

ISPARTA GÜLÜ (R. damascena) YAPRAKLARININ  
FLAVONOİD YAPISI VE REÇEL ÜRETİMİ AMACIYLA  
MUHAFAZA YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Doktora Tezi

Y. Sedat VELİOĞLU

Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Ankara 1990

13005

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISPARTA GÜLÜ (R. damascena) YAPRAKLARININ FLAVONOİD  
YAPISI VE REÇEL ÜRETİMİ AMACIYLA MUHAFAZA  
YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Y.Sedat VELİOĞLU

Y. G.

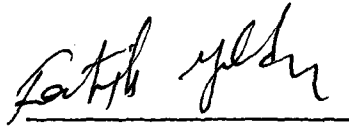
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

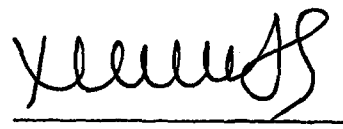
DOKTORA TEZİ

GIDA BİLİMİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 23.1.1991 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından  
95(Doksanbeş).Not Takdir Edilerek Oybirliği/Oyçokluğu  
ile Kabul Edilmiştir.







Prof. Dr. Bekir CEMEROĞLU  
(Danışman)

Prof. Dr. Fatih YILDIZ  
(Üye)

Doç. Dr. Nevzat ARTIK  
(Üye)



## ÖZET

## DOKTORA TEZİ

ISPARTA GÜLÜ (R. damascena) YAPRAKLARININ FLAVONOİD  
YAPISI VE REÇEL ÜRETİMİ AMACIYLA MUHAFAZA  
YÖNTEMLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Y.Sedat VELİOĞLU

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Bekir CEMEROĞLU  
1990. Sayfa: 78

Jüri: Prof.Dr. Bekir Cemeroğlu  
Prof.Dr. Fatih Yıldız  
Doç.Dr. Nevzat Artık

Gül reçeli, R. damascena (Mill.) yapraklarından üretilen, ülkemize özgü bir gıdadır. Yıl boyunca gül reçeli üretiminde kullanmak amacıyla yaprakların muhafazası için uygulanan geleneksel yöntemde; 1 kısım yaprak, 2 kısım kristal şekerle karıştırılmakta ve variller içerisinde, oda sıcaklığında muhafaza edilmektedir. Bu araştırmada, muhafaza sırasında gül yapraklarının renk değişimine etki eden faktörlerle, R. damascena'nın flavonoid yapısı araştırılmıştır.

Araştırma sonuçları, yaprakların % 1 oranında sitrik asit veya % 0.5 EDTA içerisinde 1 dakika süreyle haşlandıktan sonra dondurulması halinde, rengin oldukça iyi bir düzeyde korunabileceğini göstermiştir. Geleneksel yöntem uygun olarak veya tarafımızdan önerilen yöntemle göre muhafaza edilen yapraklarda, 12 aylık depolama süresinin sonunda, korunan antosiyanin düzeyinin sırasıyla % 0 ve % 70 olduğu saptanmıştır. Yüksek basınç likit kromatografik (HPLC), kağıt kromatografik ve spektrofotometrik yöntemler uygulanarak yapılan analizlerle, R. damascena'nın başlıca antosiyanininin, siyanidin 3-5-diglukozit olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, kuersetin 3-glukozit, kuersetin 3-glukozilgalaktozit, kuersetin 3-arabinozit, kampferol 3-galaktozilarabinozit, kampferol 3-glukozilarabinozit, kampferol 3-arabinozit, kampferol 3-ramnozilglukozit, kampferol 3-ramnozilgalaktozit ve kampferol 3-rutinozil-7-arabinozit olmak üzere 9 flavonoidin tanısı yapılmıştır. Yüksek basınç likit kromatografisinde belirlenmiş diğer bazı piklere ise, flavan 3-ol tanısı konmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Isparta gülü (R. damascena), flavonoller, antosiyaninler, gül reçeli

ABSTRACT

PH.D.THESIS

STUDIES ON THE FLAVONOID COMPOSITION OF PETALS OF ISPARTA  
ROSE (*R. damascena*) AND ITS PRESERVATION FOR JAM  
PRODUCTION

Y.Sedat VELİOĞLU

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Science and Technology

Supervisor: Prof.Dr. Bekir CEMEROĞLU  
1990, 78 pages

Jury: Prof.Dr. Bekir Cemeroğlu  
Prof.Dr.Fatih Yıldız  
Assoc.Prof.Dr.Nevzat Artık

Rose jam is a treasured food, manufactured from the petals of *Rose damascena* (Mill.). The traditional method of preservation of rose petals for year-round production of jam is by adding two parts of sugar and one part petals and storing the mixtures in drums at room temperature. In this study, factors influencing color changes in preserved rose petals and flavonoid composition of *R. damascena* were examined.

