinnamik asitler	Kayısı, şeftali, erik, çilek	LiChroCART 100-RP-18	Su/formik asit (95:5, v/v) ve metanol	UV 280, 350 nm	Tomás-Lorente ve ark. 1992.
Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitler	Meyve suları: elma, kayısı, üzüm, portakal, şeftali, armut	300×3.9mm Novapak C18	%2 sulu asetik asit ve su/metanol/asetik asit(68:30:2, v/v/v) çözücü karışımları	Foto-diod serili dedektör 280, 240 nm	Fernández de Simón ve ark. 1992

Çizelge 2.4.2.1.1' in devamı

Hidroksinnamik asitler	Portakal suyu	Bondasil C18	Tetrahidrofuran/asetonitril/ %2 sulu asetik asit (12:5:83, v/v/v) ve tetrahidrofuran/ %2 sulu asetik asit (35:65, v/v)	UV 280, 324 nm Floresans	Roussef ve ark.1992
Hidroksinnamik asitler	Elma suyu	LiChrospher 100-RP-18	%0,5 sulu asetik asit ve metanol	Foto-diod serili dedektör	Cliffe ve ark. 1994
Hidroksinnamik ve hidroksibenzoik asitler ve ellagik asit	Kırmızı ahududu meyve suyu	250×4.6mm Spherisorb ODS-1	%1 sulu asetik asit ve asetonitril	Foto-diod serili dedektör 260, 280, 320, 360 nm	Rommel ve Wrolstad 1993a
Ellagik asit	Böğürtlen, kırmızı ahududu, çilek	Novapak C18	Metanol/0,025 M potasyum hidrojen fosfat, pH 2.4 (40:60, v/v) çözücü karışımı	Floresans	Hollman ve Venema 1993
Hidroksinnamik ve hidroksibenzoik asitler	Böğürtlen, yaban mersini, kırmızı ahududu, çilek, tatlı kiraz	150×3.6mm Novapak C18	50 mM dihidrojen amonyum fosfat (pH 2.6), %2 50 mM dihidrojen amonyum fosfat (pH 2.6) ile % 80 asetonitril, 0,2 M ortofosforik asit (pH 1.5)	Foto-diod serili dedektör 280, 316 nm	Heinonen ve ark. 1998

2.4.2.2. Flavonoidler

Flavonoidlerin analizinde incetabaka kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, kapiler elektroforez ve sıvı kromatografisi yaygın olarak kullanılan tekniklerdir.

1950'li ve 1960'lı yıllarda flavonoidlerin analizi için kâğıt kromatografisi metotları geliştirilmiştir (Markham 1982, Merken ve Beecher 2000, Robards ve Antolowich 1997). Ancak 1970 li yıllarda kağıt kromatografisi yerini, pek çok bileşiğin aynı anda analizi için ucuz ve kullanışlı teknik olan ince tabaka kromatografisine bırakmıştır (Harborne 1998, Robards ve Antolowich 1997). Bu tekniklerde analiz edilecek flavonoid ve flavonoid sınıflarına göre uygun durgun faz ve çözücü seçimi değişmektedir. Flavonollar gibi hidrofilik flavonoidler poliamid ve mikrokristal selüloz durgun faz kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile ayrılmışlardır (Robards ve Antolowich 1997, Wildanger ve Herrmann 1973). İnce tabaka kromatografisi günümüzde halen meyvelerde bulunan flavonoid sınıflarının tayininde ucuz ve hızlı tarama metodu olarak kullanılmaktadır (Lee and Widmer 1996).

HPLC flavonoidlerin analizinde de oldukça yaygın kullanılan bir tekniktir (Harborne 1988, Robards ve Antolowich 1997). Ayrıca bitki ve gıda ekstraktlarından flavonoidlerin tayin edilmesi bu tekniğe yeni bir boyut kazanmıştır. HPLC tekniği;

- Diğer kromatografik tekniklerle karşılaştırıldığında flavonoid karışımların çözünürlüğü artırılması ve daha iyi ayırma gücüne sahip olması
- Tek analiz ile hem kalitatif hem de kantitatif tayin yapılabilmesi (Harborne 1988, Markham 1989) gibi bazı avantajlara sahiptir.

Yapılan çalışmalarda normal-faz kromatografisinin flavonoidlerin (flavon, flavonol, flavanon aglikon) ayrılmasında kullandığı belirtilmiştir (Galensa ve Herrmann 1980). Flavonoid asetatları LiChrosorb Si60 kullanılarak benzen-asetonitril, benzen-etanol ve izooktan-etanol-asetonitril çözücü karışımları ile izokritik olarak 312 ve 270 nm de tayin edilmişlerdir. Flavonoidlerin LC ile analizlerinde genellikle ters-faz kromatografisi tercih edilir ve durgun faz olarak C₈ ve C₁₈ kolonu kullanılmaktadır

(Çizelge 1.4.2.2.1). Silika, Sephadex ve poliamid de kullanılan diğer durgun fazlardır. Gradient elüsyon programının kullanıldığı ikili çözücücü sistemlerinde su içeren aseton ya da format tamponu ile organik modifier olarak metanol ya da asetonitril kullanılır. Flavonoidlerin ve diğer fenolik bileşiklerin ayrılmasını sağlamak için mobil faz içine küçük miktarlarda da olsa asetik asit, formik asit ve fosfat tamponları katılmaktadır (Lamuela-Raventós ve Waterhouse 1994, Merken ve Beecher 2000). Sıvı kromatografisi ile genellikle oda sıcaklığında çalışılır. Çizelge 2.4.2.2.1’de meyvelerde bulunan flavonoidlerin HPLC ile yapılan bazı analizleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.4.2.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile meyvelerde bulunan flavonoller ve diğer flavonoid gruplarının analizleri

Flavonoidler	Meyve	Kolon	Çözücü sistemi	Dedektör	Kaynak
Flavonoller	Yaban mersini, böğürtlen	300 × 3.9 mm µBondapak C18	Su/asetik asit/metanol (42:8:50, v/v/v)	UV 280 nm	Bilky ve Spares 1986
Flavonoller, flavan-3-oller	Elma	Novapak C18	Sulu trifloroasetik asit, asetonitril	UV 270 nm	McRae ve ark. 1990
Flavonoller- flavan-3-oller	Meyve suları: elma, kayısı, üzüm, portakal, şeftali, armut, ananas	300 × 3.9 mm Novapak C18	%2 sulu asetik asit ve su/metanol/asetik asit (68:30:2) çözücü karışımı	Foto-diod serili dedektör 254 nm	Fernández de Simón ve ark. 1992
Flavonoller, flavan-3-oller	Çilek, kayısı, şeftali, erik	125 × 4 mm LiChroCART C18	Sulu formik asit ve metanol	Foto-diod serili dedektör 280, 350 nm	Tomás-Lorente ve ark. 1992
Flavonoller, flavonlar	Elma, armut, üzüm, şeftali, armut, erik, frenk üzümü, çilek, kiraz	Novapak C18	Asetonitril/fosfat tamponu (24:75, v/v, pH 2.4)	Foto-diod serili dedektör 370 nm	Hertog ve ark. 1992b
Flavonoller	Kırmızı ahududu (meyve suyu)	250 × 4.6 mm Spherisorb ODS-1	%1 sulu asetik asit ve asetonitril	Foto-diod serili dedektör 360 nm	Rommel ve Wrolstad 1993b
Flavonoller, flavan-3-oller	Elma	220 × 4.6 mm Aquapore C18	Sulu setik asit, asetonitril	UV 350 nm	Lister ve ark. 1994
Flavonoller, flavan-3-oller	Armut	150 × 4.6 mm Adsorbosphere C18	Su (fosfat tamponu, pH 2.6) ve asetonitril/metanol/su (1:3:1, v/v/v) çözücü karışımı	Foto-diod serili dedektör 280, 360 nm	Amiot ve ark. 1995

Flavonoller, flavan-3-oller	Elma, şeftali (meyve konsantresi ve püresi)	300 × 3.9 mm Novapak C18	Su/asetik asit (78:2, v/v) çözümü karışımı ve su/asetonitril/asetik asit (78:20:2, v/v/v) çözücü karışımı	Foto-diod serili dedektör	Bencoechea ve ark. 1997
Flavonoller, flavonlar, Flavan-3-oller	Elma, kayısı, frenk üzümü, yaban mersini, greyluft, üzüm, limon, portakal, kırmızı ahududu	250 × 4.6 mm Phenomenex C18	%1 formik asitle hazırlanmış su/metanol (30:70, v/v) çözücü karışımı ve metanol	Foto-diod serili dedektör 290, 365 nm ve atmosferik basınç iyonlaşma-kütle spektrometre	Justesen ve ark.1998
Flavonollar, flavan-3-oller, antosiyeninler	Böğürtlen, yaban mersini kırmızı ahududu, çilek, kiraz	150 × 3.6 mm Novapak C18	50 mM dihidrojen amonyum fosfat (pH 2.6), asetonitril, 0.2 M ortofosforik asit (pH 1.5)	Foto-diod serili dedektör 365, 520 nm	Heinonen ve ark. 1998
Flavonoller	Elma	250 × 4.6 mm Phenomenex C18	Su/tetrahidrofuran/trifloroasetik asit (98:2:0.1, v/v/v) çözücü karışımı ve asetonitril	Foto-diod serili dedektör 370 nm	Price ve ark. 1999

2.4.3. Flavonoidler ve Fenolik Asitlerin Belirlenmesi ve Tayini

HPLC-MS, uçucu olmayan fenolik bileşiklerin yapısal analizleri için kullanılan hızlı ve güvenilir bir metottur. Bu metotta iyonlaşma basamağında önce sıvı mobil fazın ortamdan uzaklaştırılması için arayüzey sistemleri geliştirilmiştir (Careri ve ark. 1998). Yapılan pek çok çalışmada standart ve referans maddelerin yardımıyla örnekte bulunan flavonoidlerin tayini için MS ve UV dedektörlerin birlikte kullanıldığını görülmektedir. Standartı olmayan bilinmeyen maddelerin analizi için ikili kütle spektrometreleri (MS/MS veya MSⁿ) kullanılmaktadır. Flavonoidlerin sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS) analizlerinde yaygın olarak kullanılan iyonlaştırma teknikleri atmosfer basınçlı iyonlaştırma (APCI) ve elektrosprey iyonlaştırma (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, kararsız ve oldukça polar olan bileşiklerin tayinlerinde oldukça kolaylık sağlar (Careri ve ark. 1998, Robards ve Antolowich 1997). Yapılan birçok çalışmada hem APCI hem de ESI da en iyi duyarlılığın negatif iyonlaşmayla sağlandığı belirtilmiştir. Ancak APCI ve ESI pozitif modunun kullanılması da yaygındır. Diglikozil flavonoidlerin glikozidik bağları pozitif iyon hızlı iyon bombardımanı MS ve birleşik MS sistemleri kullanılarak tayin edilmiştir (Li ve Claeys 1994). Yapılan bir çalışmada çayda bulunan flavonoidler HPLC-ESI-MS ile tayin edilmiştir (Poon 1998). Ayrıca meyvelerde ve sebzelerde bulunan flavonoidlerin tayinlerinde atmosferik basınç iyonlaşma-kütle spektrometre (API-MS) teknikleri de yaygın olarak kullanılmaktadır (Justesen ve ark. 1998). Ayrıca flavonoidlerin analizinde APCI ve ESI dışında elektron iyonlaştırma (EI) (Harborne 1989), kimyasal iyonlaştırma (CI) (Barbuch ve ark. 1989), hızlı atom bombardımanı (FAB) (Ma ve ark. 2000) ve matris yardımcı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI) (Wang ve Sporns 1999) teknikleri de kullanılmaktadır.

2.4.4. Spektroskopik Teknikler

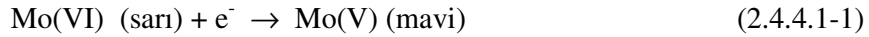
Bitkilerin ve çeşitli gıda ürünlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit ve çeşitli metotlarla antioksidan aktivite tayinleri yaygın olarak spektrofotometrik metotlar kullanılarak yapılmaktadır.

2.4.4.1. Toplam Fenol Tayini

Bitki ve gıda matrislerinin spektrofotometrik toplam fenol tayinlerinde Folin-Ciocalteu metodu en yaygın kullanılan metottur.

Orijinal Folin-Ciocalteu metodu 1927 yılında kimyasal reaktifler kullanılarak tirozin analizi için geliştirilmiştir. Daha sonra 1965 yılında Singleton ve Rossi tarafından molibdotungstosforik heteropolianyon reaktifi kullanılarak fenol tayini için modifiye edilmiştir. Folin-Ciocalteu metodu polimerizasyon derecesinden bağımsız duyarlı ve kantitatif bir metottur.

Folin-Ciocalteu reaktifi heteropolifosfotungtat-molibdat içeren bir oksidasyon belirteçidir. En son oluşan mavi ürün, $P_2W_{18}O_{62}^{7-}$ 'den $H_4P_2W_{18}O_{62}^{8-}$ kadar olan tungstat serisindeki 1, 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri ile $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ 'den $H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ kadar olan molibdat serisindeki 2, 4 ve 6 elektronlu reaksiyon ürünleri karışımından oluşur. Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenol tayininde, tersinir 1-veya 2-elektron indirgeme reaksiyon basamakları, heteropoli $(PMoW_{11}O_{40})^{4-}$ reaktifinden mavi türlerin oluşumuna neden olur. Kompleksteki molibdenin indirgenmesi daha kolaydır ve elektron transfer reaksiyonu indirgenler ve Mo(VI) arasında gerçekleşir:



Orijinal Folin reaktifi daha sonra bir molibdofosfotungstat heteropolianyon reaktifi ile yer değiştirmiş



ve fenoliklere daha fazla seçimli kılınmıştır; $\lambda_{\text{max}}=765 \text{ nm}$ (Apak ve ark. 2007).

Folin-Ciocalteu metodu ile toplam fenol tayininde daha doğru sonuca elde edebilmek için

- Alkali ve Folin-Ciocalteu reaktifi uygun hacimlerde çalışılmalıdır.
- Renk oluşumu için en uygun reaksiyon zamanı ve sıcaklığı belirlenmelidir
- Referans standart fenolik madde olarak gallik asit kullanılmalıdır.

Bu metodun sahip olduğu avantajları yanında fenolik olmayan organik maddelerle (şekerler, aromatik aminler, askorbik asit, adenin, adenozin, aminobenzoik asit, EDTA, fruktoz, guanin, indol, proteinler vb.) ve bazı inorganik maddelerle (hidrazin, demir amonyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum nitrat, sodyum sülfat, sodyum nitrat vb) reaksiyon verebilmesi ile dezavantaja sahiptir (Prior ve ark. 2005).

Bu metot ahududu ve böğürtlen meyvelerin toplam fenol tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Amakura ve ark. 2000, de Ancos ve ark. 2000, Pantelidis ve ark. 2007).

2.4.4.2. Toplam Flavonoid Tayini

Bitki ve gıdaların spektrofotometrik toplam flavonoid tayinlerinde Zhishen ve ark. (1999) tarafından geliştirilen metot yaygın olarak kullanılmaktadır. Ahududu ve böğürtlen meyvelerinin spektrofotometrik toplam flavonoid tayinlerde kullanılmış birkaç çalışma bulunmaktadır (Liu ve ark. 2002).

2.4.4.3. Toplam Antosiyanin Tayini

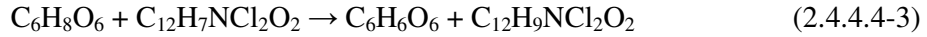
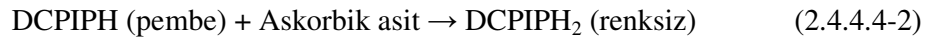
Bitkilerde ve gıdalarda toplam antosiyanin tayini pH farkı metodu kullanılarak spektrofotometrik olarak yapılır (Giusti ve Wrolstad 2001). Uygulanan metotta potasyum klorür çözeltisi ve sodyum asetat tamponu kullanılarak antosiyanin pigmentlerinin pH değeriyle değişen renk ve şiddetlerine göre absorbans 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.

Ahududu ve böğürtlen meyvelerinin yüksek düzeyde antosiyanin içerdiği bilindiğinden bu metot yaygın olarak kullanılmaktadır (Benvenuti ve ark. 2004, Pantelidis ve ark. 2007, Siriwoharn ve ark. 2004).

2.4.4.5. Askorbik Asit Tayini

Bu metodun prensibi, deney numunesinden askorbik asidin okzalik asit çözeltisi veya metafosforik asit-asetik asit çözeltisi ile ekstrakte edilmesi, 2,6-diklorofenolindofenol (DCPIP) boya maddesinin çözeltideki askorbik asitle kantitatif olarak indirgenmesi, boya maddesi fazlasının ksilenle ekstraksiyonu ve 500 nm dalga boyunda spektrometrik ölçümle fazlalığın tayini esasına dayanır (TS 6397).



2.4.4.5. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

Antioksidanlar, yükseltgenebilen bir substrata (örneğin; lipid, protein, DNA vb.) göre düşük konsantrasyonlarda bulunduğu dahi o substratın oksidasyonunu geciktirebilen ya da engelleyebilen maddelerdir. Geleneksel olarak antioksidanları iki sınıfa ayrılabilir: birincil veya zincir-kırıcı antioksidanlar ve ikincil veya koruyucu antioksidanlar. Zincir kırma reaksiyonları bir lipit radikaliyle (*L*) reaksiyon sonucu radikal başlatımı ya da peroksil (*LOO*[•]) veya alkoksil (*LO*[•]) radikalleriyle reaksiyon sonucu radikal ilerlemesi basamaklarını engellenmiş olur.

Zincir kırılma mekanizması:



Diğer taraftan, ikincil (koruyucu) antioksidanlar lipid vb. substratların oksidasyon hızını yavaşlatırlar. Örneğin, metal kelatlayıcılar Fe(II)'i bağlayarak hidroksil radikalleri oluşturan Fenton tipi reaksiyonları engelleyebilir:



Antioksidanların çok ve çeşitli oluşu (glikozitleri ve izomerlerinin görece fazla oluşu) bunların sebze-meyve matrikslerinden ayrılmalarını ve bireysel kantitatif tayinlerini güçleştirir. Ayrıca antioksidanların eşgüdüm içinde davranarak birbirlerinin etkisini arttırmaları da söz konusudur. Bu nedenle, toplam antioksidan düzeyini doğrudan bitkisel ekstraktlarda ve biyolojik sıvılarda ölçebilecek güvenilir yöntemlere ihtiyaç vardır.

Antioksidan tayinlerinde reaksiyon türüne göre sınıflandırma (Apak ve ark. 2007).

- Elektron transferine dayanan yöntemler
- Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

Hidrojen atomu transferine dayalı tayinlerin büyük bölümü 'yarışmalı reaksiyon kinetiği'ne dayalıdır. Burada antioksidan ve substrat, azo bileşiklerinin ısıl bozunmasından üretilmiş olan peroksil radikalleri ($ROO\cdot$) için yarışlırlar:



Antioksidan (AH)'ın tüketimi pahasına lipid (LH) oksidasyonu engellenir.

Elektron transferine dayanan yöntemler, indirgendiğinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi yardımıyla antioksidanların kapasitesini ölçerler. Bu olay bir absorbans artışı veya azalışı şeklinde olabilir. Renk değişiminin derecesi, başlangıç örneğindeki toplam antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir. Gerçekte hidrojen atomu

transferi ve elektron transferi esaslı reaksiyonlar bir anlamda iç içedir ve aralarında aşılmaz sınırlar yoktur (Apak ve ark. 2007)

Elektron transfer esaslı başlıca yöntemler: Folin, ABTS, DPPH ve CUPRAC yöntemleridir. Bir örneğin indirgeme kapasitesi onun radikal süpürme yeteneği ile doğrudan ilişkili olmamakla beraber, bu antioksidanlar için çok önemli bir parametredir (Apak ve ark. 2008).

2.4.4.5.1. ABTS Metodu

Bitki ve gıdaların toplam antioksidan aktivite ölçümleri için kullanılan ABTS yöntemi (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon sonucu oluşan mavi/yeşil renkli ABTS radikal katyonunun (Wolfenden ve Willson 1982) spektrofotometrik ölçüm temeline dayanır (Miller ve ark. 1996, Rice-Evans ve ark. 1996). Bu radikal katyon 645 (Miller ve ark. 1993), 734 (Miller ve Rice-Evans 1994) ve 815 nm'de (Miller ve ark. 1996) maksimum absorbanza sahiptir.

Hazırlanan ABTS radikal katyonunun miktarı üzerine eklenen antioksidan konsantrasyonuna ve reaksiyon süresine bağlı olarak azalma gösterir. Reaksiyon sonunda ABTS radikal katyonunun % inhibisyon değeri, standart olarak kullanılan troloks eşdeğerinde hesaplanan konsantrasyon ve zamanın fonksiyonu olarak tayin edilir.

ABTS radikal katyonu sulu ya da organik ortamda enzimatik ya da kimyasal reaksiyonla oluşturulabilir. ABTS metodu lipofilik ve hidrofilik antioksidanların aktivite ölçümü yapılabilir. Bu metodun uygulanabilirliği kolay ve hızlıdır (Prior ve ark. 2005, Wojdylo ve ark. 2007).

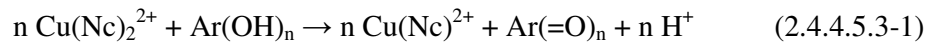
2.4.4.5.2. DPPH Metodu

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali 1958 yılında Blois tarafından bulunmuştur ve antioksidan aktivite ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan kararlı bir radikaldir. Alkol ortamında pembe renkte olan bu radikal 517 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. DPPH radikalının tek elektronu hidrojen verici olan antioksidan maddelerle reaksiyon vererek çiftleştirilir ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazine (DPPHH) indirgenir. Bu reaksiyon sonunda yakalanan elektron sayısına karşılık pembeden sarıya renk değişimi olur (Blois 1958) ve absorbans düşer. Bileşiklerin antioksidan aktivite ölçümleri de bu absorbans azalmasına dayanılarak yapılır.

DPPH radikali herhangi bir özel hazırlama gerektirmez ve sadece organik çözücülerde çözünür. Işıktan, oksijenden ve reaksiyon ortamının pH değerinden etkilenir (Sharma ve Bhat 2009) DPPH metodu ile polar ve az polar maddelerin aktivite tayini yapılabilir. Ayrıca fenolik maddelerin sahip oldukları hidroksil grubu sayısı ile DPPH aktiviteleri arasında pozitif korrelasyon olduğu belirtilmektedir (Sroka ve Cisowski 2003). DPPH metodu basit, pahalı reaktiflere ihtiyaç olmadığından kolay, reaksiyon süresinin 30 dk olmasıyla hızlı ve tekrarlanabilir bir metottur.

2.4.4.5.3. CUPRAC Metodu

Bakır iyonu indirgeme kapasitesi (CUPRAC) yöntemi bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini olarak tanımlanır. Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Neokuproine reaktifi, antioksidanlarla (Ar(OH)_n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir (Apak ve ark. 2008).



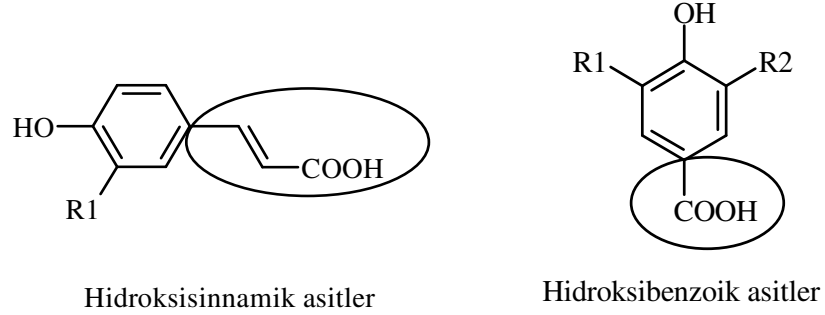
CUPRAC metodunun diğer antioksidan aktivite tayin yöntemlerine üstünlükleri olduğu belirtilmiştir (Güçlü ve ark. 2006):

- Yöntem, hızlı, basit ve kullanışlıdır; radikal kromojen reaktiflerin pahalılık, güç temin edilebilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmıştır.
- Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğundan, gıda maddelerinde bolca bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidantları yükseltger ve reaksiyonun ürünü Cu(I)-neokuproin kelatının 450 nm' deki absorbanı okunarak sonuç verilir.
- Bazı yöntemlerinin duyarsız kaldığı (-SH) tipi antioksidantlara çabuk ve net sonuçlara ulaşılır.
- Bazı yöntemler asidik ortamda çalışırken, CUPRAC, fizyolojik pH' lara yakın olan pH 7 ortamında yürütülür; dolayısıyla fizyolojik koşulları yansıtmaya şansı daha fazladır.
- CUPRAC yönteminde bir karışımı oluşturan çeşitli bileşenlerden gelen absorbanlar toplamsal olduğundan yöntemin doğrusalılığı ve tekrarlanabildiği çok iyidir.
- Uygun çözücü sistemiyle hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir.

2.4.5. Kimyasal Yapının Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

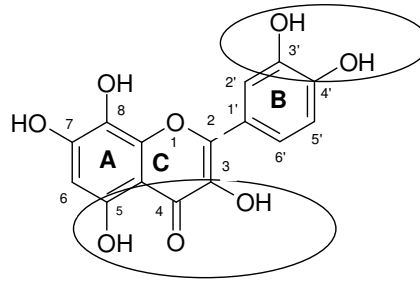
Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin antioksidan aktiviteleri aromatik halkaya bağlanan hidroksil grubu sayısına ve hidroksil gruplarının pozisyonuna göre değişiklik göstermektedir (Cuvelier ve ark. 1992, Sroka ve Cisowski 2003). Sinamik asit türevlerinin antioksidan aktivitelerinin benzoik asit türevlerinden daha fazla olduğu belirtilmiştir ve bu durum sinamik asitlerin propenoik asit (-CH=CH-COOH) kısmının benzoik asitlerin karboksil gruplarından (-COOH) daha fazla antioksidan etkiye sahip olmasıyla açıklanmıştır (Cuvelier ve ark. 1992). Ayrıca fenolik bileşiklerin *orto* ya da *para* pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının hidrojen atomlarını serbest radikallere daha kolay vermesi (de Heer ve ark. 1999) ve birbirleriyle etkileşimde olmaları antioksidan aktivite üzerinde *meta* pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına göre daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (Sroka ve Cisowski 2003) (Şekil 1.4.5.1). Yapılan çalışmalarda benzoik ve sinamik asit türevlerinin, flavonolların ve antosiyanidinlerin

aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu sayısı arttıkça antioksidan aktivitelerinin arttığını göstermektedir (Fukumoto ve Mazza 2000).



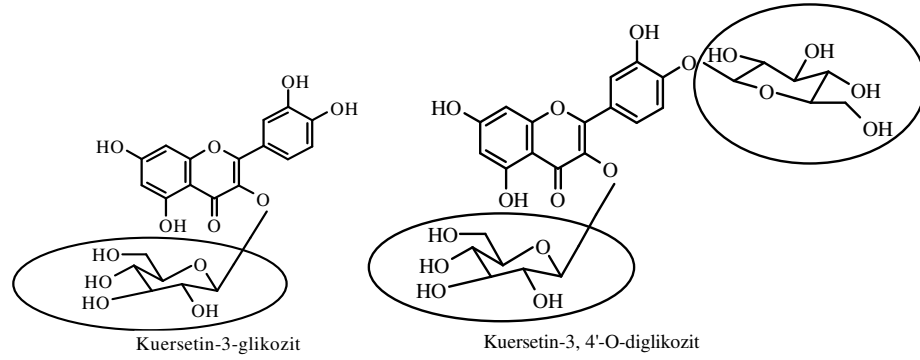
Şekil 2.4.5.1. Hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlere serbest radikal süpürme özelliği veren yapılar

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi, hidrojen bağları veya elektron dekolizasyonu sonucu oluşan fenoksil radikallerinin dengelenmesi ve fenolik hidrojenlerinin uygunluğu ile tayin edilir. Flavonoidlere antioksidan aktivite özelliği kazandıran yapılar belli bir sayı, düzen ve fenol halkasında bulunan hidroksil gruplarının yapısal konjugasyonunu içerir (Miller ve Rice-Evans 1997). Flavonoidlerin antioksidan aktivitelerinde yapıların B halkasında bulunan 3,4-dihidroksil grubu, C halkasında bulunan 3 numaralı karbona bağlı OH grubu ve 4 numaralı karbonla çift bağ yapan oksijen ve A halkasında bulunan 5 numaralı karbona bağlı OH grubu etkili olduğu belirtilmektedir (Wojdylo ve ark. 2007). (Şekil 2.4.5.2)



Şekil 2.4.5.2. Flavonoidlere serbest radikal süpürme aktivitesi özelliği veren yapılar

Hidroksil gruplarının düzenlenmesindeki değişiklik ve hidroksil gruplarına glikozil yapılarının bağlanması flavonoidlerin antioksidan aktivitelerini düşürmektedir (Rice-Evans ve ark. 1996). Flavonollarla ilgili yapılan bir çalışmada kuersetinin en yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ancak, kuersetinin 3-hidroksil grubuna glikozil yapısının bağlanmasıyla oluşan rutin yapısının oldukça düşük aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Başka bir çalışma da ise kuersetin, siyanidin, pelargonidin ve peonidin glikozil yapılarının aglikonlarından daha düşük aktiviteye sahip olduğu ve eklenen ikincil glikozil yapılarının aktiviteyi daha fazla azalttığı bulunmuştur (Şekil 2.4.5.3). Antioksidan etkinin bu azalışı karbohidrat kısmının sebep olduğu sterik etkiyle açıklanmaktadır.



Şekil 2.4.5.3. Antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etki eden glikozit ve diglikozit yapılar

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Aletler

3.1.1.1. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi

Çalışmada Agilent marka 1100 LC-MSD Trap SL model sıvı kromatografisi kütle spektrometresi kullanılmıştır. Standart maddeler ile APCI ve ESI iyonlaştırma kaynaklarının pozitif ve negatif modları çalışılmıştır ve ESI iyonlaştırma kaynağı pozitif modun çalışılan fenolik maddeler için uygun olduğu belirlenmiştir. Analitik kolon olarak Zorbax SB C18 LC kolonu (50mm×4.6mm, i.d. 1.8 µm film kalınlığı) seçilmiştir.

3.1.1.2. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi

Çalışmada ATI Unicam marka UV2-100 spektrofotometre kullanıldı. Ölçümler 10 mm kuvarz hücreler kullanılarak yapıldı. Analiz sırasındaki çalışma şartları Çizelge 3.1.1.2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1.1.2.1. ATI Unicam marka UV2-100 cihazının çalışma şartları

Ölçüm Birimi	Absorbans
Dalgaboyu Aralığı (nm)	200-800
Tarama Hızı	0,5 nm aralıklı
Örnekleme Aralığı	Otomatik

3.1.1.2. pH Metre

Çalışmada Sartorius Professional Meter pp-15 model pH metre kullanılmıştır.

3.1.1.2. Analitik Terazı

Deneyzel alışmalar sırasında çözelti hazırlama işlemleri için $\pm 0,0001$ hassasiyetle alışan Gec Avery marka analitik terazi kullanılmıştır.

3.1.1.2. Saf Su Cihazı

Analizler sırasında kullanılan su Nüve marka NS 112 model su destile cihazından sağlanmıştır.

3.1.1.2. Döner Buharlaştırıcı

Deneyzel alışma sırasında metanolün uçurulması için Bibby RE 301×RE 300 marka cihaz RE 100 EA adaptörü ile kullanılmıştır.

3.1.1.2. Manyetik Karıştırıcı

Deneyzel alışma sırasında örneklerin ekstrakte edilebilmesi için Chiltern marka HS31 model manyetik karıştırıcılı ısıtıcı kullanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Meyveler

Analiz edilmesine karar verilen ahududu eşitleri; Heritage, Aksu kırmızısı, Hollanda boduru, Newburgh, Rubin Bursa'nın Kestel ilçesi, Gözede köyünde yer alan bahçelerden böğürtlen çeşitlerinden Bursa 1 ve Bursa 2 Bursa'nın Kestel ilçesi, Gözede köyünde yer alan bahçelerden, Jumbo ve Chester Bursa'nın Kestel ilçesi, Aksu köyünde yer alan bahçelerden temin edilmiştir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerine ait renk özellikleri izelge 3.1.2.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1.2.1. Ahududu ve böğürtlen çeşitleri ve renk özellikleri

Çeşitler	Renk
Ahududu	
Heritage	Kırmızı
Aksu Kırmızısı	Açık kırmızı
Hollanda Boduru	Kırmızı
Newburgh	Kırmızı
Rubin	Kırmızı
Böğürtlen	
Bursa 1	Kırmızı-Siyah
Bursa 2	Kırmızı-Siyah
Jumbo	Kırmızı-Siyah
Chester	Kırmızı-Siyah

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

3.1.3.1. Kimyasallar

3.1.3.1.1. Analitik Saflıktaki Kimyasallar

- Merck, 1.06007.2500, Metanol
- Merck, 1.11727.2500, Etanol
- Merck, 1.00030.2500, Asetonitril
- Merck, 1.00264.1000, Formik asit
- Merck, 1.08681.2500, Ksilen
- Merck, 1.06393.1000, Sodyum karbonat
- Merck, 1.06469.1000, Sodyum hidroksit
- Merck, 1.02791.1000, Bakır sülfat
- Merck, 1.08087.1000, Sodyum potasyum tartarat
- Merck, 1.065490.100, Sodyum nitrit
- Merck, 1.01084.1000, Alüminyum klorür hekza hidrat
- Merck, 1.04936.1000, Potasyum klorür
- Merck, 1.06268.1000, Sodyum asetat
- Merck, 1.02733.1000 Bakır klorür
- Merck, 1.01116.1000Amonyum asetat

- Merck, 1.00495.0500, Okzalik asit
- Merck, 8.18401.0500, Potasyum persulfat
- Merck, 1.00314.2500, Derişik hidroklorik asit, %37, d=1.19 g/mL, M=36,46 g/mol

3.1.3.1.2. Diğer Kimyasallar

- Fluka, 45140, Ellagik asit
- Fluka, 70050, Mirisetin
- Merck, 822029, Kafeik asit
- Merck, 800237, *p*-Kumarik asit
- Merck, 822070, Ferulik asit
- Merck, 821840, *p*-Hidroksibenzoik asit
- Merck, 841533, Protokatekuik asit
- Sigma–Aldrich, G7384, Gallik asit
- Sigma–Aldrich, 337951, Kuersetin hidrat
- Sigma–Aldrich, K0133, Kamferol
- Sigma–Aldrich, C-1251, (+)-Kateşin hidrat
- Sigma–Aldrich, F9252, Folin-Ciocalteu fenol reaktifi
- Merck, 1831, L-Askorbik asit
- Merck, 102968, Neokuproin reaktifi
- Sigma-Aldrich, D1878, 2,6-Diklorofenolindofenol boya reaktifi
- Sigma-Aldrich, A1888, 2,2-azino-di-(3-ethylbenzothialozine-sulphonic acid) (ABTS)
- Sigma–Aldrich, D9132, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radikali (DPPH)

3.1.3.1.3. Sarf Malzemeler

- 10-100 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 100-1000 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)
- 500-5000 µl aralıklı mikropipet (Eppendorf)

3.1.3.2. Çözeltiler

3.1.3.2.1. Standart Fenolik Bileşikler ile Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi için standart fenolik bileşikler ile kalibrasyon çözeltileri hazırlandı. 100 mg/L stok çözelti kullanılarak ellagik asit, kafeik asit, ferulik asit, *para*-kumarik asit, *para*-hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, kuersetin, mirisetin, kamferol, (+)-kateşin ve kuersetin-3- β -D-glukozit standart fenolik bileşikler için 0,1; 0,5; 1; 5; 10 ve 20 mg/L standart çözeltileri hazırlanmıştır. Ekstraksiyon metodunun % verim değerinin ve uygulanan analitik metodunun validasyonun hesaplanabilmesi için 10 mg/L ana stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden %verim değerinin hesaplanmasında içerisinde 1 mg/L standart madde içeren ekstraktlar kullanılmıştır. Uygulanan analitik metodun validasyonunda kullanılan çözeltiler ana çözelti kullanılarak herbir standart fenolik bileşik için 0,1 mg/L derişimine sahip çözeltilerdir.

3.1.3.2.2. Asidik Hidroliz İçin Kullanılan Çözelti

Çalışmada örneklerin asidik hidrolizi için derişik hidroklorik asitten (%37, $d=1,19$ g/mL, $M=36,46$ g/mol) 50 mL alınarak saf su ile 100 mL seyreltilmiş ve konsantrasyonu 6 mol/L olan çözelti hazırlanmıştır.

3.1.3.3. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Ölçümlerinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 0,4000 g NaOH suda çözülerek 100 mL saf su ile seyreltilmiştir.
- %2 sodyum karbonat çözeltisi: 2,0000 g Na_2CO_3 suda çözülerek 100 mL saf su ile seyreltilmiştir.
- %0,5 bakır sülfat ve %1 sodyum potasyum tartarat çözeltisi: 0,5000 g CuSO_4 ve 1,0000 g sodyum $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ suda çözülerek 100 mL saf su ile seyreltilmiştir.

- %5 sodyum nitrit çözeltisi: 5,0000 g NaNO_2 suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- %10 alüminyum klorür çözeltisi: 10,0000 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- 1 M sodyum hidroksit çözeltisi: 4,0000 g NaOH suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- 0,025 M pH=1,0 potasyum klorür çözeltisi: 0,1900 g KCl suda çözülerek 100 ml ye saf su ile seyreltilir.
- 0,4 M pH=4,5 sodyum asetat tampon çözeltisi: 5,4400 g $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 ml ye saf su ile seyreltilir.
- 2,6-Diklorofenolindofenol, boya maddesi çözeltisi: 2,6-diklorofenolindofenol'ün sodyum tuzundan 0,0500 g, 200 mL'lik ölçülü balonda, 42 mg NaHCO_3 içeren 150-ml sıcak (50°C - 60°C) suda çözülür, 200 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- %2 okzalik asit çözeltisi: 2,0000 g okzalik asit: 2 g $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- 1000 mg/L askorbik asit standart çözeltisi: 0,0500 g askorbik asit hazırlanan %2 lik okzalik asit çözeltisi ile çözülerek 100 mL'ye seyreltilmiştir.
- Sodyum Asetat/Asetik Asit Tampon Çözeltisi (pH=4,0): Susuz sodyum asetatın 300 g'ı, 700 ml su ve 1000 ml buzlu asetik asit karışımına ilave edilerek hazırlanır.
- 1×10^{-3} M DPPH çözeltisi: 0,0394 g DPPH metanolde çözülerek 100 mL'ye metanol ile seyreltilmiştir.
- 7mM ABTS çözeltisi: 0,1920 g ABTS tartılır suda çözülür 0,0331 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ile ilave edilerek karıştırılır 50 mL ye saf su ile seyreltilir, karanlıkta 12-16 saat bekletilir.
- 1.0×10^{-2} M bakır klorür çözeltisi: 0,4262 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ suda çözülerek 100 mL' ye saf su ile seyreltilmiştir.
- 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi: 0.0390 g neokuproin %96'lık etanolde çözülerek 25 ml ye etanol ile seyreltilir.
- 1M, pH=7,0 amonyum asetat tampon çözeltisi: 19,27 g NH_4Ac suda çözülerek 250 ml ye saf su ile seyreltilir.

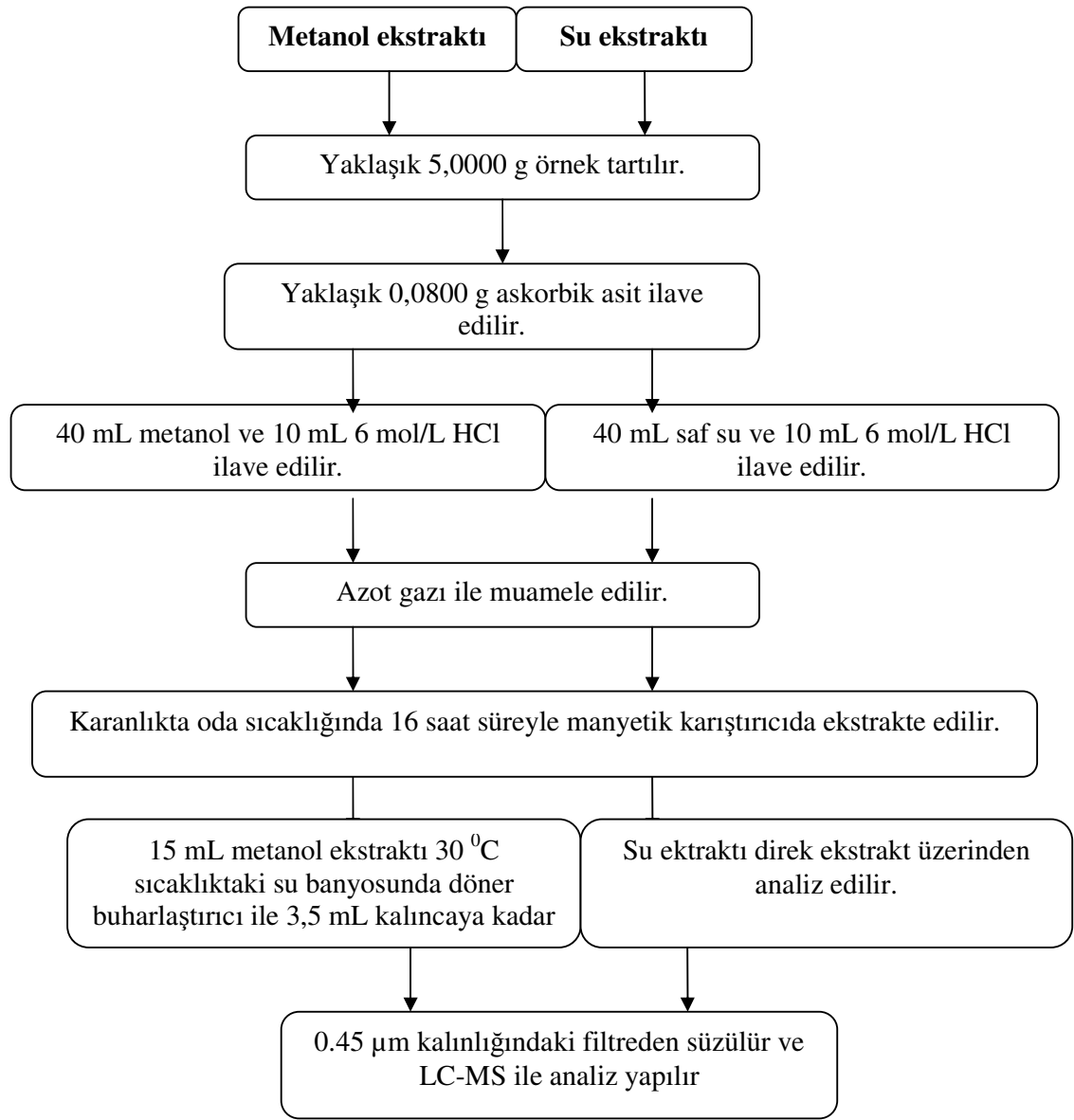
3.2. YÖNTEM

3.2.1. Meyvelerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Tez kapsamında analiz edilen Aksu kırmızısı, Rubin, Newburgh, Heritage ve Hollanda boduru ahududu çeşitleri ile Bursa 1, Bursa 2, Jumbo ve Chester böğürtlen çeşitleri teknolojik olum safhasında hasat edilmiştir. Hasat edilen ahududu ve böğürtlen çeşitleri 0,5 kg'lık plastik (polisitren) kutulara yerleştirilmiştir. Hasat edilen meyvelerin bir kısmı ticari bir depoda statik tünel'de -35°C 'de dondurulduktan sonra -22°C de muhafaza edildiler. Ahududu ve böğürtlen çeşitleri hasat edilir edilmez, dondurulduktan hemen sonra ve dondurulduktan 6 ay sonra hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktları üzerinde fenolik bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için LC-MS tekniği kullanılarak analize tabi tutulmuşlardır.

3.2.2. Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşikleri asitli metanol ve asitli su olmak üzere iki ayrı ekstraksiyon metodu ile tayin edilmiştir. Örneklerin ekstraksiyonu sırasında uygulanan işlemler sırasıyla şöyledir:



3.2.3. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi Çalışma Koşulları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde fenolik bileşikler LC-MS ile analiz edildi. Fenolik bileşiklerin LC-MS ile analizinde iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonlaşma, iyon modu olarak pozitif mod ve kolon olarak Zorbax SB C18 LC-MS kolonu (50mm×4.6mm, i.d. 1.8 µm film kalınlığı) ile 10 µL lik enjeksiyon hacminde 0,2 ml/dk akış hızı ile çalışıldı. Analiz sırasında asetonitril ve %1 lik sulu formik asitten oluşan gradient çözücü programı uygulandı. LC-MS için analiz çalışma koşulları Çizelge 3.2.3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.3.1. LC-MS için analiz çalışma koşulları

Süre (dk)	LC-MS çalışma koşulları
0	%70 %1 lik formik asit, %30 asetonitril
7	%70 %1 lik formik asit, %30 asetonitril
8	%50 %1 lik formik asit, %50 asetonitril
27	%50 %1 lik formik asit, %50 asetonitril
27.10-30.00	%70 %1 lik formik asit, %30 asetonitril

3.2.4. Ekstraksiyon Metotları İçin Geri Kazanım Testleri

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde analiz edilen fenolik bileşiklerin her biri için standart çözeltiler hazırlandı. Her bir fenolik bileşik için uygulanan ekstraksiyon metodunun % geri kazanım değeri, analiz sonunda örneklerde tayin edilen her bir fenolik bileşik için LOD ve LOQ değeri hesaplandı.

3.2.5. Ultraviyole Görünür Bölge Spektrofotometresi Ölçümleri

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin asitli su ve asitli metanol ekstraktlarında toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyenin ve askorbik asit içerikleri ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi ile yapılmıştır.

3.2.5.1. Toplam Fenol Tayini

Elde edilen asitli su ve asitli metanol ekstraktlarının toplam fenol tayinleri bazik ortamda Folin Ciocalteu fenol reaktifi kullanılarak yapılmıştır (Güçlü ve ark. 2006). 0,1 mol/L NaOH içinde %2'lik Na_2CO_3 olacak şekilde Lowry A çözeltisi ve %1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ içinde %0,5 CuSO_4 olacak şekilde Lowry B çözeltisi hazırlanır. Lowry A ve Lowry B 50:1 (v/v) oranında karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanır. Deney tüplerine x mL örnek/standart konur. Üzerine (2-x) mL saf su ve 2,5 mL Lowry C ilave edilerek karıştırılır, 10 dk beklenir. Süre sonunda 1:3 oranında su ile seyreltilmiş Folin reaktifinden 0,25 mL ilave edilerek karıştırılır ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. 30 dk sonunda oluşan mavi renk 750 nm dalga boyunda örneklerin ve

standartların absorbans değerleri okunur. Toplam fenol tayini çalışmalarında standart madde olarak gallik asit kullanılır. Kalibrasyon grafiği için 5-50 mg/L konsantrasyon aralığında gallik asit çözeltileri hazırlanır. En küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanır. Ekstraktlar için toplam fenol miktarları hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak mg gallik asit/100 g örnek olarak ifade edilir.

3.2.5.2. Toplam Flavonoid Tayini

Toplam flavonoid içeriği Zhishen ve ark. nın (1999) uyguladığı kolorimetrik metotla tayin edilmiştir. Metanol ekstraktlarından 2,5 mL, su ekstraktlarından 2 mL alınarak 0,15 mL % 5 lik NaNO₂ özeltisi ile karıştırılır. 6 dk beklenir ve 0,15 mL AlCl₃ ilave edilerek 6 dk daha bekletilir. Süre sonunda deney tüpündeki çözeltiye 2 mL 1 mol/L NaOH özeltisi eklenir ve toplam hacim 5 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanır. 15 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 510 nm dalga boyunda absorbans değeri okunur. Toplam flavonoid tayini çalışmalarında standart madde olarak (+)-kateşin kullanılır. Kalibrasyon grafiği için 0,5-15 mg/L konsantrasyon aralığında (+)-kateşin çözeltileri hazırlanır. En küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanır. Ekstraktlar için toplam flavonoid miktarları hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak mg (+)kateşin/100 g örnek olarak ifade edilir.

3.2.5.3. Toplam Antosiyanin Tayini

Ekstraktların toplam antosiyanin miktarı pH farkı metodu kullanılarak yapılmıştır. Bu metot için 0,025 mol/L pH=1,0 potasyum klorür çözeltisi ve 0,4 mol/L pH=4,5 sodyum asetat tampon çözeltisi hazırlanır. Her bir x mL meyve ekstaktının pH değeri 1,0 ve 4,5 olacak şekilde hazırlanan tampon çözeltiler kullanılarak ayarlanır. Harcanan tampon hacminin değeri ekstraktlar için seyrelme faktörü olarak kaydedilir. 30 dk beklenir ve süre sonunda hazırlanan herbir örnek için 510 ve 700 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülür. Okunan absorbans değerleri

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH_{1,0}} - (A_{510} - A_{700})_{pH_{4,5}} \quad (3.2.5.3-1)$$

$$\text{mg siyanidin-3-glukozit/100 g} = \frac{A \times SF \times 1000 \times M}{\epsilon \times l} \quad (3.2.5.3-2)$$

eşitliğinde yerine konarak herbir ekstrakt için absorbans değeri bulunur. Siyanidin-3-glukozit için molekül ağırlığı 449.2 g/mol, molar sönüm katsayısı 26900, kuvvet genişliği 1 cm olarak alınır. Elde edilen değerler eşitlikte yerine konur. Ekstraktlar için toplam antosiyanin değeri mg siyanidin-3-glukozit/100 g örnek olarak verilir.