Results revealed that improved color retention could be obtained by blanching petals in 1 % citric acid or 0.5 % EDTA solutions for one minute prior to freezing. The retention of anthocyanins after 12 months storage was 0 % and 70 % in petals preserved by the traditional and recommended methods, respectively. High Performance Liquid Chromatographic (HPLC), paper chromatographic and spectrophotometric analyses showed that the main anthocyanin of *R. damascena* is cyanidin 3-5-diglucoside. Also 9 flavonoids were identified as quercetin 3-glucoside, quercetin 3-glucosylgalactoside, quercetin 3-arabinoside, kaempferol 3-galactosylarabinoside, kaempferol 3-glucosylarabinoside, kaempferol 3-arabinoside, kaempferol 3-rhamnosylglucoside, kaempferol 3-rhamnosylgalactoside, and kaempferol 3-rutinosyl-7-arabinoside. Other several peaks were identified as flavan 3-ols.

KEYWORDS: Isparta rose (*R. damascena*), flavonols, anthocyanins, rose jam

## TEŞEKKÜR

Araştırmamın her aşamasında yakın ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Bekir Cemeroğlu'na (AÜ) ve hocam Dr. G. Joe Mazza'ya (AC), araştırmamın bir bölümünü yurtdışında yürütmem yönündeki teşvik ve laboratuvar çalışmalarımındaki büyük yardımları için hocam Doç. Dr. Nevzat Artık'a (AÜ), ve bu araştırmaya destek veren Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu ile TÜBİTAK'a içten teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim. Ayrıca, karşılaştığım güçlükleri aşabilmem için hiçbir yardımdan kaçınmayan ekip arkadaşım Asistan M. Sc. Bert Siemens'e (AC), yardımlarını gördüğüm M. Sc. Lynn Collicutt'a (AC), Cheryl Scharf'a (AC), Bilg. Müh. Robert Palmer'a (AC), teknisyen Lorne C. Kyle'a (AC), bazı standartları sağlayan ve bu nedenle araştırmamın "Materyal ve Metod" bölümünde isimleri verilmiş bulunan kişilere, materyal temininde her türlü kolaylığı sağlamış bulunan GÜLBİRLİK (Isparta) yetkililerine de burada teşekkür ederim.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>AÜ: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü. AC: Agriculture Canada Research Station, Morden, Manitoba, Kanada.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                  | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. GİRİŞ.....                                                                                    | 1     |
| 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....                                                  | 4     |
| 3. MATERİYAL VE METOD.....                                                                       | 27    |
| 3.1. Materyal.....                                                                               | 27    |
| 3.2. Yöntemler.....                                                                              | 27    |
| 3.2.1. Muhafaza yöntemleri.....                                                                  | 27    |
| 3.2.1.1. Haşlama uygulandıktan sonra dondurarak<br>muhafaza.....                                 | 27    |
| 3.2.1.2. Haşlama uygulandıktan sonra şeker şurubu<br>içerisinde dondurarak muhafaza.....         | 28    |
| 3.2.1.3. Pastörizasyon yolu ile muhafaza.....                                                    | 28    |
| 3.2.1.4. Sıcak dolum yolu ile muhafaza.....                                                      | 29    |
| 3.2.1.5. Gül yapraklarının "maya" halinde muhafaza<br>sı.....                                    | 29    |
| 3.2.2. Analiz yöntemleri.....                                                                    | 29    |
| 3.2.2.1. Toplam antosiyanin tayini.....                                                          | 29    |
| 3.2.2.2. Flavonoidlerin kalitatif olarak belirlen-<br>mesi.....                                  | 30    |
| 3.2.2.3. Askorbik asit tayini.....                                                               | 38    |
| 3.2.2.4. Toplam katı madde tayini.....                                                           | 38    |
| 3.2.2.5. Kül tayini.....                                                                         | 38    |
| 3.2.2.6. Çözünür katı madde tayini.....                                                          | 38    |
| 3.2.2.7. Protein tayini.....                                                                     | 38    |
| 3.2.2.8. Titrasyon asitliği ve pH tayini.....                                                    | 38    |
| 3.2.2.9 Demir, çinko, mangan, bakır, magnezyum ta-<br>yini.....                                  | 39    |
| 3.2.2.10. Fosfor tayini.....                                                                     | 39    |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....                                                                      | 40    |
| 4.1. Gül Yapraklarının Bileşimi.....                                                             | 40    |
| 4.2. Yaprakların Muhafaza Yöntemleri.....                                                        | 41    |
| 4.3. Gül Yapraklarının Flavonoid Yapısı.....                                                     | 47    |
| 4.3.1. Araştırmada kullanılan standartlara ilişkin<br>olarak saptanmış bulunan bazı veriler..... | 47    |