3.2.5.4. Askorbik Asit Tayini

Ahududu ve böğürtlen örneklerinden elde edilen ekstraktların askorbik asit içeriği TS 6397 standart metoda göre ekstraktlarımıza uygun şekilde modifiye edilerek spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Analiz tüplerine x mL ekstrakt ve bu miktarın 5 katı kadar okzalik asit çözeltisi konur ve kuvvetlice karıştırılır. Eklenen okzalik asit çözeltisi kadar tampon çözeltisi ilave edilir. Hemen çözeltideki askorbik asidi indirgeyecek miktardan daha fazla miktarda boya maddesi çözeltisi (V_0) konulur, karıştırılır ve 10 mL ksilen ilave edilir. Tüpün kapağı kapatılarak 6-10 saniye şiddetle çalkalanır. Fazları ayırmak için santrifüj edilir. Dikkatle üstteki ksilen fazı alınır ve 500 nm de absorbans değeri okunur. Kalibrasyon grafiği örnek tüpüne eşit miktarda ekstraksiyon çözeltisi, her tüpe eşit miktarda tampon çözelti ve tüplere sırasıyla 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 ve 1 mL boya çözeltisi ve her tüpe 10 mL ksilen eklenir. Fazların ayrılması için tüpler santrifüjlenir ve üstteki ksilen fazı alınarak 500 nm dalga boyunda absorbansa karşı ilave edilen boya maddesi çözeltisi hacmi (mL) çizilerek hazırlanır. Diğer işlem boya maddesi çözeltisinin ayarlanmasıdır. Hazırlanan askorbik asit standart çözeltisinden 5 mL alınarak 5 mL okzalik asit çözeltisi ile seyreltilir ve hemen boya maddesi çözeltisi ile meydana gelecek sarımsı pembe renk en az 5 saniye sabit kalana kadar titre edilir. Askorbik asit standard çözeltisinden alınan 5 mL yerine, okzalik asit çözeltisinden 5 mL kullanılarak, aynı işlemler yapılmak suretiyle boya maddesi çözeltisinin ayarlanmasındaki tanık deney yapılır. İşlem sonunda

titrasyonunda kullanılan boya maddesi çözeltisi hacimlerinin herbirinden tanık deney sonucu çıkartılır ve boya maddesi çözeltisinin 1 mL' sine karşılık gelen askorbik asit miktarı mg olarak bulunur. Ekstraktlar için askorbik asit değeri mg askorbik asit/100 g örnek olarak hesaplanır.

$$\text{Askorbik asit miktarı (mg/100 g)} = \frac{(V_0 - V_1) \times m_1}{m_0} \times 100 \quad (3.2.5.4-1)$$

Burada;

m_0 = Deney numunesi çözeltisinden tayin için alınan kısımdaki deney numunesi kütlesi, g

m_1 = Boya maddesi çözeltisinin 1 ml'sine eşdeğer askorbik asit kulesi, mg

V_0 = Örnek tüpüne ilave edilen boya maddesi çözeltisinin hacmi, mL

V_1 = Örneğin ölçülen absorbansına karşılık kalibrasyon eğrisinden okunan boya maddesi fazlasının hacmi, mL

3.2.5.5. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin asitli su ve asitli metanol ekstraktlarında antioksidan aktivite tayinleri ABTS, DPPH ve CUPRAC olmak üzere üç farklı yöntem kullanılarak ultraviyole görünür bölge spektrofotometresi ile yapılmıştır.

3.2.5.5.1. ABTS Metodu

Meyvelerden elde edilen fenol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ABTS metodu kullanılarak yapılmıştır. ABTS metodunda 7mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM $K_2S_2O_8$ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletilir. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi % 96'lık etanolle 1:10 oranında seyreltilir. 4 mL etanol ve 1 mL ABTS karıştırılarak 6. dk sonunda 734 nm dalga boyunda kör örnek için absorbans değeri okunur ($A_{kör}$). Her bir ekstrak ya da fenol bileşiğinden x mL alınır üzerine (4-x) mL etanol ve 1 mL ABTS çözeltisi ilave edilerek karıştırılır, 6.dk sonunda 734 nm de

absorbans değeri okunur ($A_{\text{örnek}}$). Ölçümler sonucunda hem de ekstraktlar hem de fenolik bileşikler için % inhibisyon değerleri hesaplanır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.5.5.5.1-1)$$

Kalibrasyon grafiği 0,00625-0,05000 mg aralığında troloks çözeltileri ile çizilir ve bu grafikten yararlanılarak ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri μmol troloks/g örnek olarak hesaplanır.

3.2.5.5.2. DPPH Metodu

Ekstraktlar üzerine uygulanan diğer antioksidan aktivite tayin yöntemi fenolik bileşiklerin serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH kullanılarak metanol içinde gerçekleşen reaksiyonun spektrofotometrede 515 nm'de ölçülmesiyle yapılmıştır. Fenol ya da ekstrak çözeltilerinden alınan x mL örnek metanol içinde hazırlanmış 1mM DPPH çözeltisinin 0,18 mL ile karıştırılır, toplam hacim metanol ile 3 mL ye tamamlanır ve karıştırılır. Test tüp içerisindeki DPPH konsantrasyonu 6×10^{-5} M dir. 30 dk karanlıkta bekletilir ve süre sonunda 515 nm dalga boyunda absorbans değeri okunur ($A_{\text{örnek}}$). Aynı işlem ekstrak/fenol ilavesi yapılmadan kör örnek için 0,18 mL DPPH ve (3-0,18) mL metanol ilavesi ile tekrarlanır ve okunan absorbans değeri $A_{\text{kör}}$ olarak kaydedilir. Ekstraktların % inhibisyon değeri hesaplanır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.5.5.5.2-1)$$

Troloks standart maddesinin 0,0027-0,0080 mg değeri ile % inhibisyon arasında çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri μmol troloks/g örnek olarak hesaplanır.

3.2.5.5.3. CUPRAC Metodu

Geliştirilen spektrofotometrik metot, antioksidan çözeltisinin, bir bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproinin alkoldeki çözeltisi ve pH 7 amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile karıştırılması ve ardından oluşan Cu(I)-neokuproin kelatinin absorbansının 450 nm de okunmasını içerir. Deneysel çalışmada, 1 mL Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL neokuproin alkoldeki çözeltisi ve 1 mL amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltileri karıştırılır, üzerine x mL ekstrak, (4-x) mL saf su ilave edilir. İşlemi takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan örneğe karşı 450 nm'de absorbans değerleri okunur. Kalibrasyon grafiği için 0,0073-0,0430 mg aralığında troloks çözeltileri hazırlanmıştır. En küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanır. Ekstraktlar için antioksidan aktivite değeri hesaplanan kalibrasyon denklemi kullanılarak µmol troloks/g örnek olarak hesaplanır.

3.2.6. İstatistik Analiz Yöntemi

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin LC-MS ile tayin edilen fenolik bileşik miktarlarının ve UV-vis ile tayin edilen toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit ve antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel analizleri Minitab ve MSTAT-C programları kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre çeşitler arasındaki farklar ve benzerlik belirlenmiştir.

3.2.7. Korelasyon Değerlerinin Hesaplanması

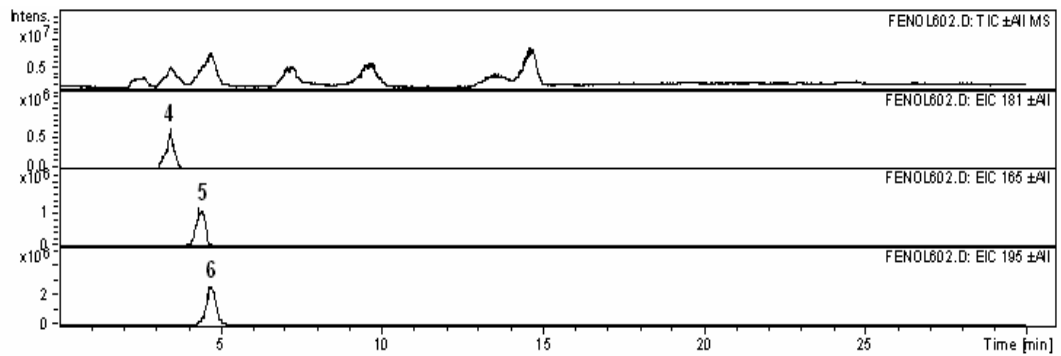
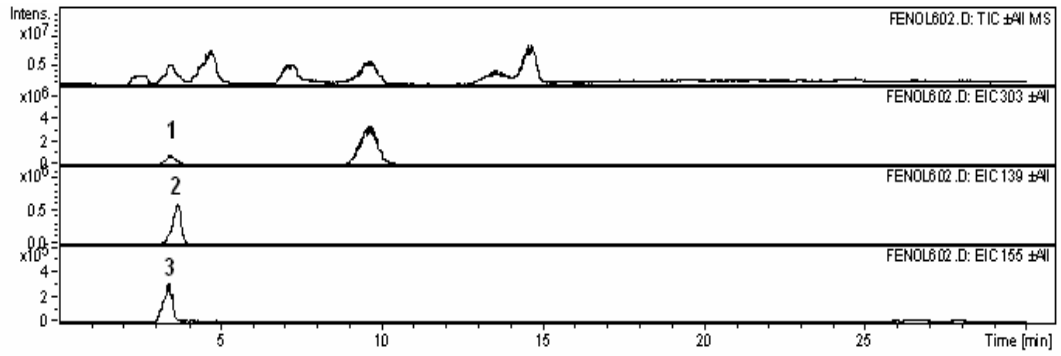
Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin UV-vis ile tayin edilen toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit ile ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile tayin edilen antioksidan aktivite değerleri arasındaki belirlenen korelasyon Microsoft Excel programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasındaki ilişki belirlenmiştir.

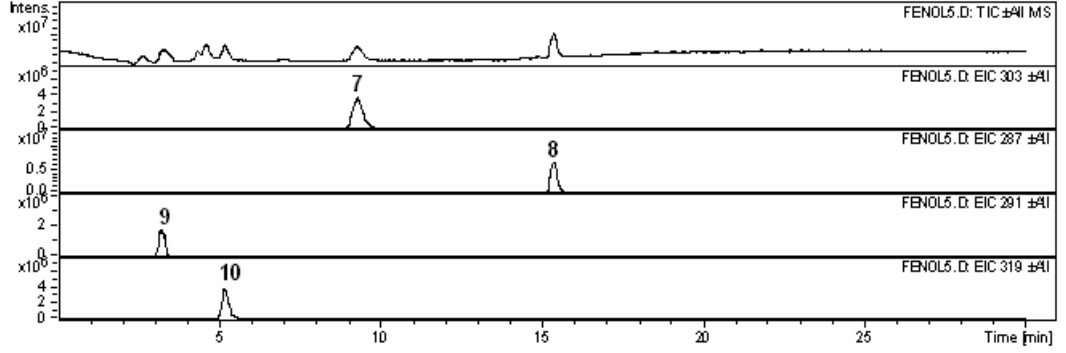
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. LC-MS Sonuçları

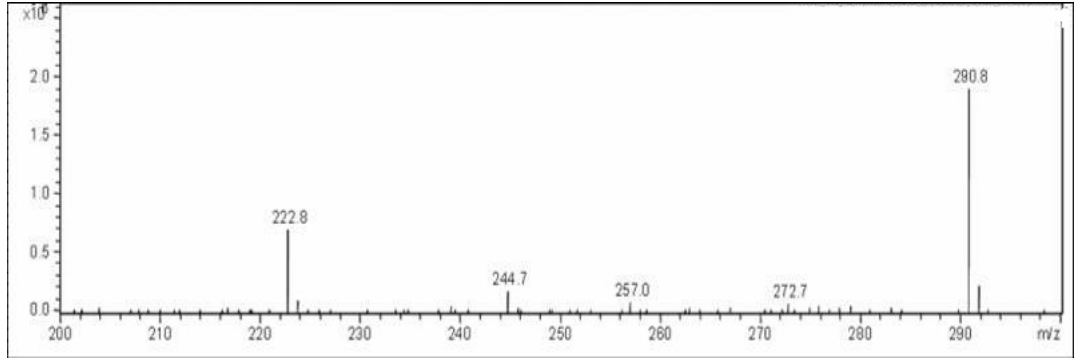
4.1.1. Standart Fenolik Bileşiklerin LC-MS Sonuçları

Standart fenolik bileşikler (20 mg/L) metanolde çözüldü ve Bölüm 3.2.3 de belirtilen çalışma koşullarında LC-MS ile analizi yapıldı. Her bir fenolik bileşiğin LC-MS kromatogramları ve spektrumları alındı. Şekil 4.1.1.1’de fenolik bileşiklerin LC-MS kromatogramları, Şekil 4.1.1.2a-Şekil 4.1.1.2i’ de LC-MS spektrumları verilmiştir. Çizelge 4.1.1.1’de her bir fenolik bileşiklerin alıkonma zamanı, molekül ağırlığı ve parçalanma ürünleri gösterilmiştir.

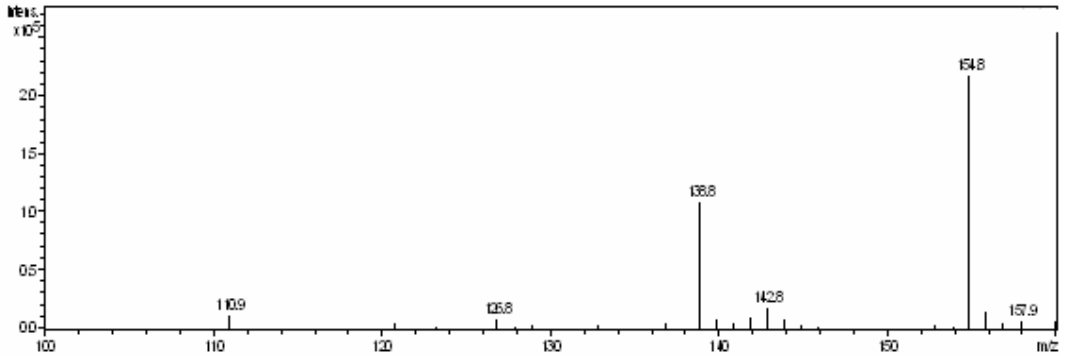




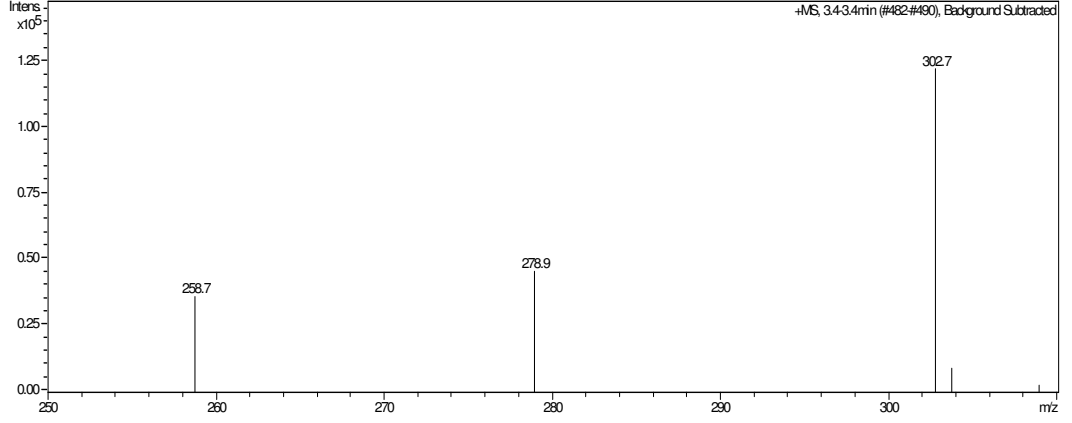
Şekil 4.1.1.1. Standart fenolik bileşiklerin LC-MS kromatogramı. 1, Ellagik asit; 2, *p*-Hidroksibenzoik asit; 3, Protokatekuik asit; 4, Kafeik asit; 5, *p*-Kumarik asit; 6, Ferulik asit; 7, Kuersetin; 8, Kamferol; 9, (+)-Kateşin; 10, Mirisetin.



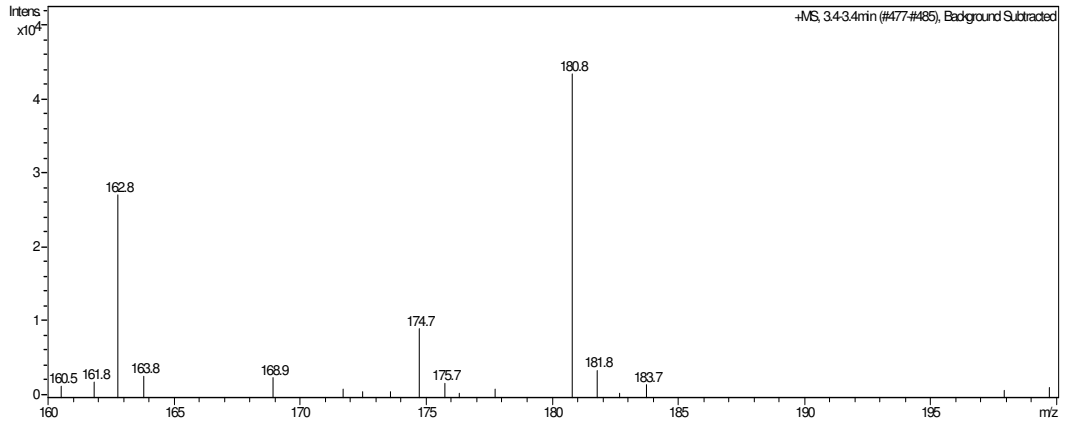
Şekil 4.1.1.2 a) (+)-kateşin LC-MS kütle spektrumu, t_R: 3,1 dk



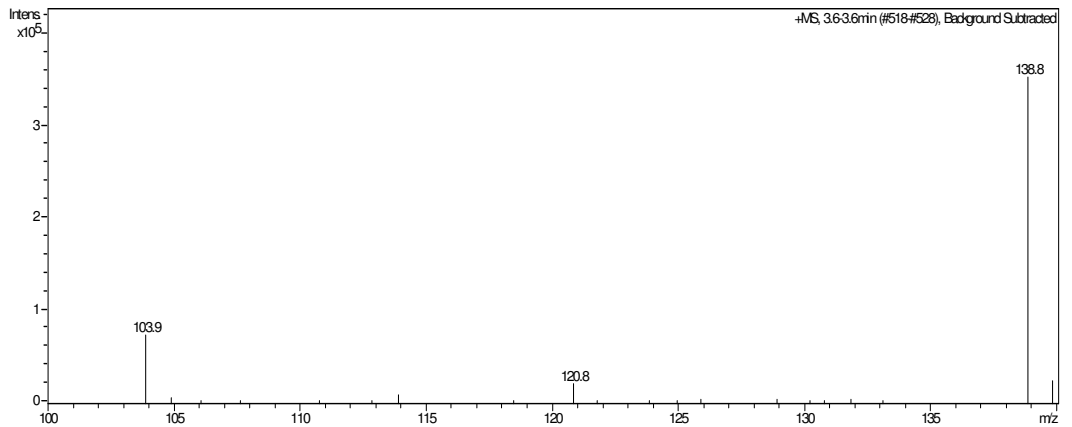
Şekil 4.1.1.2 b) Protokatekuik asit LC-MS kütle spektrumu, t_R: 3,2 dk



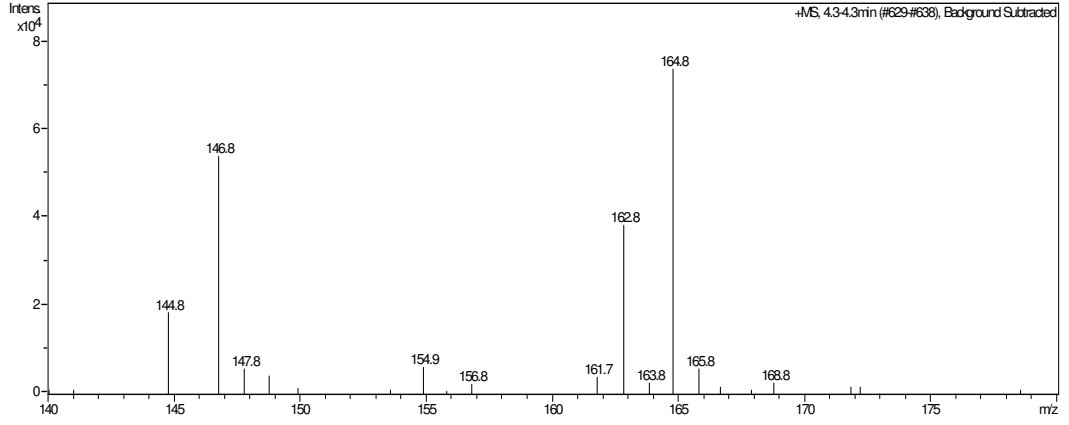
Şekil 4.1.1.2 c) Ellagik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,4 dk



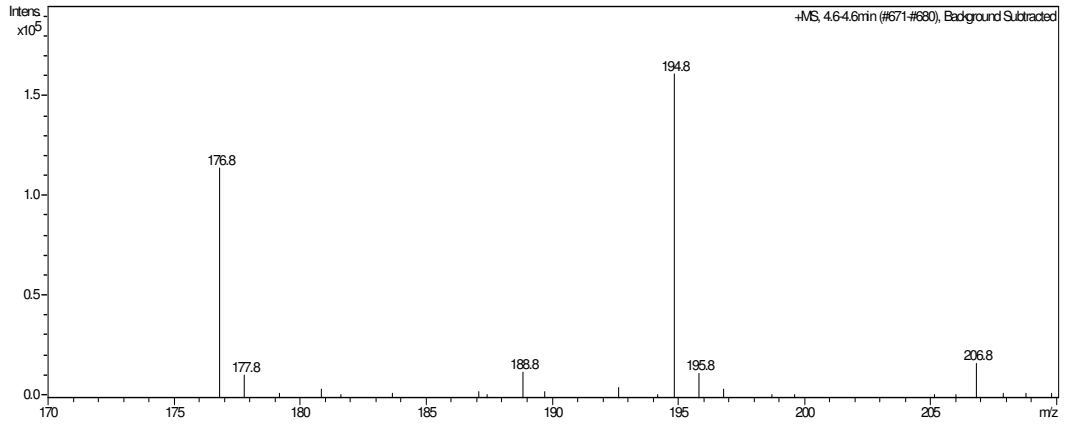
Şekil 4.1.1.2 d) Kafeik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,4 dk



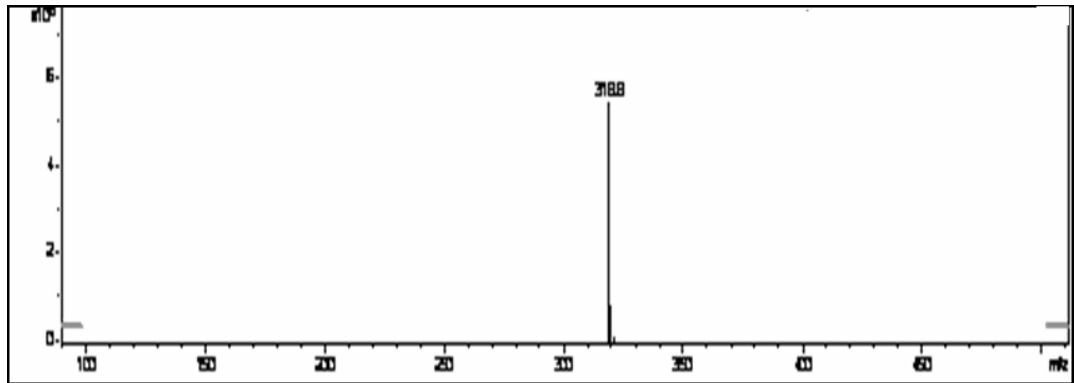
Şekil 4.1.1.2 e) *para*-Hidroksibenzoik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 3,7 dk



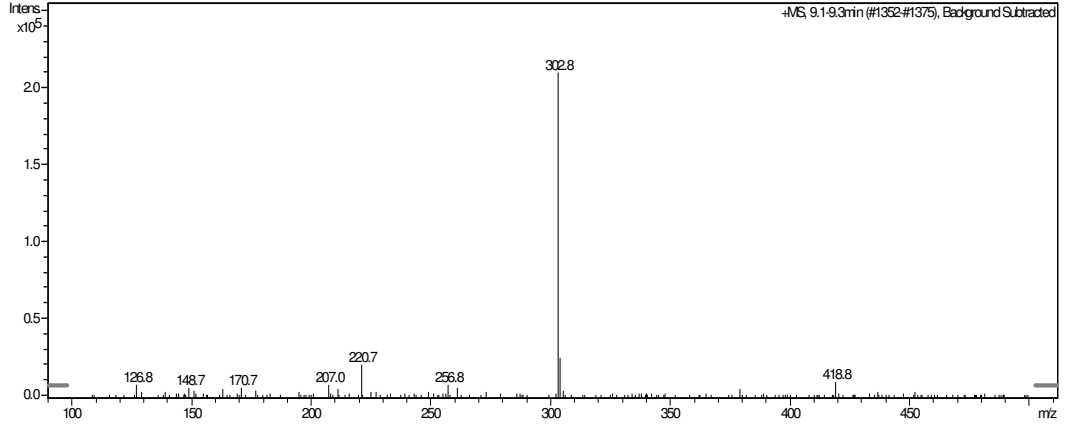
Şekil 4.1.1.2 f) *para*-Kumarik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 4,3 dk



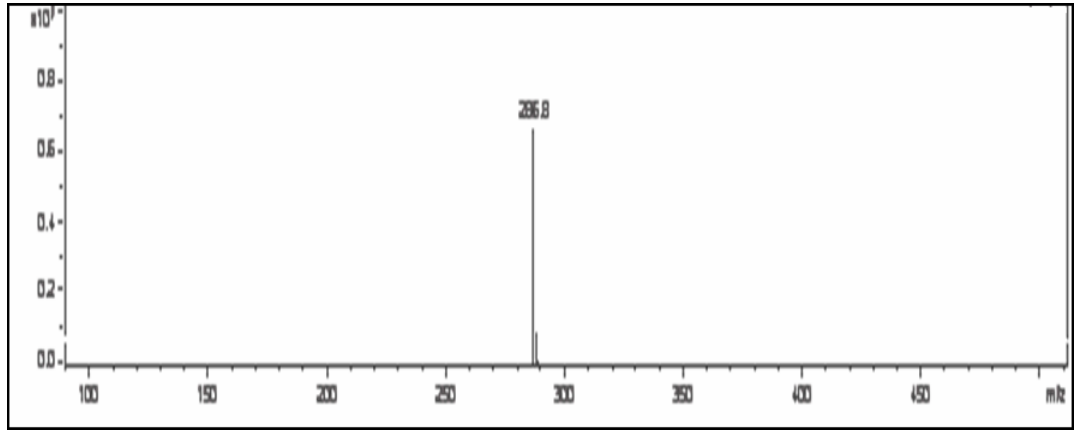
Şekil 4.1.1.2 g) Ferulik asidin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 4,6 dk



Şekil 4.1.1.2 h) Mirisetinin LC-MS kütle spektrumu, t_R : 5,1 dk



Şekil 4.1.1.2 ı) Kuersetin LC-MS kütle spektrumu, t_R: 9,3 dk.



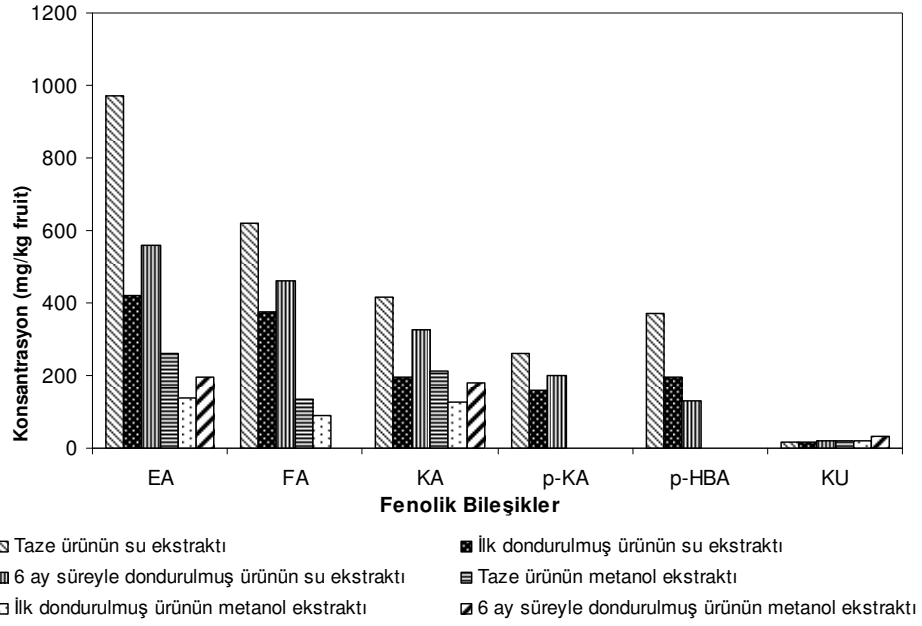
Şekil 4.1.1.2 i) Kamferolün LC-MS kütle spektrumu, t_R: 15,3 dk

Çizelge 4.1.1.1. Standart fenolik bileşiklerin alıkonma zamanı, molekül ağırlığı ve parçalanma ürünleri

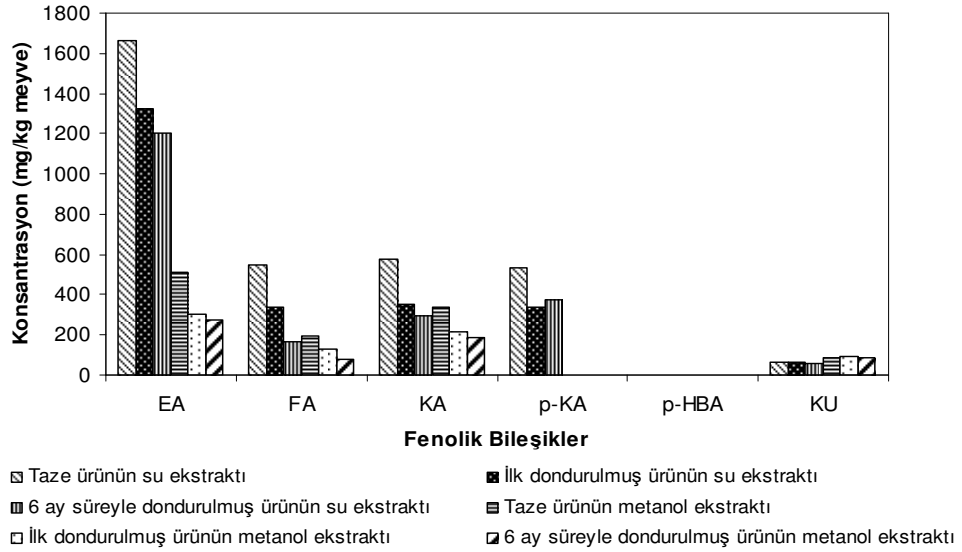
Fenolik Bileşikler	Alıkonma zamanı (dk)	Molekül ağırlığı (g/mol)	[M+H] ⁺	Parçalanma iyonları
(+)-Kateşin	3.1	290	291	-
Protokatekuik asit	3.2	154	155	-
Ellagik asit	3.4	302	303	259, 279
Kafeik asit	3.4	180	181	163
<i>para</i> -Hidroksibenzoik asit	3.6	138	139	121
<i>para</i> -Kumarik asit	4.3	164	165	147
Ferulik asit	4.6	194	195	177
Mirisetin	5.1	318	319	-
Kuersetin	9.3	302	303	-
Kamferol	15.4	286	287	-

4.1.2. Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin LC-MS Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde bulunan fenolik bileşikler kalitatif ve kantitatif olarak LC-MS ile analiz edildi. Ekstraksiyon metotlarının ve muhafaza sürelerinin ahududu çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri Şekil 4.1.2.1’de, böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri ise Şekil 4.1.2.2’de özetlenmiştir. Çizelge 4.1.2.1 su, Çizelge 4.1.2.2 metanol ile ekstrakte edilen ahududu çeşitlerinin fenolik bileşik içeriklerinin muhafaza süresine göre değişimlerini göstermektedir. Çizelge 4.1.2.3 ve Çizelge 4.1.2.4 ise böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşik içeriklerinin muhafaza süresine göre değişimleri görülmektedir.



Şekil 4.1.2.1. Ekstraksiyon metotlarının ve muhafaza sürelerinin ahududu çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri



Şekil 4.1.2.2. Ekstraksiyon metotlarının ve muhafaza sürelerinin böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşikleri üzerine etkileri

Çizelge 4.1.2.1. Ahududu örneklerinde su ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve)

	EA	FA	KA	p-KA	p-HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Aksu Kırmızısı										
Taze	1018,75±2016b	683,18±1,58b	349,61± 11,42e	361,68±7,28a	534,20±8,95a	x	x	x	x	x
İlk donmuş	420,68±1,12h	421,93±0,37ı	148,21± 7,06j	259,76±7,29d	228,23±6,25e	x	x	x	x	x
6.ay	518,30±8,61fg	481,18±5,15h	321,15± 10,80f	319,78±6,46b	114,30±6,40j	x	x	x	x	x
Newburgh										
Taze	898,51±17,12c	820,78±10,65a	754,85±2,18a	303,76±8,47c	453,91±2,69b	x	x	x	x	x
İlk donmuş	392,76±8,50h	531,81±2,58g	384,67±7,30d	185,58±1,47f	260,02±5,07d	x	x	x	x	x
6.ay	558,56±1,51f	588,44±7,55e	561,43±5,41b	251,81±1,74de	147,29±2,66ı	x	x	x	x	x
Rubin										
Taze	727,90±9,21d	620,81±7,36d	202,77±8,59ı	142,63±4,91g	234,63±1,40e	x	x	x	x	x
İlk donmuş	214,50±5,70ı	404,31±4,11j	9,03±1,80ı	107,90±3,46ı	187,28±4,13g	x	x	x	x	x
6.ay	492,22±8,71g	539,97±11,10g	114,05±1,88k	129,97±4,10h	170,43±6,19h	x	x	x	x	x
Heritage										
Taze	1350,36±13,85a	645,49±2,50c	545,42±1,93bc	243,11±3,60e	233,29±7,57e	x	46,97±0,32b	x	x	x
İlk donmuş	547,65±6,39f	270,03±4,70ı	285,22±4,14g	113,98±3,45ı	107,85±4,48j	x	38,82±0,37c	x	x	x
6.ay	675,21±2,97e	558,47±1,53f	530,91±1,10c	180,35±5,97f	66,07±3,66k	x	57,34±2,65a	x	x	x

Çizelge 4.1.2.1'indevamı

Hollanda Boduru	EA	FA	KA	p-KA	p-HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Taze	864,24±3,63c	338,27±5,68k	223,03±1,37h	258,91±3,65d	401,97±1,20c	x	27,31±0,27e	x	x	x
İlk donmuş	522,09±4,06fg	250,38±2,20m	157,01±1,56j	135,11±3,31gh	209,11±2,18f	x	35,24±2,40d	x	x	x
6.ay	549,95±4,12f	133,35±3,90n	104,94±2,77k	116,52±1,58ı	162,18±1,54h	x	48,35±0,89b	x	x	x
LSD (p<0.01)	50,46*	14,89*	19,32*	10,67*	11,36*	x	2,17*	x	x	x

Çizelge 4.1.2.2. Ahududu örneklerinde metanol ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve)

	EA	FA	KA	<i>p</i> -KA	<i>p</i> -HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Aksu Kırmızısı										
Taze	298,81±4,28 b	153,53±2,54 b	232,54±4,53 c	x	x	x	x	x	x	x
İlk donmuş	135,69±4,81 j	126,00±2,04 d	134,76±2,97 ı	x	x	x	x	x	x	x
6.ay	222,07±1,52 ef	x	226,33±3,86 cd	x	x	x	x	x	x	x
Newburgh										
Taze	232,24±11,03 d	173,58±3,67 a	264,08±1,21 a	x	x	x	x	x	x	x
İlk donmuş	113,16±6,13 k	103,23±3,51 e	135,24±3,30 hı	x	x	x	x	x	x	x
6.ay	180,92±2,37 h	x	186,67±8,73 e	x	x	x	x	x	x	x
Rubin										
Taze	188,64±1,46 gh	106,43±1,50 e	169,52±3,30 f	x	x	x	x	x	x	x
İlk donmuş	98,00±5,16 l	91,33±2,63 f	93,33±3,30 l	x	x	x	x	x	x	x
6.ay	134,24±1,15 j	x	149,67±4,18 g	x	x	x	x	x	x	x
Heritage										
Taze	315,23±7,97 a	145,21±1,32 c	245,36±4,46 b	x	x	x	68,70±2,51 b	x	x	x
İlk donmuş	162,70±2,72 ı	80,38±1,78 g	144,76±3,30 gh	x	x	x	50,54±1,35 d	x	x	x
6.ay	214,09±3,12 f	x	219,05±3,30 d	x	x	x	86,28±3,37 a	x	x	x

Çizelge 4.1.2.2' in devamı

Hollanda Boduru	EA	FA	KA	<i>p</i> -KA	<i>p</i> -HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Taze	274,01±1,41 c	90,11±2,27 f	152,38±3,30 g	x	x	x	42,26±1,20 e	x	x	x
İlk donmuş	192,02±2,07 g	46,25±1,53 h	123,81±3,30 j	x	x	x	56,83±1,82 c	x	x	x
6.ay	231,63±4,50 de	x	107,76±9,15 k	x	x	x	68,31±3,12 b	x	x	x
LSD (p<0.01)	50,46*	14.89*	19,32*	x	x	x	2,92*	x	x	x

Çizelge 4.1.2.3. Böğürtlen örneklerinde su ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve)

	EA	FA	KA	<i>p</i> -KA	<i>p</i> -HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Bursa 1										
Taze	1630,35±28,63 b	413,82±11,90 e	337,89±4,40 e	287,15±2,93 g	x	x	56,78±2,32 f	x	x	x
İlk donmuş	1269,75±13,54 f	189,37±1,30 i	218,01±4,41 h	91,30±1,24 l	x	x	67,79±2,82 e	x	x	x
6.ay	1550,0±27,47 c	125,09±3,49 j	326,93±4,69 f	115,89±10,09 k	x	x	45,30±5,90 g	x	x	x
Bursa 2										
Taze	1555,13±18,40 c	475,16±3,41 c	690,31±4,34 b	582,94±5,98 d	x	x	65,10±1,55 de	x	x	x
İlk donmuş	1058,17±6,76 g	391,63±3,60 f	407,04±3,73 d	237,84±4,98 i	x	x	45,86±1,49 g	x	x	x
6.ay	683,93±14,40 h	113,33±5,77 j	366,79±2,93 e	193,97±3,12 j	x	x	34,86±2,23 h	x	x	x
Chester										
Taze	1828,07±23,73 a	537,83±5,16 b	736,85±6,93 a	877,45±1,26 a	x	x	74,69±2,71 c	x	x	x
İlk donmuş	1458,60±23,50 d	331,01±3,57 g	511,07±4,71 c	765,54±13,19 c	x	x	87,45±2,74 b	x	x	x
6.ay	1239,71±11,97 f	189,37±4,57 i	337,66±14,68 f	823,80±7,88 b	x	x	102,50±1,33 a	x	x	x
Jumbo										
Taze	1639,59±27,14 b	757,69±4,34 a	504,94±2,68 c	383,96±5,92 e	x	x	60,74±1,97 ef	x	x	x
İlk donmuş	1522,83±16,33 c	450,66±6,96 d	280,29±1,20 g	267,30±1,57 h	x	x	68,48±4,76 d	x	x	x
6.ay	1347,48±18,97 e	238,40±4,56 h	137,16±6,11 i	354,87±5,75 f	x	x	39,91±1,71 h	x	x	x
LSD (p<0.01)	54,76*	14,62*	12,30*	13,12*	x	x	5,25*	x	x	x

Çizelge 4.1.2.4. Böğürtlen örneklerinde metanol ekstraktı ile tayin edilen fenolik bileşiklerin muhafaza sürelerince değişimleri (mg/kg meyve)

	EA	FA	KA	<i>p</i> -KA	<i>p</i> -HBA	PA	KU	KAM	MR	(+)-KAT
Bursa1										
Taze	492,67±13,91 b	112,60±2,99 f	351,65±11,77 b	x	x	x	79,66±3,90 g	x	x	x
İlk donmuş	150,37±1,20 j	92,75±3,19 g	249,68±6,96 e	x	x	x	88,78±2,97 ef	x	x	x
6.ay	299,29±4,38 g	76,98±1,85 h	285,06±12,00 d	x	x	x	65,76±3,19 h	x	x	x
Bursa 2										
Taze	477,22±9,87 c	209,78±3,24 c	308,98±2,22 c	x	x	x	91,16±5,28 de	x	x	x
İlk donmuş	246,73±2,70 i	135,91±4,90 e	225,93±3,67 f	x	x	x	82,09±1,44 g	x	x	x
6.ay	146,09±2,39 j	63,68±1,59 i	206,33±2,04 g	x	x	x	77,40±1,26 g	x	x	x
Chester										
Taze	631,59±7,24 a	224,91±4,74 b	479,55±5,60 a	x	x	x	102,00±1,59 c	x	x	x
İlk donmuş	496,73±6,29 b	164,11±9,38 d	227,51±3,73 f	x	x	x	113,70±1,72 b	x	x	x
6.ay	395,28±2,88 e	114,98±2,51 f	133,16±4,24 i	x	x	x	122,70±5,01 a	x	x	x
Jumbo										
Taze	441,06±2,38 d	236,49±1,35 a	213,69±5,36 fg	x	x	x	83,22±1,91 fg	x	x	x
İlk donmuş	317,51±7,04 f	133,88±4,67 e	163,49±4,76 h	x	x	x	95,74±2,04 cd	x	x	x
6.ay	263,08±5,04 h	61,52±2,30 i	111,92±1,79 j	x	x	x	77,63±1,59 g	x	x	x
LSD (p<0.01)	14,08*	8,42*	14,32*	x	x	x	6,56*	x	x	x

Çizelge 4.1.2.1-Çizelge 4.1.2.3' de ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin su ve metanolde ekstrakte edilen fenolik bileşikleri verilmiştir. Elde edilen değerlerden fenolik bileşik içeriği olarak ahududu ve böğürtlen çeşitleri arasında farklılık olduğu görülmektedir. Ayrıca hasat edilen çeşitler en fazla fenolik bileşik miktarına sahipken donmuş muhafaza süresince fenolik bileşik miktarında artış ya da azalış yönünde değişim olduğu gözlenmiştir.

4.1.3. İstatistiksel Analiz Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde LC-MS ile tayin edilen fenolik bileşiklerin ekstraksiyon metotları, muhaza süreleri ve çeşitler arasındaki farkların ve değişimlerin istatistiksel değerlendirmesi Minitab ve MSTAT-C programları uygulanarak yapılmıştır. Su ekstraktlarının ve taze meyvelerinin daha fazla fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu ve çeşitlerin de oldukça farklı fenolik içeriğe sahip oldukları tayin edilmiştir.

4.1.4. Analitik Metot Validasyonu

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşiklerinin miktarsal tayinlerinin validasyonunda her fenolik bileşiğin LOD (3s/m), LOQ (10s/m) (Çizelge 4.1.4.1) ve % geri kazanım değerleri (Çizelge 4.1.4.2) hesaplanmıştır. Burada s; tekrarlanan deneylerinin standart sapma, m; kalibrasyon eğrisinin eğim değerini ifade etmektedir. Analiz edilen fenolik bileşikler için LOD 0,002-0,005 mg/kg ve LOQ 0,010-0,090 mg/kg arasında değişmektedir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde tayin edilen fenolik bileşiklerin standartlarından hazırlanan karışımın asitli su ekstraktına katılmasıyla hazırlanan ekstraktta fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi tayin edildi (Çizelge 4.1.4.2). Fenolik bileşiklerin geri kazanım çalışması LC-MS ile yapıldı. Fenolik bileşiklerin ortalama geri kazanım değerlerinin ahududu çeşitlerinde %70±1 (ellagik asit)-91±2 (*para*-kumarik asit) böğürtlen çeşitlerinde ise %65±3 (*para*-hidroksibenzoik asit)-92±1 (ferulik asit) arasında değiştiği bulunmuştur. Ahududu çeşitleri için en düşük geri kazanım değeri %70±1 ellagik aside ait iken böğürtlende ellagik asit %91±1 geri

kazanım değerine sahiptir. Buna karşın *para*-hidroksibenzoik asit böğürtlen çeşitlerinde %65±3, ahududu çeşitleri için ise 88±1 geri kazanım değeri bulunmuştur.

Çizelge 4.1.4.1. Standart fenolik bileşiklerin LOD ve LOQ değerleri

Fenolik Bileşikler	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Ellagik asit	0,030	0,090
Ferulik asit	0,010	0,030
Kafeik asit	0,002	0,010
<i>p</i> -Kumarik asit	0,010	0,030
<i>p</i> -Hidroksibenzoik asit	0,010	0,030
Protokatekuik asit	0,020	0,070
Kuersetin	0,004	0,010
Kamferol	0,004	0,010
Mirisetin	0,050	0,010
(+)-Kateşin	0,010	0,020

Çizelge 4.1.4.2. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde bulunan fenolik bileşiklerin % geri kazanım değerleri

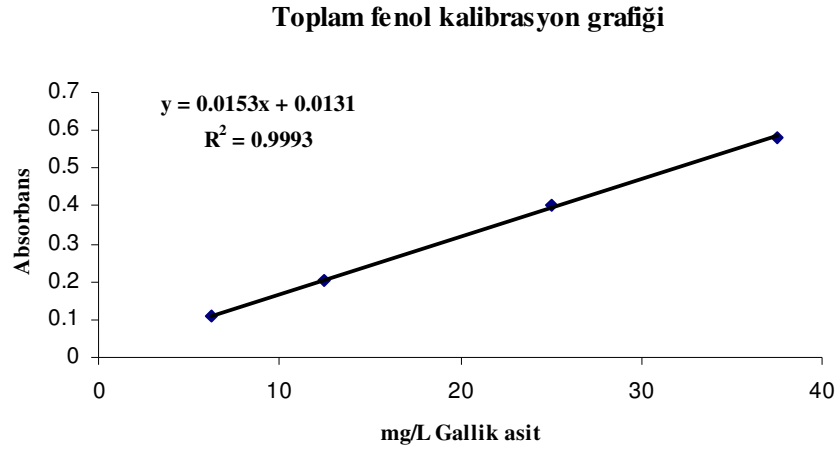
Geri kazanım (%) N=2		
Fenolik Bileşikler	Ahududu	Böğürtlen
Ellagik asit	70±1	91±1
Ferulik asit	84±3	92±1
Kafeik asit	90±2	89±2
<i>para</i> -Kumarik asit	91±2	91±1
<i>para</i> -Hidroksibenzoik asit	88±1	65±3
Kuersetin	90±3	90±4

4.2. UV-VIS Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit miktarları ve ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile antioksidan aktivite tayinleri hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktları üzerinde spektrofotometrik olarak yapıldı.

4.2.1. Toplam Fenol Sonuçları

Elde edilen asitli su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol tayinleri Bölüm 3.2.5.1’de belirtildiği şekilde yapıldı. Kalibrasyon grafiği Şekil 4.2.1.1’de gösterildiği gibi standart madde olarak gallik asit kullanılarak mg/L konsantrasyon aralığında çizildi. Su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol miktarları ahududu çeşitleri için Çizelge 4.2.1.1’ de böğürtlen çeşitleri için ise Çizelge 4.2.1.2’ de verilmiştir.



Şekil 4.2.1.1. Standart gallik asit kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.1.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol miktarı (mg gallik asit/100 g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	1040,95±15,91 h	1355,75±16,12 f	1123,39±10,95 g	1463,66±22,84 e	1822,02±11,92 cd	49,01*
Metanol Ekstraktı	1787,27±12,53 d	1835,42±16,69 cd	1866,22±7,62 bc	1924,68±19,65 b	2062,27±4,13 a	

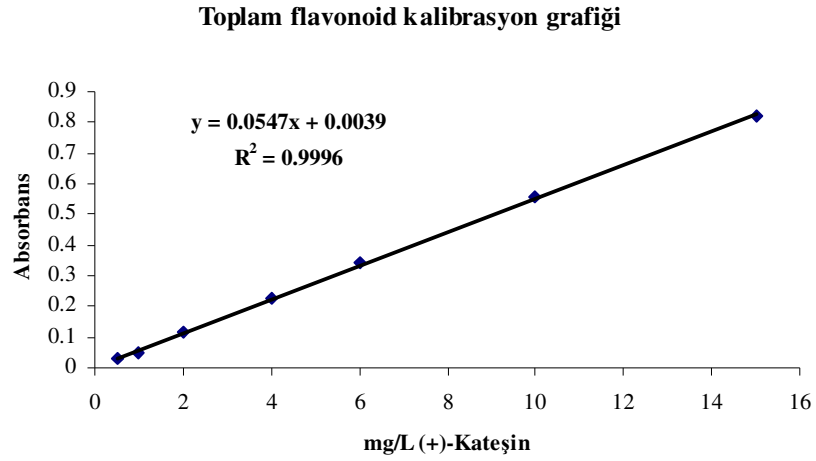
Çizelge 4.2.1.2. Böğürtlen çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam fenol miktarı (mg gallik asit/100 g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	2285.90±13.03 e	2303.01±11.40 e	2279.76±12.46 e	2445.87±14.75 d	53.80*
Metanol Ekstraktı	2688.13±11.1 b	2716.37±15.56 b	2515.71±18.57 c	2786.83±21.95 a	

Toplam fenol miktarının metanol ekstraktlarında su ekstraktlarından daha iyi verimle tayin edildiği ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol değerinin ahududu çeşitlerinden daha fazla olduğu Çizelge 4.2.1.1 ve Çizelge 4.2.1.2' de görülmektedir.

4.2.2. Toplam Flavonoid Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam flavonoid miktarları hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktları üzerinde belirlendi. (+)-Kateşin standart maddesi kullanılarak 0,5-15 mg/L konsantrasyon aralığında Şekil 4.2.2.1' de gösterildiği gibi kalibrasyon grafiği çizildi. Ahududu ve böğürten çeşitlerinin toplam flavonoid içerikleri Çizelge 4.2.2.1 ve Çizelge 4.2.2.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2.2.1. Standart (+)-kateşin kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.2.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı (mg (+)-kateşin/100 g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	21,04±0,27f	19,66±0,46g	20,56±0,37fg	15,41±0,12h	21,12±0,12f	1,12*
Metanol Ekstraktı	38,24±0,37c	31,37±0,51d	39,83±0,04b	25,28±0,92e	41,08±0,92a	

Çizelge 4.2.2.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam flavonoid miktarı (mg (+)-kateşin/100 g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	30,36±0,32g	29,07±0,49g	36,42±0,51f	42,76±0,29e	1,60*
Metanol Ekstraktı	51,99±0,43d	62,39±0,41b	56,09±0,95c	82,21±1,34a	

Metanol ekstraktlarının su ekstraktlarından yaklaşık iki kat daha fazla toplam flavonoid miktarına sahip olduğu Çizelge 4.2.2.1 ve Çizelge 4.2.2.2' de görülmektedir.

4.2.3. Toplam Antosiyanin Sonuçları

Toplam antosiyanin tayini pH farklılıkları metodu kullanılarak yapılmıştır. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktları üzerinde yapılan çalışmada çeşitlerin toplam antosiyanin miktarı 3.2.5.3-1 ve 3.2.5.3-2 eşitlikleri kullanılarak siyanidin-3-glukozit eşdeğerinde verilmiştir. Çizelge 4.2.3.1 ahududu ve 4.2.3.2 böğürtlen çeşitlerinde tayin edilen toplam antosiyanin miktarlarını göstermektedir.