| 4.3.2. Gül yapraklarının flavonoidleri.....                                                      | 51    |
| 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....                                                                     | 63    |
| KAYNAKLAR.....                                                                                   | 70    |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                                                 | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tablo 2.1. Flavonoidlerin en yaygınları ve kimyasal yapıları.....                                                                               | 9     |
| Tablo 2.2. Flavonoidlerin amonyaklı ve amonyaksız ortamda ultraviyole ışık altında verdikleri renkler.....                                      | 10    |
| Tablo 2.3. Değişik flavonoidlerin absorpsiyon maksimumları.....                                                                                 | 11    |
| Tablo 2.4. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde NaOMe eklendikten sonra oluşan değişmeler.....                                       | 13    |
| Tablo 2.5. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde NaOAc eklendikten sonra oluşan değişmeler.....                                       | 14    |
| Tablo 2.6. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> eklendikten sonra oluşan değişmeler.....        | 14    |
| Tablo 2.7. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde AlCl <sub>3</sub> ve AlCl <sub>3</sub> /HCl eklendikten sonra oluşan değişmeler..... | 15    |
| Tablo 2.8. Bazı antosiyaninlere ilişkin spektral veriler.....                                                                                   | 16    |
| Tablo 4.1. Gül gonca ve yapraklarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....                                                                | 40    |
| Tablo 4.2. Tekli ve pH differansiyel metodları arasındaki farkın istatistikî değerlendirilmesi.....                                             | 41    |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4.3. Değişik uygulama yöntemlerine göre muhafaza edilen örneklerin antosiyanin miktarlarında depolama süresince beliren azalmalar.....                                                                  | 42 |
| Tablo 4.4. Bazı fenolik maddelerin geliş süreleri ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ) ve kapasite faktörleri ( $k'$ ).....                                                                           | 48 |
| Tablo 4.5. Gül flavonoidlerine ilişkin olarak elde edilen kromatogramdaki piklerin özgül değerleri ve pik alanları [geliş süresi ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ), kapasite faktörü ( $k'$ )..... | 52 |
| Tablo 4.6. <i>R. damascena</i> antosiyaninine ilişkin spektral veriler.....                                                                                                                                   | 54 |
| Tablo 4.7. <i>R. damascena</i> flavonal glukozitlerinin metanoldeki ve 5 farklı shift reaksi-<br>findeki spektral nitelikleri.....                                                                            | 58 |
| Tablo 4.8. <i>R. damascena</i> flavonoidlerinin aglukon ve şeker kısımlarına ilişkin kromatografik veriler.....                                                                                               | 59 |
| Tablo 4.9. <i>R. damascena</i> 'da tanısı yapılmış flavonoidler.....                                                                                                                                          | 60 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                          | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Hidroksibenzoik asit(a), hidroksisinnamik asit(b) ve flavonoidlerin genel formülleri(c).....                  | 7     |
| Şekil 2.2. Flavonoidlerin oluşum basamakları.....                                                                        | 8     |
| Şekil 2.3. Eşit hidroksillenme basamağındaki bazı flavonoidlerin ultraviyole-görünür spektrumdaki spektral eğrileri..... | 12    |
| Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan HPLC sistemi....                                                                       | 31    |
| Şekil 4.1. Gül yapraklarının muhafazasındaki uygulama farklılıklarına göre antosiyanin miktarlarındaki değişimler.....   | 44    |
| Şekil 4.2. Haşlama sürelerinin muhafaza edilen yapraklarda antosiyanin korunması üzerine etkileri.....                   | 45    |
| Şekil 4.3. Antosiyanin miktarı üzerine haşlama suyundaki sitrik asit oranı ile haşlama sürelerinin etkileri.....         | 45    |
| Şekil 4.4. Antosiyanin miktarı üzerine haşlama suyundaki EDTA oranı ile haşlama sürelerinin etkileri.....                | 46    |
| Şekil 4.5. Tarafımızdan önerilen yöntemlerle geleneksel yöntemin karşılaştırılması..                                     | 47    |
| Şekil 4.6. Bazı standartların HPLC yardımıyla saptanmış spektral eğrileri [Narinjin(a), Krisin(b), Klorojenik asit(c)].  | 49    |