Çizelge 4.2.3.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı (mg (+) siyanidin-3-glikozit/100 g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	49,26±0,24c	69,47±0,47a	60,28±0,71b	22,42±0,18f	45,59±0,33d	0,77*
Metanol Ekstraktı	24,77±0,27e	16,28±0,29g	24,11±0,37e	12,42±0,28h	24,26±0,29e	

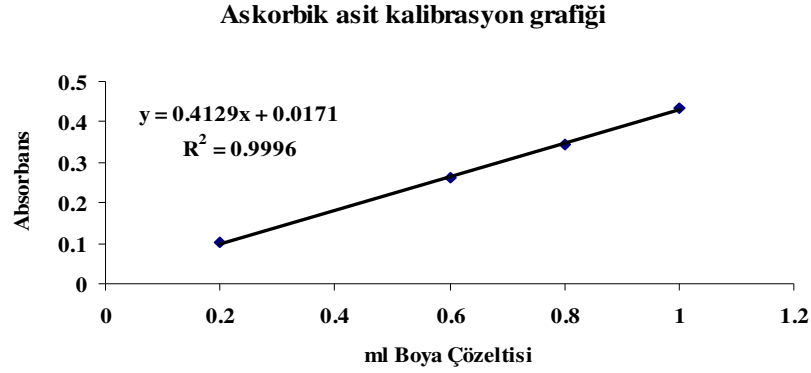
Çizelge 4.2.3.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı (mg (+) siyanidin-3-glikozit/100 g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	54,82±0,83c	55,06±1,49c	80,66±0,17b	87,07±0,99a	3,76*
Metanol Ekstraktı	41,29±0,27e	42,88±1,70e	48,74±0,15d	52,99±1,08c	

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam antosiyanin miktarının su ekstraktlarında daha fazla olduğu Çizelge 4.2.3.1. ve Çizelge 4.3.2.2' de görülmektedir. Antosiyaninler polar fenolik maddelerdir ve dolayısıyla polar çözücülerde daha fazla edilebilirler.

4.2.4. Askorbik Asit Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen örneklerinden elde edilen ekstraktların askorbik asit içeriği TS 6397 standart metoda göre ekstraktlarımıza uygun şekilde uygulanarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. 2,6-diklorofenolindofenol boya maddesi çözeltisi kullanılarak 0,2-1,2 mL hacim aralığında kalibrasyon grafiği Şekil 4.2.4.1' de gösterildiği gibi çizilmiştir. Kalibrasyon grafiği kullanılarak ekstraktlar için boya hacmi belirlenir ve 3.2.5.4.1' de verilen eşitlik kullanılarak ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin askorbik asit miktarları Çizelge 4.2.4.1'de verildiği şekilde bulunmuştur.



Şekil 4.2.4.1. Askorbik asit kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.4.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının askorbik asit miktarı (mg askorbik asit/100 g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	29,43±1,11bc	27,42±2,23cd	34,81±1,11a	28,18±0,65cd	31,91±1,11b	2,67*
Metanol Ekstraktı	22,90±2,23e	18,49±1,44f	26,05±2,23d	19,96±0,65e	21,08±2,23ef	

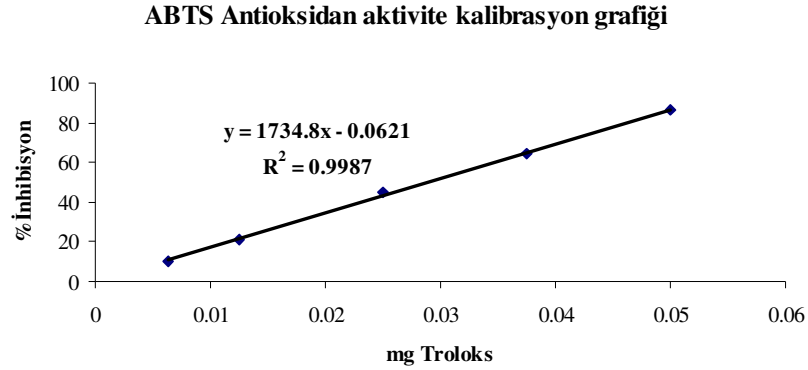
Çizelge 4.2.4.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının askorbik asit miktarı (mg askorbik asit/100 g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	27,54±0,81bc	28,56±1,11b	33,51±0,79a	31,41±0,94a	2,12*
Metanol Ekstraktı	19,50±1,29e	21,89±0,79d	26,26±0,65c	21,99±1,23d	

Ahududu ve böğürten çeşitleri benzer askorbik asit içeriğine sahiptirler. Çeşitler için elde edilen askorbik asit değerleri su ekstraktının askorbik asit tayini için daha verimli olduğunu göstermektedir.

4.2.5. ABTS Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinden elde edilen fenol ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ABTS metodu kullanılarak Bölüm 3.2.5.5.1’de belirtildiği şekilde tayin edilmiştir. Ölçümler sonucunda hem standartlar hem de ekstraktlar için 3.2.6.1-1 eşitliğine göre % inhibisyon değerleri hesaplanır. Kalibrasyon grafiği 0,00625-0,05 mg aralığında troloks çözeltileri ile Şekil 4.2.5.1’ de gösterildiği gibi çizilir ve bu grafikten yararlanılarak ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri μmol troloks/g örnek olarak hesaplanır. Çizelge 4.2.5.1 ve Çizelge 4.2.5.2 ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin asitli su ve metanol ekstraktlarında ABTS yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite değerlerini göstermektedir.



Şekil 4.2.5.1. ABTS metodu ile yapılan antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.5.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının ABTS yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	67,98±0,17e	83,66±1,08cd	64,36±1,73e	65,44±0,27e	69,70±1,03e	12,12*
Metanol Ekstraktı	86,66±1,79bc	98,56±3,07b	72,92±1,85de	74,25±1,47de	117,07±0,94a	

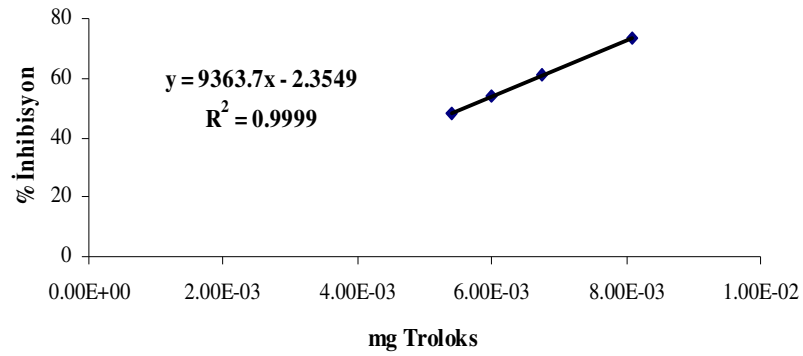
Çizelge 4.2.5.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının ABTS yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	27,54±0,81bc	28,56±1,11b	33,51±0,79a	31,41±0,94a	2,12*
Metanol Ekstraktı	19,50±1,29e	21,89±0,79d	26,26±0,65c	21,99±1,23d	

4.2.6. DPPH Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ekstraktlar üzerine uygulanan diğer antioksidan aktivite tayin yöntemi fenolik bileşiklerin serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH kullanılarak metanol içinde gerçekleşen reaksiyonun spektrofotometrede 515 nm’de ölçülmesiyle yapılmıştır. Ölçümler sonucunda hem standartlar hem de ekstraktlar için 3.2.5.5.2-1 eşitliğine göre % inhibisyon değerleri hesaplanır. Kalibrasyon grafiği 0,0027-0,0080 mg konsantrasyon aralığında hazırlanan troloks çözeltileri kullanılarak Şekil 4.2.6.1’de gösterildiği şekilde çizilmiştir. Ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri bu kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak μmol troloks/g örnek olarak hesaplanır.

DPPH Antioksidan aktivite kalibrasyon grafiği



Şekil 4.2.6.1. DPPH metodu ile yapılan antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.6.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

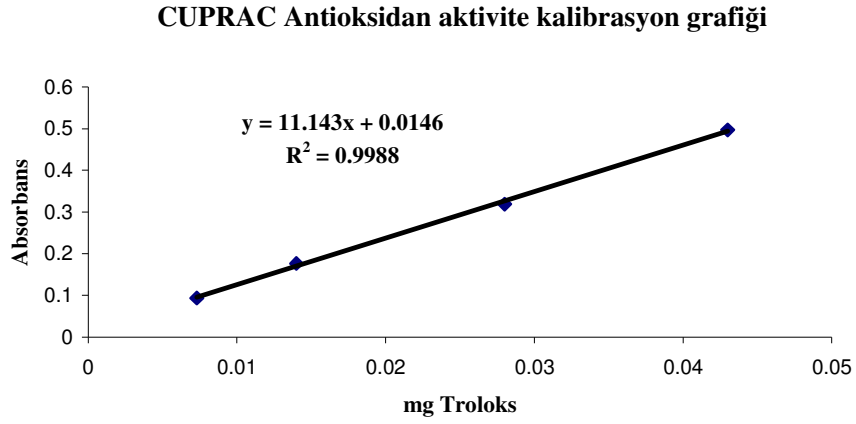
	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	76,60±0,26 d	89,13±0,15 c	64,14±0,98 e	66,04±1,80 e	77,56±1,25 d	7,35*
Metanol Ekstraktı	122,37±3,27 b	121,91±2,95 b	96,65±4,43 c	81,17±1,50 d	127,59±1,84 a	

Çizelge 4.2.6.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının DPPH yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	103,32±1,80 f	90,95±1,04 g	121,33±1,74 e	123,39±1,02 de	4,28*
Metanol Ekstraktı	126,00±2,51 d	135,24±1,62 c	153,70±1,68 b	177,11±3,17 a	

4.2.7. CUPRAC Metodu ile Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin asitli su ve asitli metanol ekstraktlarının Cu(II) iyonlarını Cu(I) iyonlarına indirgeme kapasitesi olarak bilinen Cuprac metodunda, farklı konsantrasyonlardaki troloks ve ekstraktların 450 nm deki absorbansları ölçüldü. Şekil 4.2.7.1' de gösterilen kalibrasyon grafiği için 0,0073-0,043 mg aralığında troloks çözeltileri hazırlandı ve ekstraktlar için antioksidan aktivite değeri çizilen kalibrasyon denklemini kullanılarak µmol troloks/g örnek olarak Çizelge 4.2.7.1' de verilmektedir.



Şekil 4.2.7.1. CUPRAC metodu ile antioksidan aktivite tayininde kullanılan troloks kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.2.7.1. Ahududu çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

	Aksu Kırmızısı	Newburgh	Rubin	Heritage	Hollanda Boduru	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	57,78 \pm 0,17fg	63,47 \pm 0,39f	47,16 \pm 0,45h	50,13 \pm 1,65h	52,14 \pm 0,40gh	5,79*
Metanol Ekstraktı	80,83 \pm 0,60c	90,79 \pm 0,90b	75,03 \pm 0,79d	69,54 \pm 1,94e	108,04 \pm 2,32a	

Çizelge 4.2.7.2. Böğürten çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının CUPRAC yöntemi ile tayin edilen antioksidan aktivite miktarları (μmol troloks/g taze meyve)

	Bursa 1	Bursa 2	Chester	Jumbo	LSD (p<0.01)
Su Ekstraktı	60,02 \pm 0,65f	59,99 \pm 0,71f	77,70 \pm 0,47e	79,49 \pm 0,95 e	3,08*
Metanol Ekstraktı	93,12 \pm 1,47d	97,72 \pm 2,78c	107,55 \pm 1,03b	127,15 \pm 0,57a	

Elde edilen tüm antioksidan aktivite sonuçları değerlendirildiğinde metanol ekstraktlarının antioksidan aktivite değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca çeşitlerin antioksidan aktivite değerleri DPPH metodu ile tayin edildiğinde ABTS ve CUPRAC metotlarında tayin edilen değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

4.2.8. Standart Fenolik Bileşiklerin Toplam ve Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin asitli su ve/veya asitli metanol ekstraktlarında tayin edilen fenolik maddelerinin (ellagik asit, ferulik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, *p*-hidroksibenzoik asit ve kuersetin) ve bu fenolik maddelerle hazırlanan karışımın toplam fenol ve antioksidan aktiviteleri ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile tayin edilmiştir. Çizelge 4.2.8.1 standart fenolik maddelerin toplam fenol ve antioksidan aktivite sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 4.2.8.1 Standart fenolik bileşiklerin toplam fenol ve antioksidan aktivite sonuçları

Fenolik maddeler (0,05 mg/L)	Toplam fenol (μmol gallik asit)	ABTS (μmol troloks)	DPPH (μmol troloks)	CUPRAC (μmol troloks)
Ellagik asit	1,571	0,101	0,024	0,085
Ferulik asit	1,193	0,070	0,008	0,047
Kafeik asit	1,167	0,089	0,014	0,054
<i>para</i> -Kumarik asit	0,980	0,062	0,002	0,035
<i>para</i> -Hidroksibenzoik asit	0,434	0,051	0,001	0,008
Kuersetin	1,236	0,089	0,017	0,081
Toplam	7,181	0,462	0,066	0,310
Karışım	3,168	0,226	0,040	0,289

Çizelge 4.2.8.1 çalışılan fenolik bileşikler içerisinde ellagik asidin tüm metotlarla tayin edilen antioksidan aktivite değerinin en yüksek olduğu göstermektedir. Ellagik asit toplam fenol de en yüksek olan fenolik asittir. Ayrıca fenollerin her biri için bulunan toplam fenol değerleri ile karışım için bulunan değer karşılaştırıldığında metodun toplanabilirlik özelliği göstermediği bulunmuştur. Fenollerin antioksidan aktivite değerleri ile karışımın aktivite değeri karşılaştırılmış ve toplanabilirlik özelliğinin ABTS ve DPPH metotlarında görülmediği CUPRAC metodunun ise bu özelliği büyük ölçüde sağladığı bulunmuştur.

4.3. Korelasyon Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit içeriklerinin her biri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki elde edilen sonuçların korelasyon değerleri hesaplandı. Çizelge 4.3.1, Çizelge 4.3.2, Çizelge 4.3.3, ve Çizelge 4.3.4 değerleri sırasıyla ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarının fenolik bileşimleri ile antioksidan aktivite arasındaki ilişkisini göstermektedir. Ayrıca standart fenolik maddelerin antioksidan aktiviteleri değerleri üzerine korelasyon hesaplaması yapılarak metotlarında birbiri ile olan ilişkisi Çizelge 4.3.5’ de incelendi.

Çizelge 4.3.1. Ahududu çeşitlerinin su ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki

Su Ekstraktı						
	ABTS	DPPH	CUPRAC	DPPH/ ABTS	DPPH/ CUPRAC	ABTS/ CUPRAC
Toplam Fenol	0.14	0.18	-0.11	0.18	0.76	0.46
Toplam Flavonoid	0.15	0.35	0.21	0.58	0.49	-0.12
Toplam Antosiyanin	0.61	0.55	0.49	0.14	0.31	0.15
Askorbik asit	-0.57	-0.56	-0.72	-0.24	0.23	0.45
Toplam Fenol/ Toplam Flavonoid	-0.01	-0.08	-0.22	-0.18	0.29	0.39
Toplam Fenol/ Toplam Antosiyanin	-0.36	-0.40	-0.41	-0.26	-0.12	0.12
Toplam Fenol/ Askorbik asit	0.34	0.35	0.15	0.18	0.58	0.29

Çizelge 4.3.2. Ahududu çeşitlerinin metanol ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki

Metanol Ekstraktı						
	ABTS	DPPH	CUPRAC	DPPH/ ABTS	DPPH/ CUPRAC	ABTS/ CUPRAC
Toplam Fenol	0.72	0.05	0.60	-0.54	-0.82	0.18
Toplam Flavonoid	-0.34	0.60	0.51	0.71	0.28	-0.85
Toplam Antosiyanin	-0.42	0.56	0.38	0.75	0.41	-0.81
Askorbik asit	-0.76	-0.18	-0.31	0.50	0.23	-0.48
Toplam Fenol/ Toplam Flavonoid	0.53	-0.65	-0.39	-0.90	-0.53	0.94
Toplam Fenol/ Toplam Antosiyanin	0.53	-0.63	-0.37	-0.55	-0.88	0.91
Toplam Fenol/ Askorbik asit	0.90	0.16	0.48	-0.52	-0.63	0.47

Çizelge 4.3.3. Böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki

Su Ekstraktı						
	ABTS	DPPH	CUPRAC	DPPH/ ABTS	DPPH/ CUPRAC	ABTS/ CUPRAC
Toplam Fenol	0.54	0.49	0.56	0.06	-0.31	-0.60
Toplam Flavonoid	0.93	0.91	0.93	0.31	-0.30	-0.95
Toplam Antosiyanin	0.98	0.93	0.98	0.23	-0.39	-0.97
Askorbik asit	0.92	0.82	0.91	0.06	-0.50	-0.90
Toplam Fenol/ Toplam Flavonoid	-0.98	-0.97	-0.98	-0.39	0.24	0.98
Toplam Fenol/ Toplam Antosiyanin	-0.98	-0.92	-0.97	-0.24	0.37	0.96
Toplam Fenol/ Askorbik asit	-0.75	-0.65	-0.74	-0.02	0.42	0.71

Çizelge 4.3.4. Böğürtlen çeşitlerinin metanol ekstraktlarında fenolik bileşim ve antioksidan aktivite arasındaki ilişki

Metanol Ekstraktı						
	ABTS	DPPH	CUPRAC	DPPH/ ABTS	DPPH/ CUPRAC	ABTS/ CUPRAC
Toplam Fenol	0.33	0.20	0.31	-0.59	-0.61	0.38
Toplam Flavonoid	0.90	0.85	0.89	0.21	0.16	-0.37
Toplam Antosiyanin	0.97	0.99	0.97	0.71	0.63	-0.87
Askorbik asit	0.29	0.42	0.31	0.97	0.98	-0.72
Toplam Fenol/ Toplam Flavonoid	-0.93	-0.91	-0.92	-0.44	-0.41	0.51
Toplam Fenol/ Toplam Antosiyanin	-0.80	-0.88	-0.82	-0.90	-0.85	0.97
Toplam Fenol/ Askorbik asit	-0.18	-0.32	-0.20	-0.93	-0.96	0.67

Elde edilen sonuçlara göre ahududu çeşitlerinin su ekstraktında antioksidan aktivite ile toplam antosiyanin arasında pozitif, askorbik asit arasında negatif korelasyona bulunmuştur. Ancak antioksidan aktivite ile toplam fenol ve toplam flavonoid önemli bir korelasyon göstermediği ve metanol ekstraktlarında ise antioksidan aktivite toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ile pozitif, askorbik asit ile negatif korelasyona sahip olduğu Çizelge 4.3.1’ de görülmektedir. Çizelge 4.3.2’de ise böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktında antioksidan aktivite ile toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit arasında oldukça önemli pozitif korelasyona bulunmaktadır. Metanol ekstraktında ise antioksidan aktivite sadece toplam flavonoid ve toplam antosiyanin ile yüksek pozitif korelasyon gösterirken toplam fenol ve askorbik asit ile önemli bir korelasyon bulunmamaktadır.

Çizelge 4.3.5. Standart fenolik bileşiklerin toplam fenol ve antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

	Toplam fenol	ABTS	DPPH	CUPRAC
Toplam fenol	1			
ABTS	0.90	1.00		
DPPH	0.86	0.98	1.00	
CUPRAC	0.93	0.94	0.94	1.00

Çizelge 4.3.5 toplam fenol ile antioksidan aktivite metotları ile hem de antioksidan aktivite metotlarının birbiri ile oldukça yüksek pozitif korelasyona sahip olduğunu göstermektedir.

4.4 İstatistiksel Analiz Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit ve antioksidan aktivitelerinin su ve metanol ekstraktlarında tayin edilen değerlerinin istatistiksel analizleri Minitab ve MSTAT-C programları uygulanarak yapılmıştır. Tayin edilen her bir parametre çeşitler arasında değerlendirildiğinde benzerlik ve farklılıklar olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

5.1. LC-MS Sonuçları

5.1.1. Ekstraksiyon Metotlarının Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinde Bulunan Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi

Çözücü ekstraksiyonu meyvelerde bulunan fenolik asitler ve flavonoidleri de içine alan çeşitli bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın kullanılan bir metottur. Fenolik bileşikler polar moleküllerdir ve dolayısıyla bu bileşiklerin ekstraksiyonunda en yaygın su, metanol ve bunların farklı oranlardaki karışımları ile asitli çözücüler kullanılır. Asitli çözücü ekstraksiyonunun fenolik bileşiklerin asetil ve glikozit bağlarını kırabildiği ve fenolik bileşiklerin serbest hale geçmesini sağladığı belirtilmiştir (Rommel ve Wrolstad 1993a). Su ve metanol ekstraksiyonlarının ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşiklerinin miktarlarına olan etkisi Şekil 4.1.2.2 ve Şekil 4.1.2.3 'de görülmektedir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin su ve metanol ekstraktlarında ortak olarak ellagik asit, ferulik asit, kafeik asit ve kuersetin tayin edilmiştir. *para*-Kumarik asit her iki türün su ekstraktlarında tayin edilirken metanol ekstraktlarında gözlenmemiştir. *para*-Hidroksibenzoik asit ise sadece ahududu çeşitlerinin su ekstraktlarında tayin edilmiştir. Fenolik bileşikler tek olarak değerlendirildiklerinde su ve metanol ekstraksiyonları arasında istatistiksel olarak en yüksek farklılık ellagik ve ferulik asit için gözlenmiştir. Taze ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin su ekstraksiyonunun metanol ekstraksiyonundan kafeik asit için iki kat, ellagik ve ferulik asit için üç kat daha verimli olduğu bulunmuştur. Benzer sonuçlar ilk dondurulmuş ve altı ay süreyle muhafaza edilmiş meyve örnekleri için de gözlenmiştir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin metanol ekstraktında *para*-kumarik ve *para*-hidroksibenzoik asit tayin edilmemiştir. Dolayısıyla üzümü meyvelerden hidroksisinnamik asitlerin (*para*-kumarik, ferulik ve kafeik asit) ve hidroksibenzoik asitlerin (*para*-hidroksibenzoik asit) ekstraksiyonunda uygun çözücünün su olduğunu düşünmekteyiz. Buna karşın kuersetinin su ve metanol ekstraksiyonları arasında önemli istatistiksel fark bulunmamıştır. Bu durumda ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin flavonol ekstraksiyonu için su ve metanolün her ikisi de çözücü olarak kullanılabilceği sonucuna varılabilmektedir.

5.1.2. Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin Fenolik Bileşik İçeriği

Ahududu (Aksu kırmızısı, Newburgh, Rubin, Heritage, Hollanda boduru) ve böğürtlen (Bursa 1, Bursa 2, Chester ve Jumbo) çeşitlerinin fenolik bileşikleri taze, ilk dondurulmuş ve altı ay süreyle muhafaza edilerek LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Ahududu çeşitlerinin su ekstraktında ellagik asit, ferulik asit, *para*-kumarik asit, kafeik asit, *para*-hidroksibenzoik asit ve kuersetin (Çizelge 4.1.2.1), metanol ekstraktında ise *para*-kumarik ve *para*-hidroksibenzoik asit dışında diğer fenolik bileşikler tayin edilmiştir (Çizelge 4.1.2.2). Böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktında ellagik asit, ferulik asit, kafeik asit, *para*-kumarik asit ve kuersetin tayin edilirken *para*-hidroksibenzoik asit tayin edilmemiştir (Çizelge 4.1.2.3). Metanol ekstraktında ise sadece *para*-kumarik asit tayin edilmemiştir (Çizelge 4.1.2.4). Ellagik asit ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin temel fenolik maddesi olarak bulunmuştur ve 727, 90±9,21 mg/kg meyve (Rubin) ile 1828, 07±23,73 mg/kg meyve (Chester) arasında değişen değerlere sahiptir. Ahududu çeşitlerinin metanol ekstraktı ile tayin edilen ellagik asit değeri literatürde yapılmış çalışmalara uyum göstermektedir (Daniel ve ark. 1989, Hakkinen ve ark. 1999). Ancak su ekstraktı ile çok daha fazla miktarda ellagik asit tayin edilmiştir. Bu durumda fenolik bileşiklerin polar çözücülerde daha fazla çözüldüğü söylenebilir. Böğürtlen çeşitleri için tayin edilen ellagik asit değeri ise daha önce yapılan çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur (Sellapan ve ark. 2002). Bu farklılığın çeşitlerin ve yetiştirilme koşullarının, uygulanan ekstraksiyon ve analiz metotlarının farklılıklarından kaynaklandığı söylenebilir. Elde edilen verilerle yapılan istatistiksel çalışmada ($p < 0.01$) ahududu ve böğürtlen çeşitleri arasında önemli fark olduğunu ve böğürtlendeki fenolik bileşik içeriğinin ahudududan farklı ve daha fazla olduğu açıkça görülmektedir. Çeşitler arasındaki ellagik asit konsantrasyonunun dağılımı serbest ellagik asit olarak yansımaktadır. Üzümsü meyvelerde ellagik asit; serbest ellagik asit, ellagik asit glikozitleri ve heksahidroksidifenik asidin şekerle esterleşerek oluşturduğu ellagitannin yapılarında bulunduğu belirtilmektedir (de Ancos ve ark. 2000, Hakkinen ve ark. 1999b, Rommel ve Wrolstad 1993c). Ellagitanninler asit ile muamele edildiğinde şeker ve heksahidroksifenik asite hidroliz olduğu ve bu yapı kendiliğinden ellagik aside laktonlaştığı bilinmektedir (Şekil 2.1.2.2.2). Dolayısıyla ellagik asit türevlerinin miktarı asit hidrolizden sonra ellagik asit eşdeğeri olarak belirlenir. Ahududu çeşitlerinin taze

meyvelerinin ellagik asit miktarı değerlendirildiğinde Heritage çeşidinin ($1350,36 \pm 13,85$ mg/kg) diğer çeşitlerden (Aksu kırmızısı $1018,75 \pm 20,16$ mg/kg, Newburgh $898,51 \pm 17,12$ mg/kg, Hollanda boduru $864,24 \pm 3,63$ mg/kg, Rubin $727,90 \pm 9,21$ mg/kg) daha fazla miktarda ellagik asit içerdiği bulunmuştur. Aksu kırmızısı, Rubin ve Heritage çeşitlerinin ellagik asit içerikleri arasında istatistiksel farklılıklar varken Newburgh ve Hollanda boduru çeşitlerinde önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Ellagik asit böğürtlen çeşitlerinde de tayin edilmiştir ve taze meyve örneklerinde en fazla ellagik asit miktarı Chester çeşidinde bulunmuştur (Çizelge 4.1.2.3). Taze böğürtlen çeşitlerinin ellagik asit içerikleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ($p < 0,01$) Bursa 2 ve Chester arasında istatistiksel fark bulunuyorken Bursa 1 ve Jumbo çeşitleri arasında önemli farklar görülmemiştir. Ellagik asidin kırmızı ahududu meyvelerinin temel fenolik maddesi olduğu ve fenolik bileşiminin %88 ini oluşturduğu belirtilmiştir (Häkkinen ve ark.1999b). Çalışmada ahududu çeşitleri için bulunan ellagik asit sonuçları daha önce yapılmış çalışmalardan oldukça yüksektir (de Ancos ve ark. 2000, Häkkinen ve ark. 1999b, Rommel ve Wrolstad 1993a).

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde üç hidrokisisinnamik asit (kafeik, ferulik ve *para*-kumarik asit) ve iki hidrosibenzoik asit (*para*-hidrosibenzoik asit ve protokatekuik asit) analiz edildi. Üzümsü meyvelerde, hidrosinnamik ve hidrosibenzoik asitler glikozitler ya da glikozla ester yapılarında bulunurlar (Rommel ve Wrolstad 1993a). Asit hidroliz fenolik asitlerin glikozitlerini ve esterlerini aglikonlarına ya da serbest fenoliklere dönüştürür. Hidrokisisinnamik asit miktarı ahududu çeşitlerinde $90,11 \pm 2,27$ mg/kg taze meyve (Hollanda boduru) ile $820,78 \pm 10,65$ mg/kg taze meyve (Newburgh) aralığında değişim göstermektedir (Çizelge 4.1.2.1 ve Çizelge 4.1.2.2). Böğürtlen çeşitlerinde ise $112,60 \pm 2,99$ mg/kg taze meyve (Bursa 1) ile $877,45 \pm 1,26$ mg/kg taze meyve aralığında değişmektedir (Çizelge 4.1.2.3 ve Çizelge 4.1.2.4). Ferulik ve kafeik asit Newburgh çeşidinde, *para*-kumarik asit ise Aksu Kırmızı taze meyvelerinde en fazla miktarda bulunmaktadır. Böğürtlen çeşitlerinde ise *para*-kumarik asit $287,15 \pm 2,93$ mg/kg taze meyve (Bursa 1) ile $877,45 \pm 1,26$ mg/kg taze meyve (Chester) arasında sahip olduğu miktarıyla önemli fenolik bileşik olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerde tayin edilen diğer hidrokisisinnamik asit miktarlarının ise, ferulik asit $413,82 \pm 11,90$ mg/kg taze meyve (Bursa 1) ile $757,69 \pm$

4.34 mg/kg taze meyve (Jumbo) arasında, kafeik asit ise $377,89 \pm 4,40$ mg/kg taze meyve (Bursa 1) ile $736,85 \pm 6,93$ mg/kg taze meyve (Chester) arasında değiştiği bulunmuştur. Ahududu eşitlerinin *para*-hidroksibenzoik asit miktarı $534,20 \pm 8,95$ mg/kg taze meyve (Aksu kırmızısı) ile $233,29 \pm 7.57$ mg/kg taze meyve (Heritage) arasındadır. Rubin ve Heritage eşitlerinin *para*-hidroksibenzoik asit içeriği istatistiksel olarak ($p < 0.01$) değerlendirildiğinde fark bulunmamıştır. Ayrıca *para*-hidroksibenzoik böğürtlen çeşitlerinde diğer hidroksibenzoik asit türevi olan protokatekuik asit ise ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde tayin edilmemiştir.

Üzümsü meyvelerde en fazla miktarda bulunduğu belirtilen flavonoidler flavonollardır (kuersetin, kamferol ve mirisetin) ve çalışılan beş ahududu ve dört böğürtlen çeşidinde analiz edilmiştir. Kamferol ve mirisetin ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde tayin edilmemiştir. Kuersetinin ise ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin temel flavonol maddesi olduğu belirlenmiştir. Ahududu eşitlerinde su ve metanol ekstraktında sadece Heritage ve Hollanda bodurunun kuersetin içerdiği bulunmuştur (izelge 4.1.2.1 ve izelge 4.1.2.2). Böğürten eşitlerinde ise kuersetin $56,78 \pm 2,32$ mg/kg taze meyve (Bursa 1) ile $74,69 \pm 2,71$ mg/kg taze meyve (Chester) arasında sahip olduğu değerle ahududu çeşitlerinden daha fazla flavonol içerdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar metanol ekstraktlarının daha fazla flavonol miktarına sahip olduğunu göstermektedir. Üzümsü meyvelerde flavonollar glikozit yapılarında bulunurlar (Rommel ve Wrolstad 1993b). Flavonoid glikozitlerin suda flavonoid aglikonların ise metanolde daha fazla çözündüğü belirtilmektedir (Hertog ve ark. 1992a). Glikozitler kuvvetli asitlerle aglikonlarına hidroliz edilebilir. Dolayısıyla hidroliz sonrası oluşan aglikonlar metanol ekstraktında daha fazla bulunurlar. Çeşitler için ifade edilen kuersetin miktarı da hidroliz sonrası serbest kalan aglikon (kuersetin) eşdeğerindedir. Flavonoid sınıfının eser miktarda bulunduğu belirtilen üyesi flavan-3-ol; (+)-kateşin ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde analiz edilmiştir ancak hiçbir çeşitte tayin edilmemiştir.

5.1.3. Donmuş Muhafazanın Ahududu ve Böğürtlen Bulunan Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin taze, ilk donmuş ve 6 ay süreyle muhafaza edilmiş örneklerinin ellagik asit miktarı değerlendirildiğinde; 6 ay süreyle -22°C de muhafaza edilen ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin taze meyvelerinde tayin edilen değerlerinden oldukça düşük ellagik asit miktarında sahip oldukları ve dolayısıyla dondurma işleminin ellagik asit miktarına etki ettiği görülmüştür. Donmuş muhafaza süresince meydana gelen bu düşüşün serbest ellagik asidin metalik katyonlarla (Mg^{+2} ve Ca^{+2} gibi) reaksiyona girerek metal şelatlayıcı bileşikler olarak davranması ve serbest radikallerle reaksiyona girmesi ile açıklanmaktadır (Häkkinen 2000b, Rommel ve Wrolstad 1993c). Ayrıca üzüksü meyvelerde de bulunan polifenoloksidaz enzimi meydana gelen bu azalışta etkili olduğu da belirtilmektedir (de Ancos ve ark. 2000). Polifenoloksidaz enzimi bitkinin hücre duvarına bağlı olarak bulunur ve hücresel yıkımla serbest kalabilir (de Ancos ve ark. 2000). Hasar görmüş hücrelerden serbest kalan polifenoloksidaz enzimi moleküler oksijen varlığında polifenollerini kinon yapılarına oksitler ve fenolik miktarda azalma gözlenebilir. Bu karşın, bazı çeşitlerin muhafaza edilmiş örneklerinin ellagik asit değeri ilk dondurulmuş örneklerden daha yüksek olarak bulunmuştur. Ellagik asit içeriğinde meydana gelen bu az miktardaki değişim ellagitanninlerin bozulması ve dolayısıyla serbest kalan heksahidroksidifenik asidin ellagik aside dönüşmesi ile açıklanabilir. Yüksek ellagik asit içeriğin diğer bir sebebinin ise hücre duvarına bağlı olarak bulunan ellagik asidin muhafaza süresince hasar gören hücre duvarından serbest kalması ve daha kolay ekstrakte edilebilmesi olarak belirtilmiştir (de Ancos ve ark. 2000, Häkkinen ve ark. 2000b, Mullen ve ark. 2002, Rommel ve Wrolstad 1993c, Zafrilla ve ark. 2001). Bursa 1 böğürtlen çeşidinin ellagik asit içeriği ilk dondurulmuş örneklerde önemli azalma göstermiş ancak 6 ay süreyle muhafaza edilen örnekler analiz edildiğinde daha yüksek ellagik asit miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Diğer böğürtlen çeşitlerinde ise ellagik asit miktarı muhafaza süresince aşamalı olarak azalış göstermektedir. Çeşitler arasında ellagik asit içeriğinde muhafaza süresine karşı gösterilen bu değişim çeşitsel farklılıktan, iklim ve çevre faktörlerinden kaynaklanabilmektedir.

Ahududu çeşitlerinde tayin edilen ferulik, kafeik ve *para*-kumarik asit içeriğinin ilk dondurulmuş örneklerde taze örneklerden daha düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1.2.1 ve Çizelge 4.1.2.2). Ancak Aksu kırmızısı, Rubin, Newburgh ve Heritage çeşitlerinin altı ay süreyle muhafaza edilen örneklerinde ferulik, kafeik ve *para*-kumarik asit miktarlarında artış olduğu gözlenmiştir. Böğürtlen çeşitleri değerlendirildiğinde Bursa 1 çeşidinin en düşük *para*-kumarik asit miktarına sahip olduğu ve kafeik asit miktarının muhafaza süresince ilk donmuş örneklere göre daha fazla miktarda olduğu bulunmuştur. Dondurma işlemi böğürtlen çeşitlerinin *para*-kumarik asit miktarı üzerine farklı şekilde etki etmektedir. Bursa 2 çeşidinde muhafaza süresince aşamalı azalış meydana gelmiştir. Bursa 1, Chester ve Jumbo çeşitlerinde ise altı ay -22°C de muhafaza edilmiş örnekler ilk dondurulmuş örneklerden daha fazla *para*-kumarik asit içermektedir. Üzümsü meyveler ferulik, kafeik ve *para*-kumarik asit miktarında gözlenen bu artış ya diğer fenolik bileşiklerden daha kararlı olmaları ya da matriksden daha iyi serbest kalabilmeleri ile açıklanabilmektedir (Bunea ve ark. 2008). Ayrıca taninler ve flavonoidler gibi fenolik asit içeren kompleks yapıların (Bunea ve ark. 2008) ya da fenolik gruplar içeren supramoleküler grupların bozulması (Bunea ve ark. 2008) ve hücre yapılarının bozulması da ifade edilen diğer sebeplerdir. Ancak muhafaza süresince fenoliklerin hücre duvarından serbest kalan polifenoloksidaz enziminin moleküler oksijen varlığında kinon yapılarına oksitlenebilmesi ile açıklanan miktarsal azalmalar fenolik asitler üzerinde meydana gelen negatif etki olarak değerlendirilmektedir. *para*-Hidroksibenzoik asit sadece ahududu çeşitlerinde tayin edilmiştir ve muhafaza süresince miktarı aşamalı olarak azalmıştır. *para*-Hidroksibenzoik miktarının donmuş muhafaza süresince Rubin ve Hollanda boduru çeşitleri arasında istatistiksel farklılığı bulunmazken Aksu kırmızısı, Newburgh ve Heritage çeşitlerinin ilk donmuş ve muhafaza edilmiş örneklerinde farklılıklar meydana gelmiştir.

Kuersetin Heritage ve Hollanda boduru ahududu çeşitleri (Çizelge 4.1.2.1 ve Çizelge 4.1.2.2) ile böğürtlen çeşitlerinin tümünde taze, ilk donmuş ve altı ay süreyle -22°C de muhafaza edilmiş örneklerinde tayin edilmiştir (Çizelge 4.1.2.3 ve Çizelge 4.1.2.4). Heritage çeşidinin donmuş muhafaza süresi sonunda su ve metanol ekstraktlarından tayin edilen kuersetin miktarının taze ve ilk donmuş örneklerinden daha

fazla bulunmuştur. Heritage ve Hollanda boduru çeşitlerinin ilk dondurulmuş ve muhafaza edilmiş örneklerinde istatistiksel farklılıklar gözlenmiştir. İlk dondurulmuş örneklerde tayin edilen azalan kuersetin miktarının sebebi üzümü meyvelerin düşük C vitamini içeriği ile açıklanmaktadır (Häkkinen ve ark. 2000a). Muhafaza süresince antioksidan olarak davranan C vitamininin yüksek miktarının kuersetinin bozulmasını engelleyebildiği belirtilmektedir (Häkkinen ve ark. 2000a). Ayrıca muhafaza süresince enzimatik ya da oksidatif reaksiyonlarla bozunabilen kuersetinin miktarsal azalması gözlenebilir. Bu karşın Hollanda boduru ve Heritage ahududu çeşitlerinin kuersetin miktarında muhafaza süresince artış gözlenmiştir. Meydana gelen bu artış; muhafaza süresince hücre yapılarının bozulması ve dolayısıyla daha kolay hidroliz ve ekstrakte edilebilmesi ile açıklanabilmektedir (Häkkinen ve ark. 2000a). Böğürtlen çeşitlerinde en yüksek kuersetin miktarı Chester çeşidinde tayin edilmiştir. Sadece Bursa 2 çeşidinin ilk donmuş örneklerinde azalış gösterirken Bursa 2, Chester ve Jumbo çeşitlerinde ise artış gözlenmiştir. Bursa 1 ve Jumbo çeşitlerin ilk donmuş örneklerinde taze örneklerinden daha fazla miktarda kuersetin tayin edilmiştir.

5.2. UV-VIS Sonuçları

5.2.1. Toplam Fenol, Toplam Flavonoid, Toplam Antosiyanin ve Askorbik Asit Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen türlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit miktarları hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktları üzerinde spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin gallik asit eşdeğerinde tayin edilen toplam fenol değerleri arasında önemli miktarsal farklılıklar ve böğürtlen çeşitleri ahududu çeşitlerinden daha yüksek toplam fenol değerine sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan asitli su ve asitli metanol ekstraktlarının toplam fenol değerleri karşılaştırıldığında metanol ekstraktında daha fazla toplam fenol değeri tayin edilmiştir. Bu sonuç çalışılan çeşitlerin içerdiği fenolik bileşiklerin metanolde daha fazla çözünerek ekstrakte edilebildiğini ve ekstrakte edilen fenoliklerin uygulanan tayin

metodunda ölçülebildiği ile açıklanabilir. Çeşitlerin toplam fenol içerikleri karşılaştırıldığında Aksu kırmızısı çeşidinin su ekstraktının en düşük (1040.95 ± 15.91 mg gallik asit/100g taze meyve), Hollanda boduru çeşidinin metanol ekstraktının ise en yüksek (2062.27 ± 4.13 mg gallik asit/100g meyve) toplam fenol değerine sahip olduğu bulunmuştur. Diğer çeşitlerin toplam fenol miktarı ise bu değerler arasında yer almaktadır (Çizelge 4.2.1.1). Newburgh çeşidinin metanol ekstraktı ile Hollanda boduru çeşidinin su ekstraktı arasında istatistiksel fark bulunmazken diğer çeşitlerin su ve metanol ekstraktları arasında önemli istatistiksel farklar bulunmuştur. Böğürtlen çeşitlerinde ise Jumbo en yüksek toplam fenol miktarına sahipken bu değeri sırasıyla Bursa 2, Bursa1 ve Chester izlemektedir. Ayrıca bu çeşitler için yapılan istatistiksel analizde Bursa 1, Bursa 2 ve Chester su ekstraktları ile Bursa 1 ve Bursa 2 arasında istatistiksel fark meydana gelmemiştir (Çizelge 4.2.1.2).

Toplam flavonoid miktarı ahududu çeşitlerinde 15.41 ± 0.12 - 41.08 ± 0.92 mg (+) kateşin/100 g taze meyve olarak böğürtlen çeşitlerinde ise 29.07 ± 0.49 - 82.21 ± 1.34 mg (+) kateşin/100 g taze meyve aralığında bulunmuştur. Ahududu çeşitleri arasında en yüksek toplam flavonoid miktarı Hollanda boduru için tayin edilmiştir (Çizelge 4.2.2.1). Aksu kırmızısı ve Hollanda boduru çeşitlerinin su ekstraktları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. Ancak diğer çeşitler arasında önemli istatistiksel farklar meydana geldiği görülmüştür. Heritage için su ve metanol ekstraktlarında tayin edilen toplam flavonoid miktarı literatürde belirtilen değerlerden daha düşüktür (Liu ve ark. 2002). Ekstraksiyon metotlarının, meyvenin yetiştirildiği çevre (ışık, sıcaklık ve toprakta bulunan mineraller gibi) ve iklim koşulların miktarsal içerikte etkili olabileceği söylenebilir. Üzümsü meyvelerde flavonoidler genellikle glikozitleri olarak bulunur ve uygulanan asitli ekstraksiyon metoduyla aglikonlarına hidrolizlenebilir. Flavonoid aglikonlarının da metanolde daha fazla çözüldüğü belirtilmektedir (Hertog ve ark. 1992a). Elde edilen sonuçlara göre ekstraksiyon metotlarının toplam flavonoid içeriği değerlendirildiğinde metanol ekstraktının sudan yaklaşık iki kat daha verimli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2.2.1 ve Çizelge 4.2.2.2). Çeşitlerde bulunan glikozit yapılarının uygulanan asitli ekstraksiyon metoduyla aglikonlarına hidrolizlenebildiği dolayısıyla metanol de daha fazla ekstrakte edilebildikleri sonucuna varılmaktadır.

Antosiyeninler, çoğu meyve, sebze ve çiçeklerin kırmızıdan maviye kadar değişen renklerini oluşturan ve suda çözünen doğal pigmentlerdir (Costa ve ark. 2000, Fuleki ve Francis 1968). Ahududu ve böğürtlene de rengini veren antosiyenin grubu maddelerdir (Sapers ve ark. 1985). Çalışmada antosiyenin miktarının ahududu çeşitlerinde siyanidin-3-glukozit cinsinden $12,42 \pm 0,28$ - $69,47 \pm 0,47$ siyanidin-3-glukozit /100 g taze meyve (Çizelge 4.2.3.1) aralığında, böğürtlen çeşitlerinde ise $41,29 \pm 0,27$ - $87,07 \pm 0,99$ mg siyanidin-3-glukozit /100 g taze meyve (Çizelge 4.2.3.2) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar antosiyenin miktarının böğürtlen çeşitlerinde daha fazla olduğunu göstermektedir. Antosiyeninler suda çözünebilir maddelerdir ve dolayısıyla bitki ya da meyvelerden su, metanol ve ya bunların belirli oran karışımları ile asitli çözücüler ile ekstrakte edilirler. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde tayin edilen toplam antosiyenin miktarında ekstraksiyon verimi karşılaştırıldığında, su ekstraktının metanol ekstraktında yaklaşık iki kat daha verimli olduğu bulunmuştur. Bu sonuç ile üzümü meyvelerin antosiyenin tayini için su ekstraktının daha verimli olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Üzümü meyvelerde bulunan ve antioksidan özelliği olduğu belirtilen diğer madde askorbik asittir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin askorbik asit miktarı indofenol-ksilen metodu kullanılarak bulunmuştur. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin birbirine yakın askorbik asit içeriğine sahip oldukları Çizelge 4.2.4.1 ve Çizelge 4.2.4.2' de görülmektedir. Ahududu çeşitlerinin askorbik asit miktarı $18,49 \pm 1,44$ - $34,81 \pm 1,11$ mg askorbik asit/100 g taze meyve aralığında bulunmuştur ve en düşük askorbik asit miktarına sahip olan çeşit ise Newburgh olarak tayin edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde Newburgh ve Heritage çeşitlerinin su ekstraktları ile Aksu kırmızısı ve Heritage çeşitlerinin metanol ekstraktları arasında istatistiksel fark gözlenmezken diğer çeşitler arasında istatistiksel farklar olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2.4.1). Böğürtlen çeşitlerinin askorbik asit miktarları arasında en yüksek değer Chester ve Jumbo çeşitlerinin su ekstraktlarına aittir ve aralarında istatistiksel olarak da fark yoktur (Çizelge 4.2.4.2). Ahududu çeşitleri için tayin edilen askorbik asit değerleri literatürde belirtilen çeşitlerin değerleri ile uyum göstermektedir (de Ancos ve ark. 2000, Pantelidis ve ark. 2007). Ancak böğürtlen çeşitlerinin tayin edilen değerleri ile literatürde belirtilen değerler arasında farklar görülmektedir (Kafkas

ve ark. 2006). Bu sonuçlar çalışılan çeşitlerin farklılığı ve yetiştirilen bölgenin iklimsel değişikliklerinin sebep olduğu miktarsal farklılıklarla açıklanabilir. Çeşitlerin tayin edilen askorbik asit miktarları uygulanan asitli su ekstraksiyonunda daha fazla bulunmuştur. Dolayısıyla askorbik asit tayininde su ekstraksiyonu metanolün toksik özelliği de gözöüne alındığında tercih edilebilir bir metot olmaktadır.

5.2.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivitesi ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları uygulanarak troloks eşdeğerinde ($\mu\text{mol troloks/g}$ taze meyve) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite değerlerinin ahududu çeşitlerinden daha fazla olduğunu göstermektedir. Böğürtlen çeşitleri üzerinde tayin edilen diğer parametrelerde göz önüne alındığında değerlerinin yüksek olması antioksidan aktivite değerinin de yüksek olabileceğinin işaret etmektedir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite değerleri oldukça geniş bir aralıktadır. Ekstraksiyon metotlarının antioksidan aktiviteleri değerleri karşılaştırıldığında ise metanol ekstraktlarının su ekstraktlarından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde bulunduğu bilinen flavonoid glikozitlerin suda, hidrolizle serbest hale geçen ya da serbest halde bulunan aglikonların metanolde daha fazla çözüldüğü belirtilmektedir. Ayrıca glikozit yapılarının sterik etki nedeniyle aglikon yapılarından daha düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur. Çalışmada uygulanan asitli su ekstraksiyonunda flavonoid glikozitlerin bulunması ve hidrolizle serbest kalan aglikonların suda fazla ekstrakte edilememesi ölçülen aktivite değerinin düşük olmasına sebep olabilmektedir. ABTS metodu ile ahududu çeşitlerinde tayin edilen antioksidan aktivite değeri $64,36 \pm 1,73$ - $117,07 \pm 0,94$ ($\mu\text{mol troloks/g}$ taze meyve) aralığında değişim göstermektedir. Ahududu çeşitleri arasında en yüksek değer Hollanda boduru çeşidinde gözlenmiştir. Hollanda boduru çeşidinin ölçülen yüksek antioksidan aktivite değeri sahip olduğu toplam fenol ve toplam flavonoid miktarı ile ilişkilendirilebilir. Elde edilen verilerin istatistiksel analiz sonuçları ($p < 0.01$) Aksu kırmızısı, Rubin, Heritage ve Hollanda boduru çeşitlerinin su ekstraktları ile Rubin ve Heritage çeşitlerinin metanol ekstraktları arasında fark olmadığını göstermektedir. ABTS metodu kullanılarak böğürtlen çeşitlerinin de

antioksidan aktivite değerleri tayin edilmiştir. Çeşitler arasında en yüksek değer Jumbo için bulunmuştur ve bu sonucun çeşitler arasında tayin edilen yüksek toplam fenol ve flavonoid içeriğinden kaynaklandığı söylenebilir.

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite değerlerinin tayininde için DPPH metodu da uygulanmıştır. DPPH ile tayin edilen antioksidan aktivite değerleri ABTS değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin kırmızı renginden sorumlu olduğu ve bu meyvelerde fazla miktarda bulunduğu bilinen antosiyaninlerin ABTS⁺ ile reaksiyona girmediği DPPH ile reaksiyona girerek aktivitelerinin bu metot ile ölçülebildiği belirtilmektedir. Bu bilgi ve bulunan antosiyanin miktarları gözönüne alındığında DPPH ile daha yüksek aktivite değeri ölçülmektedir. DPPH metodunda yüksek antioksidan aktivite değeri ortamda daha az DPPH radikalinin kaldığını ve daha fazla serbest radikalın sprldğn ifade etmektedir. DPPH metodu ile ölçülen antioksidan aktivite değeri ahududu çeşitlerinde 64.14 ± 0.98 - 127.59 ± 1.84 μmol troloks/g taze meyve arasında böğürtlen çeşitlerinde ise 90.95 ± 1.04 - 177.11 ± 3.17 μmol troloks/g taze meyve arasında değişmektedir (izelge 4.2.6.1 ve izelge 4.2.6.2). ABTS metodunda bulunduğu gibi ahududu eşitleri arasında Hollanda boduru, böğürtlen eşitleri arasında Jumbo en yüksek antioksidan aktivite değerlerine sahiptirler. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite tayini için uygulanan diğer bir metot ise CUPRAC metodudur. ABTS ve DPPH metotları gibi elektron transferine dayanan bir yöntemdir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite sonuçlarına bakıldığında ABTS ve DPPH metotları ile tayin edilen değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir. CUPRAC metodu ile tayin edilen antioksidan aktivite değeri ahududu çeşitlerinde $47,16 \pm 0,45$ - $108,04 \pm 2.32$ μmol troloks/g taze meyve aralığında, böğürtlen çeşitlerinde ise $59,99 \pm 0,71$ - $127,15 \pm 0,57$ μmol troloks/g taze meyve aralığında değişim göstermektedir. CUPRAC metodunun C vitamini, flavonoidler ve fenolik asitlerle reaksiyon verebildiği ve bu maddelerin aktivite değerlerinin ölçülebildiği belirtilmiştir. Ayrıca kromojenik radikal reaktiflerden (rn., ABTS, DPPH, vb.) daha kararlıdır (Güçlü ve ark. 2006). Ancak bilindiği gibi zms meyveler potansiyel fenolik antioksidanlar maddelerden olan antosiyanleri içermektedir ve bu maddelerin CUPRAC metoduyla tayin edilebildiği belirtilmemiştir. Ahududu ve böğürtlen eşitlerinin CUPRAC metodu ile tayin edilen antioksidan

aktivite değerleri genel olarak ABTS ve DPPH metodu ile tayin edilen değerlerden daha dūşük bulunmuştur. CUPRAC metodunun belirtilen fenolik maddelerle reaskiyona girerek renkli Cu(I)-Neokuproin kelatını oluşturduğu ve diğer maddelerle reaksiyon verip vermediği bilinmediğinden daha dūşük aktivite gösterebileceği sonucuna ulaşılabilir. ABTS ve DPPH metotlarında olduğu CUPRAC metodunda da ahududu çeşitleri arasında Hollanda boduru, bōęürtlen çeşitleri arasında ise Jumbo en yüksek antioksidan aktivite gösteren çeşitler olmuştur.