- Şekil 4.7. Bazı standartların HPLC yardımıyla saptanmış spektral eğrileri [D(-) Kateşin(d), p-hidroksibenzoik asit(e), Apijenin(f)..... 50
- Şekil 4.8. Gül (R. damascena) yapraklarının fla-vonoidlerine ilişkin kromatogram (Kü-çük şekil eluasyon profilini göster-mektedir)..... 51
- Şekil 4.9. R. damascena antosiyaninine ilişkin spektral eğri [% 0.01 HCl içeren meta-nolde(a), aynı çözelti+AlCl<sub>3</sub>(b)]..... 54
- Şekil 4.10. 16 no'lu pikin değişik shift reaktif-lerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile]..... 55
- Şekil 4.11. 21 no'lu pikin değişik shift reaktif-lerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile]..... 56
- Şekil 4.12. 26 no'lu pikin değişik shift reaktif-lerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile]..... 57
- Şekil 4.13. Vanilin testine ilişkin spektrogram [Asetik asit(a), metanol(b) içeren test çözeltileri ile]..... 59
- Şekil 4.14. Gül çeşitlerinin HPLC ile saptanmış flavonoid profilleri [Koyu kırmızı gül(a), R. damascena(b), beyaz gül(c). 61

## 1-GİRİŞ

Ülkemizde reçel ve benzeri gıdaların üretiminde taze meyvelerin yanında değişik yöntemlerle dayanıklı hale getirilmiş meyveler, hatta bazı sebze ve yaprak gibi hammaddeler de kullanılmaktadır. Reçel üreten firmalar, genellikle 1 kısım hammadde üzerine 2 kısım şeker ilavesi ile sezonu içinde hazırlanmış bulunan ve "maya" olarak adlandırılan bir ara ürünü kullanmaktadırlar. Kalite faktörü bir tarafa bırakılırsa, reçel üretiminde bu şekilde dayanıklı hale konmuş bir materyalin kullanılması ekonomik ve halen belki de tek seçenek olarak görülmekte ve bu sayede sezon dışı dönemlerde de reçel üretimi mümkün olmaktadır.

Maya olarak adlandırılan bu ürüne en belirgin örnek "gül mayası" dır. Isparta yöresinde yetiştirilen güllerin taç yapraklarının %1. kadarının bu amaçla kullanılmakta ve bu yolla 100 ton civarında "gül mayası" üretilmekte olduğu ileri sürülmektedir (Tortopoğlu vd 1986). Belirtilen bu miktar, ekonomik açıdan önemli sayılabilecek düzeydedir.

Günümüzde reçel üretiminde kullanılan gül yapraklarının işlenme ve saklanma koşullarının yetersizliği nedeniyle güle özgü renkte gül reçeli üretimi mümkün olmamaktadır. Ayrıca belirtilen bu yöntemle üretilen mayalarda hakim olan uygun koşullar nedeniyle oluşan aşırı inversiyon sonucunda, reçelde kristallenme oluşumu ve reçele aşırı mikrobiyel yük taşınması gibi sorunlarla da karşılaşılmaktadır. Bu durumda renk sorununun çözümü için yapay veya doğal boyaların kullanımı gerekli olmaktadır. Ancak yapay boyaların sağlık üzerine herkesce bilinen olumsuz etkileri yüzünden son yıllarda bu ürünlerde kullanımının yasaklanmış olması, mevcut doğal boyaların ise bu amaca tam uymaması, bu ürünlerde istenen renk tonunun elde edilmesini olanaksız kılmaktadır. "Maya" kullanmanın

reçelde neden olduğu kristalizasyon ve reçele aşırı mikrobiyel yük taşınması gibi sorunların çözümü içinse yeni muhafaza teknolojilerinin geliştirilmesi gerekli olmaktadır.