Elde edilen sonuçlardan görüldüğü gibi uygulanan bir tek antioksidan aktivite metodunun tayin edilen materyalin antioksidan aktivite değerinin tam olarak yansıttığı söylenemez. Metotlar; ölçüm prensipleri, deneysel koşullar ve reaksiyon verebildikleri fenolik madde gruplarına göre değişim göstermektedirler. Dolayısıyla antioksidan aktivitesi tayin edilmek istenen materyalin tek bir metotla değil en az iki metotla aktivite değerinin belirlenmesi tahmin edilen değer için daha doğru sonuç verebilir.

5.2.3. Korelasyon Sonuçları

Ahududu ve bōęürtlen çeşitlerinin ölçülen toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin, askorbik asit miktarları ile ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile tayin edilen antioksidan aktivite değerleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ahududu çeşitlerinin su ekstraktında antioksidan aktivite ile toplam fenol ve toplam flavonoid miktarları arasında önemli bir korelasyon görülmemiştir. Ancak toplam fenol ile DPPH/CUPRAC oranı ve ABTS/CUPRAC oranı arasındaki korelasyon 0.76 ve 0.46 olarak tespit edilmiştir. Toplam flavonoid ile DPPH/ABTS oranı ve DPPH/CUPRAC oranı arasında da 0.58 ve 0.49 pozitif korelasyon bulunmuştur. Toplam antosiyanin ile antioksidan aktivite değerleri arasında pozitif, askorbik asit ile aktivite değerleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Metanol ekstraktlarında ise toplam fenol ABTS ile 0.72, CUPRAC ile 0.60 korelasyona sahiptir. Benzer ilişki toplam flavonoid miktarlarında da görülmüştür ve ancak burada DPPH ve CUPRAC ile 0.60 ve 0.51 değerlerinde pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Antosiyanin miktarı sadece önemli olan tek korelasyonu DPPH arasında 0.56 değeriyle bulunmaktadır. Askorbik asit su ekstraktında olduğu gibi metanol ekstraktında da aktivite ile negatif korelasyon

göstermektedir (Çizelge 4.3.1). Tespit edilen negatif korelasyon sonuçları çeşitlerin az miktarda askorbik içerdiğini ancak yüksek aktivite gösterdiğini ifade etmektedir. Pozitif korelasyonlar ise fenolik bileşimlerin aktivite üzerine olan katkısını ortaya koymaktadır.

Böğürtlen çeşitlerinin su ekstraktında toplam fenol ile ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları arasında sırasıyla 0.54, 0.49 ve 0.56 pozitif korelasyon değerleri bulunmuştur. Ancak antioksidan değerleri ile toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit miktarları arasında oldukça yüksek 0.82-0.98 arasında değişen korelasyon tespit edilmiştir. Metanol ekstraktında ise antioksidan aktivite ile toplam fenol ve askorbik asit arasında önemli bir korelasyon görülürken toplam flavonoid ve toplam antosiyanin ile 0.85-0.99 arasında önemli korelasyon sonuçları bulunmuştur. Çalışmada elde edilen bu sonuçlar böğürtlen çeşitlerinde su ekstraktlarında fenolik içeriklerin (toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyaninlerin ve askorbik asit) metanol ekstraktlarında ise özellikle toplam flavonoid ve toplam antosiyaninlerin antioksidan aktiviteye olan katkısını göstermektedir.

Çalışmada uygulanan antioksidan aktivite metotları karşılaştırıldığında DPPH antioksidan aktivite değerleri ABTS ve CUPRAC değerlerine oranla daha yüksek çıkmakla birlikte üç yöntem arasındaki korelasyon genel olarak 0.81 in üzerinde çıkmaktadır.

5.2.4. Standart Fenolik Maddelerin Toplam Fenol, Antioksidan Aktivite Değerleri ve Korelasyon Sonuçları

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde tayin edilen fenolik bileşiklerin (ellagik, ferulik, kafeik, *para*-kumarik, *para*-hidroksibenzoik asit ve kuersetin) ve bu bileşikler ile hazırlanan karışımın toplam fenol ile antioksidan aktivite değerleri ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2.8.1'de verilmiştir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi genel olarak aromatik halkaya bağlanan hidroksil grubu sayısı ve bu grupların buldukları konuma bağlıdır. Fenolik bileşiklerin hidroksil grubu sayısı ile pozisyonunun (Sroka ve Cisowski 2003, Wojdylo

ve ark. 2007), flavonoid yapılarında ise B halkasındaki hidroksil gruplarının aktivite üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Heim ve ark. 2002, Pannala ve ark. 2001). Çalışılan fenolik bileşikler arasında en yüksek antioksidan aktivite ellagik asitte tayin edilmiştir. Ellagik asit üzerinde bulunan serbest hidroksil grupları ve ellagik asidin her iki lakton halkasında bulunan karbonil grupları hidrojen bağlarını indirgeyerek serbest radikal süpürme etkisi gösterdiği ve aktivitesinin yüksek olduğu bilinmektedir (Zafrilla ve ark. 2001). Hidroksisinnamik asit ve hidroksibenzoik asitlerin aktivite değerleri karşılaştırıldığında ise hidroksisinnamik asitlerin hidroksibenzoik asitlerden daha yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu durum sinamik asitlerin propenoik asit (-CH=CH-COOH) kısmının benzoik asitlerin karboksil gruplarından (-COOH) daha fazla antioksidan etkiye sahip olmasıyla açıklanmıştır (Wojdylo ve ark. 2007). Hidroksisinnamik asitlerin tayin edilen fenolikleri arasında kafeik asidin ferulik ve *para*-kumarik asitten daha en fazla aktivite etkisine sahip olduğu görülmüştür. Fenolik bileşiklerin *orto* ya da *para* pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının hidrojen atomlarını serbest radikallere daha kolay vermesi (de Heer ve ark. 1999) ve birbirleriyle etkileşimde olmaları antioksidan aktivite üzerinde *meta* pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına göre daha fazla etkili olduğu belirtilmiştir (Sroka ve Cisowski 2003, Wojdylo ve ark. 2007). *para*-Hidroksibenzoik asit ise tayin edilen fenolikler arasında en düşük değere sahip olan fenolik bileşik olarak belirlenmiştir. *para*-Hidroksibenzoik asidin *para* konumunda bulunan hidroksil grubu aromatik halkanın üzerinde dezavantaj sağlamaktadır (Sroka ve Cisowski 2003). Flavonoidlere antioksidan aktivite özelliği kazandıran yapılar belli bir sayı, düzen ve fenol halkasında bulunan hidroksil gruplarının yapısal konjugasyonunu içerir (Miller ve Rice-Evans 1997). Flavonoidlerin antioksidan aktivitelerinde yapıların B halkasında bulunan 3,4-dihidroksil grubu, C halkasında bulunan 3 numaralı karbona bağlı OH grubu ve 4 numaralı karbonla çift bağ yapan oksijen ve A halkasında bulunan 5 numaralı karbona bağlı OH grubu etkilidir. Ayrıca, B halkasının C2-C3 çift bağ yapısı elektron delokalizasyonundan sorumlu olarak bilinir ve serbest radikal tarama aktivitesini arttırdığı belirtilmektedir (Wojdylo ve ark. 2007). Kuersetin flavonoid sınıfına ait bir flavonol yapısıdır ve yüksek antioksidan aktivite gösterir (Çizelge 4.2.8.1). Kuersetin B halkasında sahip olduğu katekol yapısı oldukça aktiftir. C halkasındaki 2,3 çift bağın 4 karbonundaki karbonil yapısıyla konjugasyonu fenoksil radikal elektronunun flavonoid çekirdeklerine olan

delokalizasyonuna izin verir. 3 hidroksil grubunun 2,3 çift bağıyla kombinasyonu elektron delokalizasyonu için rezonans kararlılığını artırır (Wojdylo ve ark. 2007). Dolayısıyla kuersetin oldukça yüksek antioksidan aktivite gösterir.

Standart fenolik maddelerle hazırlanan karışımın toplam fenol ile antioksidan aktivite değerleri ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları ile tayin edilmiştir. Fenollerin her biri için bulunan toplam fenol değerleri ile karışım için bulunan değer karşılaştırıldığında metodun toplanabilirlik özelliği göstermediği bulunmuştur. Fenollerin antioksidan aktivite değerleri ile karışımın aktivite değeri karşılaştırıldığında ise %48.8 ABTS, %60.4 DPPH toplanabilirlik değeriyle toplanabilirken sağlamazken CUPRAC yöntemi %93.2 değeriyle büyük ölçüde sağlamaktadır. Elde edilen bu sonuç karışım içindeki fenolik maddelerin birbirleri ile etkileşerek her bir fenolik için tayin edilen aktivite değerinin toplamının karışım için tayin edilen değerle sağlanamadığı bulunmuştur.

6. SONUÇ

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin fenolik bileşik miktarlarında dondurarak muhafaza sürelerine bağlı olarak artma ve azalmalar gözlenmiştir ve bu durumun fenolik bileşiklerin biyoyararlılıklarını etkileyebileceği düşünülebilir. Ellagik asit ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin temel fenolik bileşiği olarak tayin edilmiştir. Dondurarak muhafaza etme süresince ellagik asidin en fazla bozunan fenolik bileşik olduğu ve bunu *para*-hidroksibenzoik asit izlediği belirlenmiştir. Hollanda boduru çeşidinin muhafaza süresi sonunda en az fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu dolayısıyla en fazla etkilenen ahududu çeşidi olduğu söylenebilir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinde en az tayin edilen fenolik bileşik kuersetindir. Ancak muhafaza süresince miktarı önemli derecede etkilenmemiştir. Böğürtlen çeşitlerinin ahududu çeşitlerinden daha fazla fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu ve ayrıca dondurma işleminden sonra daha az etkilendiği de belirlenmiştir. Dolayısıyla ahududu çeşitlerinin taze meyveleri fenolik bileşiklerin potansiyel doğal kaynakları olarak görev yapabilir ve insan sağlığı için taze olarak tüketilmelidir. Buna karşın, böğürtlen çeşitlerin fenolik bileşik bakımından dondurarak muhafazaya daha uygun olduğu sonucuna varılabilir.

Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit içerikleri su ve metanol ekstraktlarında UV-vis spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktiviteleri ABTS, DPPH ve CUPRAC metotları uygulanarak değerlendirilmiştir. Ahududu ve böğürtlen çeşitleri arasında toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit içeriklerinin bakımından önemli farklılıklar olduğu görülmüştür. Ahududu çeşitleri arasında Hollanda boduru su ve metanol ekstraktlarında en yüksek toplam fenol, toplam flavonoid daha düşük miktarda toplam antosiyanin miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Böğürtlen çeşitlerinde ise Jumbo su ve metanol ekstraktlarında en yüksek toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit miktarına sahiptir. Elde edilen bu sonuçlar, ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin yüksek miktarda toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit miktarına sahip olduğunu ve dolayısıyla yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite değerlerinin

ahududu çeşitlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Toplam fenol, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve askorbik asit içeriklerinin antioksidan aktiviteyle pozitif ve negatif korelasyon göstermektedir. Bu sonuç ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin antioksidan aktivite değerlerinin büyük ölçüde tayin edilen fenolik içeriklerinden kaynaklandığı ifade etmektedir. Ayrıca ABTS, DPPH ve CUPRAC metotlarının kendi aralarında yüksek korelasyona sahip oldukları ve bu durumda tüm metotların elektron transferine prensibine dayanmalarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

KAYNAKLAR

AGBOR-EGBE, T. ve J. E. RICKARD. 1990. Identification of Phenolic Compounds in Edible Aroids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:215–221.

AĞAOĞLU, Y. S. 1986. Üzümsü Meyveler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 984, Ders Kitabı: 290, Ankara. Sayfa 377.

AĞAOĞLU, Y. S. 2003. Üzümsü Meyveler Üretimi. Türkiye'de Meyve Üretimini Geliştirilmesi Çalıştayı. Ankara, 24 Eylül 2003, sayfa 20.

AMAKURA, Y., Y. UMINO., S. TSUJI., Y. TONOGAI. 2000. Influence of Jam Processing on the Radical Scavenging Activity and Phenolic Content in Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6292-6297.

AMİOT, MARİE J., M., TACCHİNİ., SERGE Y., AUBERT., W., OLESZEK. 1995. Influence of Variety, Maturity, Processing and Storage Conditions on Phenolic Composition and Enzymatic Browning of Pear Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1132-1137.

AMR, A. ve E. AL-TAMIMI. 2007. Stability of the Crude Extracts of *Ranunculus Asiaticus* Anthocyanins and Their Use As Food Colourants. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 985–991.

ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K., RYAN, D. 2000. Sample Preparation in the Determination of Phenolic Compounds in Fruits. *Analyst*, 125:989-1009.

ANTTONEN, M. J. ve R. O. KARJALAINEN. 2005. Environmental And Genetic Variation of Phenolic Compounds in Red Raspberry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:759-769.

APAK, R., K. GÜÇLÜ., M. ÖZYÜREK., B.K. BEKTAŞOĞLU. 2008. Antioksidan Tayin Yöntemleri ve CUPRAC Yöntemine Güncel Katkılar. IV. Ulusal Analitik Kimya Kongresi Bildirisi. Elazığ, 25-27 Haziran 2008, sayfa 5.

APAK, R., K. GÜÇLÜ., B. DEMİRATA., M. ÖZYÜREK., S. E ÇELİK., B.K. BEKTAŞOĞLU., I. BERKER., D. ÖZYURT. 2007. Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds and the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12:1496-1547.

ARTS, I. C. W. ve P.C.H. HOLLMAN. 1998. Optimization of A Quantitative Method for the Determination of Catechins in Fruits And Legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12): 5156-5162.

ARTS, I. C. W., B. VAN DE PUTTE., P. C. H. HOLLMAN. 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.

ARTS, I. C., B. VAN DE PUTTE., P.C.H. HOLLMAN. 2000b. 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.

AZAR, M., E. VERETTE., S. BRUN. 1987. Identification of Some Phenolic Compounds in Bilberry Juice *Vaccinium Myrtillus*. *Journal of Food Science*, 52:1255-1257.

BARBUCH, R. J., J. E. COUTANT., M. B. WELSH., K.D.R. SETCHELL. 1989. The Use of Thermospray Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry for the Class Identification and Structural Verification of Phytoestrogens in Soy Protein Preparations. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 18: 973-977.

BAUCHER, M., B. MONTIES., M. VAN MONTAGU., W. BOERJAN. 1998. Biosynthesis And Genetic Engineering of Lignin. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17:125-197.

BUNEA, A., M. ANDJELKOVIC., C. SOCACIU., O. BOBIS., M. NEACSU., R. VERHE., J. V. CAMP. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108: 649-656.

BENCOECHEA, M. L., A. I. SANCHO., B. BARTOLOMÉ ET AL. 1997. Phenolic composition of industrially manufactured purées and concentrates from peach and apple fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 4071–4075.

BENVENUTI, S., F. PELLATI., M. MELEGARI., D. BERTELLI. 2004. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, And Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, And Aronia. *Food Chemistry and Toxicology*, 69:164-169.

BILYK, A. ve G. M. SAPERS. 1986. Varietal Differences in the Quercetin, Kaempferol, and Myricetin Contents of Highbush Blueberry, Cranberry, and Thornless Blackberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 585–588.

BLOIS, M. S. 1958. Antioxidant Determinations by the Use of A Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-1200.

BOYLES, M. J. ve R. E. WROLSTAD. 1993. Anthocyanin Composition of Red Raspberry Juice: Influences of Cultivar, Processing, and Environmental Factors. *Journal of Food Science*, 58, 1135-1141.

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

- BRITTON, G. 1983.** The Biochemistry of Natural Pigments. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- CARERI, M., M. MANGIA., M. MUSCI. 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.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A., MA. DE LOURDES PACHECO-HERNÁNDEZ, MA. ELENA PÁEZ-HERNÁNDEZ, RODRIGUEZ, J.A., C. A. GALÁN-VIDAL. 2009.** Chemical Studies of Anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859-871.
- CLIFFE, S., M.S. FAWER., G. MAÏER., K. TAKATA., G. RITTER. 1994.** Enzyme assays for the phenolic content of natural juices. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 1824–1828.
- CLIFFORD, M. N. 1999.** Chlorogenic Acids and Other Cinnamates: Nature, Occurrence and Dietary Burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79: 362-372.
- CLIFFORD M. N., A. ve SCALBERT. 2000.** Ellagitannins-Occurrence in Food, Bioavailability and Cancer Prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1118-25.
- COOPER-DRIVER, G. A. 2001.** Contributions of Jeffrey Harborne and Co-Workers to the Study of Anthocyanins. *Phytochemistry*, 56(3): 229-236.
- CORK, S. J. ve A. K. KROCKENBERGER. 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.
- COSTA, C.T., D. HORTON., S. A. MARGOLIS. 2000.** Analysis of Anthocyanins in Foods by liquid Chromatography, liquid Chromatography-mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis, *Journal of Chromatography*, 881:403-410.
- COSTANTINO. L., A. ALBASINI., G. RASTELLI., S. BENVENUTI. 1992.** Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Medica*, 58: 342–344.
- CROZIER, A., M. N. CLIFFORD., H. ASHIHARA. 2006.** Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Oxford; Ames, Iowa: Blackwell Pub. Xii, p. 372.
- CUVELIER, M. E., H. RICHARD., C. BERST. 1992.** Comparison of the Antioxidative Activity of Some Phenolic Acids: Structure-Activity Relationship. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 324-325.

DA COSTA, C. T., B. C. NELSON., S. A. MARGOLIS., D. HORTON. 1998. Separation of Blackcurrant Anthocyanins by Capillary Zone Electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 799(1-2): 321-327.

DE ANCOS, B., E. M. GONZÁLES., M. P. CANO. 2000. Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4565-4570.

DE HEER, M. I., H. G. KORTH., P. MULDER. 1999. Polymethoxy Phenols in Solution: O-H Bond Dissociation Enthalpies, Structures and Hydrogen Bonding. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 6969-6975.

DELAGE E, BARON GB, DRILLEAU J-F. 1991. High-performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. *Journal of chromatography*, 555: 125-136.

DE RIJKE. E., P. OUT., W.M.A. NIESEN., F. ARIESE., C. GOOIJER., U. A.TH. BRINKMAN. 2006. Analytical Separation and Detection Methods for Flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112:31-63.

DANIEL, E. M., A. S. KRUPNICK., Y. H. HEUR., J. A. BLINZLER., R. W. NIMS., G. D. STONER. 1989. Extraction, Stability, and Quantitation of Ellagic Acid in Various Fruits and Nuts. *Journal of Food Composition and Analyses*, 2: 338-349.

DEY, P. M. ve J. B. HARBORNE. 1993. 1. Plant Phenolics Methods in Plant Biochemistry (2nd printing). London: Academic Press Limited. pp. 326-341.

DIXON, R.A., N.L. PAIVA. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7:1085-1097.

EDENHARDER, R., G. KELLER., K.L. PLATT., K. K. UNGER. 2001. Isolation and Characterization of Structurally Novel Antimutagenic Flavonoids from Spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6): 2767-2773.

ERLUND, I., G. ALFTHAN., H. SIREN., K. ARINIEMI., A. ARO. 1999. Validated Method for the Quantitation of Quercetin from Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Journal of Chromatography A*, 727:179-189.

ESPIN, J. C., M.T. GARCIA-CONESA., F. A. TOMAS-BARBERAN. 2007. Nutraceuticals: Facts and Fiction. *Phytochemistry*, 68 (22-24): 2986-3008.

EWALD, C., S. FJELKNER-MODIG., K. JOHANSSON., I. SJÖHOLM., B. ÅKESSON. 1999. Effect of Processing on Major Flavonoids in Processed Onions, Green Beans, and Peas. *Food Chemistry*, 64: 231-235.

FAN-CHIANG, H-J. ve R. E. WROLSTAD. 2005. Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *Journal of Food Science*, 70: C198-C202.

FERNÁNDEZ, M., Y. PICÓ., J. MANES. 2000. Determination of Carbamate Residues in Fruits and Vegetables by Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 871: 43-56.

FERNÁNDEZ DE SÍMÓN, B., J. PÉREZ-ILZARBE., T. HERNÁNDEZ., C. GÓMEZ-CORDOVÉS., I. ESTERELLA. 1990. HPLC Study of the Efficiency of Extraction of Phenolic Compounds. *Chromatographia*, 30:35-37.

FERNÁNDEZ DE SÍMÓN, B., J. PÉREZ-ILZARBE., T. HERNÁNDEZ., C. GÓMEZ-CORDOVÉS., I. ESTERELLA. 1992. Importance of Phenolic Compounds for the Characterization of Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40:1531-1535.

FLESCHHUT, J., F. KRATZER., G. RECHKEMMER., S. E. KULLING. 2006. Stability and Biotransformation of Various Dietary Anthocyanins in Vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1): 7–18.

FOO, L. Y., Y. YU., A. B. HOWELL., N. VORSA. 2000. A-Type Proanthocyanidins Trimers from Cranberry that Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia Coli*. *Journal of Natural Products*, 63: 1225-1228.

FUKUMOTO, L. R. ve G. MAZZA. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.

FULEKI, T. ve F. J. FRANCIS. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. 2.Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. *Journal of food Science*, 33:78-83.

GALENSA, R. ve K. HERRMANN. 1980. Analysis of Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 189:217–224.

GAO, L. ve G. MAZZA. 1994. Quantitation and Distribution of Simple and Acylated Anthocyanins and Other Phenolics in Blueberries. *Journal of Food Science*, 59: 1057-1059.

GIUSTI, M. M., R. E. WROLSTAD. 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.

GOUPY, P.M., P.J.A. VAROQUAUX., J.J. NICOLAS., J.J. MACHEIX. 1990. Identification And Localization of Hydroxycinnamoyl and Flavonol Derivatives from Endive (*Cichorium Endivia L. Cv. Geante Maraichere*) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38:2116–2121.

GÜÇLÜ, K., M. ALTUN., M. ÖZYÜREK., S. E. KARADEMİR., A. APAK. 2006. Antioxidant Capacity of Fresh, Sun-And Sulphited-Dried Malatya Apricot (*Prunus armeniaca*) Assay by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 76-85.

HADDOCK, E.A., R.K. GUPTA., S.M.K. AL-SHAFLI., K. LAYDEN., E. HASLAM., D. MAGNOLATO. 1982. The Metabolism of Gallic Acid and Hexahydroxydiphenic Acid in Plants: Biogenetic and Molecular Taxonomic Considerations. *Phytochemistry*, 21:1049-1062.

HÄKKINEN, S. ve S. AUROLIA. 1998. High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Diode Array Ultraviolet Detection in the identification of Flavonol Aglycones and Glycosides in Berries. *Journal of Chromatography A*, 829, 91–100.

HÄKKINEN, S., M. HEINONEN., S. KÄRENLAMPI., H. MYKKÄNEN., J. RUUSKANEN., R. TÖRRÖNEN. 1999a. Screening of Selected Flavonoids and Phenolic Acids in 19 Berries. *Food Research International*, 32, 345-353.

HÄKKINEN, S. H., S. O. KÄRENLAMPI., I. M. HEINONEN., H. M. MYKKÄNEN., A. R. TÖRRÖNEN. 1999b. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin and Kaempferol in 25 Edible Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2274-2279.

HÄKKINEN, S., S. O. KÄRENLAMPI., H. M. MYKKÄNEN., A. R. TÖRRÖNEN. 2000a. Influence of Domestic Processing and Storage on Flavonol Contents in Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 2960-2965.

HARBORNE, J.B. 1989. Plant Phenolics. In: Dey PM, Harborne, JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1. London, UK: Academic Pres.

HARBORNE, J.B. 1994. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. London, UK: Chapman & Hall.

HARBORNE, J.B. 1988. The flavonoids: recent advances. In: Goodwin TW, ed. *Plant Pigments*. London, England, Academic Press. p. 299–343.

HARBORNE, J.B. 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London, UK: Chapman & Hall.

HARBORNE, J.B. ve C.A. WILLIAMS. 2000. Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.

HARTLEY, R.D. ve W.H. MORRISON. 1991. Monomeric and Dimeric Phenolic Acids Released from Cell Walls of Grasses by Sequential Treatment with Sodium Hydroxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55:365-375.

HEİM, K. E., A. R. TAGLIAFERRO., D. J. BOBİLYA. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572–584.

HEINONEN, I. M., A. S. MEYER., E. N. FRANKEL. 1998. Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4107–4112.

HERRMANN, K. 1989. Occurrence and Content of Hydroxy-Cinnamic and Hydroxybenzoic Acid Compounds in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28: 315-347.

HERRMANN K. 1992. Über die Gehalte der hauptsächlichsten Pflanzenphenole im Obst. *Fluss Obst*, 59: 66–70.

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.

HERTOG, M.G. L., P. C. H., HOLLMAN., D. P. VENEMA. 1992a. Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1591–1598.

HERTOG, M. G. L., P. C. H. HOLLMAN., M. B. KATAN. 1992b. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2379–2383.

HOLLMAN, P. C. H. ve D. P. VENEMA. 1993. The Content of the Potentially Anticarcinogenic Ellagic Acid in Plant Foods. In: Waldron KW, Johnson IT, Fenwick GR, eds. *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 203–208.

HONG, V. ve R. E. WROLSTAD. 1990. Characterization of Anthocyanin-Containing Colorants and Fruit Juices by HPLC/Photodiode Array Dedection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 698-708.

IRITI, M., F. FAORO. 2006. Grape Phytochemicals: A Bouquet of Old and New Nutraceuticals For Human Health. *Medical Hypotheses*, 67(4): 833-838.

ITO, F., N. TANAKA., A. KATSUKI., T. FUJII. 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.

- İBRAHİM, R. ve D. BARRON. 1989.** Phenylpropanoids. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press, p. 75–111.
- JUSTESEN, U., P. KNUTHSEN., T. LETH. 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.
- KAFKAS, E., M. KOŞAR., N. TÜREMİŞ., K. H. C. BAŞER. 2006.** Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food Chemistry*, 732-736.
- KÄHKONEN, M. P., A. I. HOPIA., M. HEINONEN. 2001.** Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4076-4082.
- KALT, W., D. A. J. RYAN., J. C. DUY., R. L. PRIOR., M. K. VANDER. EHLENFELDT., S. P. KLOET. 2001.** Interspecific Variation in Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity Among Genotypes of Highbush and Lowbush Blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4761-4767.
- KÄHKONEN, M. P., A. I. HOPIA., H. J. VUORELA., J. P. RAUHA., K. PİHLAJA., T. S. KUJALA., M. HEINONEN. 1999.** Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 3954-3962. *
- KANES, K., B. TISSERAT., M. BERHOW., C. VANDERCOOK. 1993.** Phenolic composition in various tissues of Rutaceae species. *Phytochemistry*, 32:967–974.
- KAPLAN, N., H., L. DEMİRSOY., DEMİRSOY., ONUR. C. 1999.** Karadeniz Bölgesinde Frenküzümü, Ahududu ve Böğürtlen Yetiştiriciliğinin Önemi ve Geleceği. *Karadeniz Bölgesinde Tarımsal Üretim ve Pazarlama Sempozyumu*, 112-118.
- KHANNA, S. K., P.N. VISWANATHAM., P.S. KRISHNAN., G.G. SANWAI. 1968.** *Phytochemistry*, 7:1513.
- KLICK, S. ve K. HERRMANN. 1988.** Glucosides and Glucose Esters of Hydroxybenzoic Acids in Plants. *Phytochemistry*, 27: 2177-2180.
- KONCZAK, I. ve W. ZHANG. 2004.** Anthocyanins-more than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004(5): 239-240.
- KONG, J. M., L. S. CHIA., N. K. GOH., T. F. CHIA., R. BROUILLARD. 2003.** Analysis and Biological Activities of Anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5): 923–933.
- KOSUGE, S. ve M. FURUTA. 1970.** Studies on the Pungent Principle of Capsicum. *Agricultural and Biological Chemistry*. 34: 248-256.

KRISTENSON, E.M., E.G.J. HAVERKATE., C.J. SLOOTEN., L. RAMOS., R.J.J. VREULS., U.A.TH.BRINKMAN. 2001. Miniaturized Automated Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction of Pesticides in Fruit Followed by Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis. *Journal of Chromatography A*, 917: 277-286.

KRYGIER, K., F. SOSULSKI., L. HOGGE. 1982. Free, Esterified, and Insoluble-Bound Phenolic Acids. 2. Composition of Phenolic Acids in Rapeseed Flour and Hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 334–336.

KUMPULAINEN, J. T., M. LEHTONEN., P. MATTILA. 1999. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Average Flavonoids Intake in Finland. In: Kumpulainen JT, Salonen JT, eds. *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 141–150.

KUNINORI, T. ve J. NISHIYAMA. 1986. Separation and Quantitation of Ferulic Acid and Tyrosine in Wheat Seeds (*Triticum Aestivum*) by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 362:255-262.

LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. ve A.L. WATERHOUSE. 1994. A direct HPLC Separation of Wine Phenolics. *American Society for Enology and Viticulture*, 45:1–5.

LEE, H.S. ve B.W. WIDMER. 1996. Phenolic Compounds. In: Nolle LML, ed. *Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc. Vol 1, s.821–894.

LEES, D.H. ve F. J. FRANCIS. 1972. Effect of Gamma Radiation on Anthocyanin and Flavonol Pigments in Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 97: 128–132.

LI, Q. M. ve M. CLAEYS. 1994. Characterization and Differentiation of Diglycosyl Flavonoids by Positive ion Fast Atom Bombardment and Tandem Mass Spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 23: 406-416.

LIGGINS, J. ve L. J. C. BLUCK. 1998. Extraction and Quantification of Daidzein and Genistein in Food. *Analytical Biochemistry*, 264:1-7.

LINKO R., J. KÄRPPÄ., H. KALLIO., S. AHTONEN. 1983. Anthocyanin Contents of Crowberry and Crowberry Juice. *Lebensm-Wiss u-Technol*, 16: 343–345.

LISTER, C.E., J.E. LANCASTER., K.H. SUTTON. 1994. Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in the skin of a red and green apple cultivar. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64: 155–161.

LIU, M., X. Q. LI., C. WEBER., C.Y. LEE., J. BROWN., R. H. LIU. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2926-2930.

- MA, Y.-L., I. VEDERNIKOVA., H. VAN DEN HEUVEL., M. CLAEYS. 2000.** Internal Glucose Residue Loss in Protonated O-Diglycosyl Flavonoids upon Low-Energy Collision-Induced Dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11: 136-144.
- MAAS, J. L., S. Y. WANG., G. J. GALLETTA. 1991.** Evaluation of Strawberry Cultivars for Ellagic Acid Content. *HortScience*, 26: 66-68.
- MACHEIX, J-J., A. FLEURIET., J. BILLOT. 1990.** *Fruit Phenolics*. Boca Raton, USA: CRC Pres.
- MANACH, C., A. SCALBERT., C. MORAND., C. RÉMÉSY., L. JIMÉNEZ. 2004.** Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- MARKHAM, K.R. 1982.** *Techniques of Flavonoid Identification*. New York, USA: Academic Pres.
- MARKHAM, K. R. 1989.** Flavones, Flavonols and Their Glycosides. Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 1, Plant Phenolics. London, UK: Academic Press, p. 197–235.
- MARKO-VARGA, G. ve D. BARCELO. 1992.** Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. *Chromatographia*, 34:146–154.
- MATEUS, N., A. M. S. SILVA., J. VERCAUTEREN., V. DE FREITAS. 2001.** Occurrence of Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10) 4836-4840.
- MATTA-RIIHINEN, K.R., A. KAMAL-ELDIN., P.H. MATTILA., A. M. GONZALEZ-PARAMAS., A. R. TORRONEN. 2004.** Distribution And Conetnts of Phenolic Compounds in Eighteen Scandanavian Berry Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4477-4486.
- MATTILA, P., J. ASTOLA., J. KUMPULAINEN. 2000.** Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5834–5841.
- MAZZA, G. ve E. MINIATI. 1993.** *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. CRC Pres, London, UK.
- MAXSON, E. D. ve L. W. ROONEY. 1972.** Evaluation of Methods for Tannin Analysis in Sorghum Grain. *Cereal Chemistry*, 49: 719-728.
- MCRAE, K. B., P. D. LIDSTER., A. C. DEMARCO., A. J. DICK. 1990.** Comparison of The Polyphenol Profiles of Apple Fruit Cultivars by Correspondence Analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50: 329-342.

- MERKEN, H.M. ve G.R. BEECHER. 2000.** Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:577–599.
- MIKKONEN, T. P., K. R. MATTA., A. T. HUKKANEN., H. I. KOKKO., A. R. TÖRRÖNEN., S. O. KARENLAMPI., R. O. KARJALAINEN. 2001.** Flavonol Content Varies Among Black Currant Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3274-3277.
- MILLER, N.J. ve C.A. RICE-EVANS. 1994.** Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods Enzymology*, 234:279–293.
- MILLER, N.J. ve C.A. RICE-EVANS. 1997.** The Relative Contributions of Ascorbic Acid and Phenolic Antioxidants to the Total Antioxidant Activity of Orange and Apple Fruit Juices and Blackcurrant Drink. *Food Chemistry*, 60:331-337.
- MILLER, N.J., C.A. RICE-EVANS., M.J. DAVIES., V. GOPINATHAN., A. MILNER. 1993.** A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity And Its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84:407–412.
- MILLER, N.J., J. SAMPSON., L.P. CANDEIAS., P.M. BRAMLEY., C.A. RICE-EVANS. 1996.** Antioxidant Activities of Carotenes and Xanthophylls. *FEBS Letters*. 384:240–242.
- MOLINELLI, A., R. WEISS., B. MIZAIKOFF. 2002.** Advanced Solid Phase Extraction Using Molecularly Imprinted Polymers for the Determination of Quercetin in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (7): 1804-1808.
- MÖLLER, B., K. HERRMANN. 1983.** Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruit. *Phytochemistry*, 22: 477–481.
- MONTIES B. 1989.** Lignins. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Press, p. 113–157.
- MOSEL, H-D. ve K. HERRMANN. 1974.** Phenol Ingredients of Fruits. IV. Phenol Ingredients of Blackberries and Raspberries and Their Changes During Development and Ripeness of the Fruits. *Z Lebensm-Unters Forsch*, 154: 324-327.
- MOYER, R. A., K. E. HUMMER., C. E. FINN., B. FREI., R. E. WROLSTAD. 2002.** Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 519-525.
- MULLEN, W., T. YOKOTA., M. E. LEAN., A. CROZIER. 2003.** Analysis of Ellagitannins and Conjugates of Ellagic Acid and Quercetin in Raspberry Fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry*, 64: 617-624.

MULLEN, W., J. MCGINN., M. E. LEAN., M. R. MACLEAN., P. GARDNER., G. G. DUTHIE., T. YOKOTA., A. CROZIER. 2002. Ellagitannins, Flavonoids, and Other Phenolics in Red Raspberries and Their Contribution to Antioxidant Capacity and Vasorelaxation Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5191-5196.

NARDINI, M., E. CIRILLO., F. NATELLA., D. MENCARELLI., A. COMISSO., C. SCACCINI. 2002. Detection of Bound Phenolic Acids: Prevention by Ascorbic Acid and Ethylenediaminetetraacetic Acid of Degradation of Phenolic Acids During Alkaline Hydrolysis. *Food Chemistry*, 79: 119-124.

NICHENAMETLA, S. N., T. G. TARUSCIO., D. L. BARNEY., J. H. EXON. 2006. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 46(2): 161-183.

ONUR, C. 1996. Ahududu Yetiştiriciliği. Antalya, Damla Ofset, s. 100.

ONUR, C., N. TÜREMİŞ., K. DERİN., T. CİNCANER., Y.S. AĞAOĞLU. 1999. Bazı Frenk Üzümü (*Ribes spp.*), Ahududu ve Böğürtlen (*Rubus spp.*) Çeşitlerinin Evaluasyonu. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Tebliğleri. Ankara, sayfa 772-775.

QUIDEAU, S. ve K. S. FELDMAN. 1996. Ellagitannin Chemistry. *Chem. Rev*, 96: 475-503.

PANNALA, A. S., T. S. CHAN., P. J. O'BRIEN., C. A., RICE-EVANS. 2001. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282: 1161-1168.

PANTELIDIS, G. E., M. VASILAKAKIS., G. A. MANGANARIS., GR. DIAMANTIDIS. 2007. Antioxidant Capacity, Phenol, Anthocyanin and Ascorbic Acid Contents in Raspberries, Blackberries, Red Currants, Gooseberries and Cornelian Cherries. *Food Chemistry*, 102, 777-783.

PARR, A. J. ve G. P. BOLWELL. 2000. Phenols in the Plant and in Human. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of the Diet by Modifying the Phenols Content or Profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 985-1012.

PAWLISZYN J. 1999. Applications of Solid Phase Microextraction. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

PEHLUVAN, M. ve M. GÜLERYÜZ. 2000. Bazı ahududu çeşitlerinin oltu ilçesine adaptasyonu üzerinde bir araştırma. (yayınlanmamış), Erzurum, 74 s.

PELEG. H., NAİM. M., RL. ROUSSEF., U. ZEHAVİ. 1991. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57: 417-426.

POON, G.K. 1998. Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 794:63–74.

PRICE, M.L. ve L.G. BUTLER. 1977. Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25:1268-1273.

PRICE, K. R., T. PROSSER., A. M. F. RICHTIN., M. J. C. RHODES. 1999. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing. *Food Chemistry*, 66: 489-494.

PRIOR, R. L., X. WU., K. SCHAICH. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

PRIOR, R. L, G. CAO., A. MARTIN., E. SOFIĆ., J. MCEWEN., C. O'BRIEN., N. LISCHNER., M. EHLENFELDT., W. KALT., G. KREWER., C. M. MAINLAND. 1998. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2686-2693.

PRIOR, R. L., S. A. LAZARUS., G. CAO., H. MUCCITELLI, J. F. HAMMERSTONE. 2001. Identification of Proanthocyanidins and Anthocyanins in Blueberries and Cranberries (*Vaccinium spp.*) Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1270-1276.

ØYDVIN J. 1974. Inheritance of Four Cyanidin-3-Glycosides in Red Currant. *Hortic Res*, 14: 1-7.

RAMSTRÖM, J., K. SKUDAR., J. HAINES., P. PATEL., O. BRÜGGEMANN. 2001. Food Analyses Using Molecularly Imprinted Polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5) 2105-2114.

REGNAULT-ROGER, C., R. HADIDANE., J.F. BIARD., K. BOUKEF. 1987. High Performance Liquid and Thin -Layer Chromatographic Determination of Phenolic Acids in Palm (*Phoenix dactilifera*) Products. *Food Chemistry*, 25: 61–71.

REIN, M. 2005. Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. Helsinki: University of Helsinki. pp. 10–14.

RICE-EVANS, C.A., N.J. MILLER., G. PAGANGA. 1996. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20:933–956.

ROBARDS, K. ve M. ANTOLOVICH. 1997. Analytical Chemistry of Fruit Bioflavonoids: A Review. *Analyst*. 122:11R–34R.

ROBBINS, R. J. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2866-2887.

RODRIGUEZ-ARCOS, R.C., A.C. SMITH., K.W. WALDRON. 2002. Effect of Storage on Wall-Bound Phenolics in Green Asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11):3197-3203.

ROMMEL, A. ve R. E. WROLSTAD. 1993a. Ellagic Acid Content of Red Raspberry Juice as Influenced by Cultivar, Processing and Environmental Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1951-1960.

ROMMEL, A. ve R. E. WROLSTAD. 1993b. Influence of Acid and Base Hydrolysis on the Phenolic Composition of Red Raspberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41:1237–1241

ROMMEL, A. ve R. E. WROLSTAD. 1993c. Composition of flavonols in red raspberry juice as influenced by cultivar, processing and environmental factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1941-1950.*

ROUSEFF. R.L., K. SEETHARAMAN., NAİM. M., S. NAGY., U. ZEHAVİ. 1992. Improved HPLC determination of hydroxycinnamic acids in orange juice using solvents containing THF. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1139–1143.

SAKAKIBARA, H., Y. HONDA., S. NAKAGAWA., H. ASHIDA., K. KANAZAWA. 2003. Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits and Teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 571-581.

SAPERS, G. M., S. B. JONES., G. T. MAHER. 1983a. Factors Affecting the Recovery of Juice and Anthocyanin from Cranberries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 246-249.

SAPERS, G. M., J. G. PHILLIPS., H. M. RUDOLF., A. M. DIVITO. 1983b. Cranberry Quality: Selection Procedures for Breeding Programs. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 108: 241–246.

SCALBERT, A. ve G. WILLIAMSON. 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *Journal of Nutrition*. 130: 2073S-2085S.

SCALBERT, A., C. MANACH., C. REMESY., L. JIMENEZ. 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4): 287-306.

SCHMIDTLEIN, H. ve K. HERRMANN. 1975. Quantitative Analysis of Phenolic Acids by Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography*, 115: 123-128.

SCHUSTER, B. ve K. HERRMANN. 1985. Hydroxybenzoic and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Soft Fruits. *Phytochemistry*, 24: 2761-2764.

SELLAPPAN, S., C. C. AKOH., G. KREWER. 2002. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432-2438.

SENER, S. D., J. A. ROBERTSON., F. I. MEREDITH. 1989. Phenolic Compounds of the Mesocarp of Cresthaven Peaches during Storage and Ripening. *Journal of Food Science*, 54: 1259-1268.

SEO, A. ve C.V. MORR. 1984. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phenolic Acids and Isoflavonoids From Soybean Protein Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32:530–533.

SHAHIDI, F. ve M. NACZK. 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications.* Technomic Publishing Company. Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc.

SHAHIDI, F. ve M. NACZK. 2004. *Phenolics in Food and Nutraceuticals.* CRC Pres, Boca Raton, FL.

SHARMA, O. P. ve T. K. BHAT. 2009. DPPH antioxidant revisited. *Food Chemistry*, 1202-1205.

SINGLETON, V. L. ve E. TROUSDALE. 1983. White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *American Society for Enology and Viticulture*, 34: 27-34.

SIRIWOHARN, T. ve R. E. WROLSTAD. 2004. Polyphenolic Composition of Marion and Evergreen Blackberries. *Journal of Food Science*, 69, 233-240.

SIRIWOHARN, T., R. E. WROLSTAD., C. E. FINN., C. B. PEREIRA. 2004. Influence of Cultivar, Maturity, And Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 8021-8030.

SPRINGOB, K., J. NAKAJIMA., M. YAMAZAKI., K. SAITO. 2003. Recent Advances in The Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins. *Natural Products Reports*, 20: 288-303.

SROKA, Z. ve CISOWSKI. W. 2003. Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-Radical Activity of Some Phenolic Acids. *Food and Chemical Toxicology*. 41: 753-758.

SUN, J., Y. F. CHU., X. WU., R. H. LIU. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449-7454.

STARKE, H., K. HERRMANN. 1976. The phenolics of Fruits. VIII. Changes in Flavonol Concentrations during Fruit Development. *Z Lebensm-Unters Forsch*, 161: 131–135.

STÖHR, H. ve K. HERRMANN. 1975a. The Phenolics of Fruits. VI. The Phenolics of Currants, Gooseberries and Blueberries. Changes in Phenolic Acids and Catechins During Development of Black Currants. *Z Lebensm-Unters Forsch*, 159: 31-37.

STÖHR, H. ve K. HERRMANN. 1975b. The Phenolics of Fruits. V. The Phenolics of Strawberries and Their Changes During Development and Ripeness of the Fruits. *Z Lebensm-Unters Forsch* 159: 341-348.

STRACK, D. 1997. Phenolic Metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Plant Biochemistry*. London, UK: Academic Pres. s.387–416.

SWEELEY, C. C., R. BENTLEY., M. MAKITA., W.W. WELLS. 1963. Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. *Journal of the American Chemical Society*. 85(16): 2497-2507.

TARUSCIO, T. G., D. L. BARNEY., J. EXON. 2004. Content and Profile of Flavonoid and Phenolic Acid Composition in Conjunction with Antioxidant Capacity for A Variety of Northwest Vaccinium Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3169-3176.

TOMÁS-LORENTE, F., C. GARCÍA-VIGUERA., F. FERRERES., F.A. TOMÁS-BARBERÁN. 1992. Phenolic Compounds Analysis in the Determination of Fruit Jam Genuineness. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40: 1800-1804.

TORRE, L. C. ve B. H. BARRIT. 1977. Quantitative Evaluation of Rubus Fruit Anthocyanin Pigments. *Journal of Food Science*, 42: 488–490.

ANONİM. TS 6397. Meyve, Sebze ve Mamulleri-Askorbik Asit Tayini-Bölüm 2: Rutin Metotlar.

VAN SUMERE, C.F, W. VAN BRUSSEL., K. VANDE CASTEELE., VAN ROMPAE. 1978. Y. Recent Advances in the Separation of Plant Phenolics. In: Swain T, Harborne JB, van Sumere CF, eds. *Biochemistry of Plant Phenolics: Recent Advances in Phytochemistry*, Vol 12, USA: Plenum Pres, New York. p.1–28.

VINHA, A. F., F. FERRERES., B.M. SILVA., P. VALENTÃO., A. GONÇALVES., J. A. PEREIRA., M. B. R. OLIVEIRA., M. SEABRA., P.B. ANDRADE. 2005. Phenolic Profiles of Portuguese Olive Fruits (*Olea Europaea* L.): Influences of Cultivar and Geographical Origin. *Food Chemistry*, 89:561-568.

WALLACE, G. ve S.C. FRY. 1994. Phenolic Components of the Plant Cell Wall. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 151: 229–267.

- WANG, S. Y. ve H-S. LIN. 2000.** Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 140-146.
- WANG, J. ve P. SPORNS. 1999.** Analysis of Anthocyanins in Red Wine and Fruit Juice Using MALDI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (5) 2009-2015.
- WATERMAN, P.G. ve S. MOLE. 1994.** In: Lawton Jh, Likens Ge, eds. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites. The Methods in Ecology Series.* Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- WILDANGER, W. ve K. HERRMANN. 1973.** The phenolics of fruits. II. The flavonols of fruits. *Z Lebensm-Unters Forsch.* 151:103–108.
- WILLIAMS, C. A. ve R. J. GRAYER. 2004.** Anthocyanins and Other Flavonoids. *Natural Products Reports*. 21: 539-573.
- WINTER, M. ve K. HERRMANN. 1986.** Esters and Glucosides Hydroxyl-Cinnamic Acids in Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34: 616-620.
- WITHY, L. M., T. T. NGUYEN., R. E. WROLSTAD., D. A. HEATHERBELL. 1993.** Storage Changes in Anthocyanin Content of Red Raspberry Juice Concentrate. *Journal of Food Science*, 58: 190-192.
- WOJDYLO, A.; OSZMIĄŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. 2007.** Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949.
- WOLFENDEN, B.S. ve R.L. WILLSON. 1982.** Radical-Cations as Reference Chromogens in Kinetic Studies of One-Electron Transfer Reactions:Pulse Radiolysis Studies of 2,29-Azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Journal of Chemical Society. Perkin Transactions*, 2:805–812.
- WROLSTAD, R. E., R. W. DURST., J. LEE. 2005.** Tracking Color and Pigment Changes in Anthocyanin Products. *Trends in Food Science and Technology*, 16(9): 423-428.
- YAN, X., B. T. MURPHY., G. B. HAMMOND., J. A. VINSON., C. C. NETO. 2002.** Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5844-5849.
- ZADERNOWSKI, R. 1987.** Studies on phenolic compounds of rapeseed flour. *Acta Acad. Agric. Technol. Olst. Technol. Aliment., Suppl. F.* 21: 3-55.
- ZAFRILLA, P., F. FERRERES., F.A. TOMÁS-BARBERÁN. 2001.** Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivatives and Flavonoids of Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3651-3655.

ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W. 1999. Determination of flavonoid content in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64:555-559.

ZUO, Y., C. WANG., J. ZHANG. 2002. Separation, Characterization, Quantitation of Benzoic and Phenolic Antioxidants in American Cranberry Fruit by GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3789-3794.

EKLER

TEZ KAPSAMINDA YAPILAN BİLİMSEL FAALİYETLER

Ulusal Kongreler

- ❖ Bursa'da Yetiştirilen Bazı Ahududu (*Rubus idaeus* L.) ve Böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) Çeşitlerinin Fenolik Bileşiklerinin Donmuş Muhafaza Süresine Bağlı Olarak Değişimlerinin LC-MS ile Belirlenmesi. Sarıburun E., Türkben C., Demir C., IV. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 25-27 Haziran 2008. Elazığ.
- ❖ Böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) Çeşitlerinde Toplam Fenol ile Antioksidan Aktivite Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. Sarıburun E., Şahin S., Demir C., XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi 23-26 Haziran 2009. Ankara.

Uluslararası Kongreler

- ❖ Determination of Anthocyanins in Some Raspberry (*Rubus idaeus* L.) and Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Species Grown in Bursa (Turkey). Sarıburun E., Demir C., 6th Aegean Analytical Chemistry Days 9-12 Ekim 2008. Denizli.

ÖZGEÇMİŞ

08.01.1984 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimi Bursa'da tamamladı. 2002 yılında U.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazanarak, aynı bölümden 2006 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu. 2007 yılında U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamız süresince her türlü imkânı sağlayan, bilgisini, yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cevdet DEMİR'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her koşulda yanımda olan, güvenini ve desteğini her zaman hissettiğim Araő.Gör. Saliha ŞAHİN'e; yardımını ve laboratuvar imkanlarını hiçbir zaman esirgemeyen Araő.Gör. Bilgen OSMAN'a; bitkisel materyal konusunda yardımcı olan ve teminini sağlayan Doç Dr. Cihat TÜRK BEN'e teőekkürü borę bilirim.

Bu tez Bursa'da yetiştirilen bazı ahududu (*Rubus idaeus* L) ve böğürtlen (*Rubus fruticosus* L.) eőtlerinin fenolik bileşikleri ve antioksidant aktivitelerinin donmuş muhafaza süresine bağlı olarak değişimlerinin incelenmesi projesiyle (Z 2008/20) U.Ü Bilimsel Araştırma Fonu kuruluőu tarafından desteklenmiőtir. Bu amaçla U.Ü Bilimsel Araştırma Fonuna teşekkür ederim. Ayrıca LC-MS çalıőmalarımızı gerçekleőtirdięim Tübitak Bursa Test ve Analiz Laboratuvarı (TÜBİTAK-BUTAL) alıőanlarına da teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarım boyunca maddi, manevi her türlü desteklerinden ve göstermiőt oldukları sabır, anlayıő, içtenlik ve özveriden dolayı aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.