Bilindiği gibi pekçok meyve ve çiçeklerin renkleri antosiyanin adı verilen pigmentlerden kaynaklanmaktadır. Günümüzde bu pigmentlerin bitkiler dünyasındaki dağılımı, kimyasal ve biyokimyasal nitelikleri hakkında pek çok veri ortaya konulmuş bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda, antosiyanin pigmentlerinin diğer bazı flavonoidlerle bir arada bulunması halinde stabilitesinin son derece arttığı belirlenmiş olduğundan gıdaların doğal boya-  
 yalarla renklendirilmesi konusunda önümüze yeni ufuklar açılmıştır (Mazza ve Brouillard 1987, Mazza ve Brouillard 1990, Asen vd 1972). Bu araştırmayla başlangıçta sadece gül yapraklarının renk stabilitesinin arttırılması hedeflenmişse de çalışmanın ileri aşamasında gülün flavonoid yapısının belirlenmesinin gerekli olduğu sonucuna varılarak araştırma bu yönde genişletilmiştir. Ulaşılan bulgularla R. damascena'nın flavonoid yapısı aydınlatılarak literatüre kazandırılmıştır. Şu husus vurgulanmalıdır ki pigment stabilitesini arttırabilmek açısından önemleri yukarıda belirtilen flavonoid preparatlarının fiyatlari-  
 nin son derece yüksek olmaları nedeniyle günümüzde pratik olarak kullanım olanakları oldukça sınırlı bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmada, öncelikle pratikte uygulanma olanağına sahip seçenekler araştırılmıştır. Bu amaçla konu üzerinde yürütülen ön denemelerden alınan sonuçlar değerlendirilerek daha sonra bu ön deneme sonuçlarının bazıları bir sempozyumda kısa bir bildiri ile sunulurken, diğer taraftan bir periyodikte yayımlanmıştır (Cemeroğlu vd 1989).

Gül yaprağının genel bileşimi ve muhafaza yöntemleri üzerinde yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü, gülün flavonoid yapısının incelenmesi ve aydınlatılması oluşturmıştır. Nitekim 28 farklı flavonoidin, HPLC

aygıtında "metanol-formik asit-su" sürükleyici solventleri kullanılarak geliş zamanları, ultraviyole maksimumları ve kapasite faktörleri literatüre kazandırılarak bulgular Wulf ve Nagel (1976), Daigle ve Conkerton (1982), Castele ve vd (1983) ve Mazza (1986) tarafından hazırlanan tablolar ile karşılaştırılmış ve bu tablolar bazı farklı flavonoidlerle genişletilmiştir. Ayrıca Wulf ve Nagel (1976) tarafından sürpriz olarak karşılaşılan klorojenik asitin kafeik asitten sonra elue edilmesi olayı da bir kez daha kontrol edilmiştir.

Araştırmada flavonoidlerin izolasyon ve tanısının önemli bir ağırlık kazanması nedeniyle, bu konuda uygulanmış metodlar oldukça ayrıntılarla verilmiştir. Bu konuda çok az Türkçe kaynak bulunduğundan bu alanda çalışacak araştırmacıların, bazı yöntemlere kolaylıkla ulaşması amaçlanmıştır. "Materyal ve Metod" bölümünün bu nedenle geniş tutulduğunun vurgulanmasında yarar bulunmaktadır.

## 2-KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

*Rosa damascena* (Mill.) ülkemizde Isparta yöresinde özellikle gül yağına işlenmek amacıyla üretilmektedir. Bu nedenle Türkçe kaynaklarda "Isparta Gülü" olarak anılmaktadır. Bu ürünün Türkiye dışındaki başlıca üreticileri Bulgaristan, Suriye ve Sovyetler Birliği'dir. Dünya üzerinde gül tarımı yapılan alanların toplamı 9.305 hektar olup, gül yağı üretimi ise 13 ton'dur (Staikow 1966; Krüssmann 1981' dan). Bu kaynakta Türkiye'de gül tarımı yapılan alanlar hatalı olarak 1.385 hektar olarak bildirilmektedir. Gerçek alan ise 65.757 dekadır (Okur 1989).

*R. damascena* literatürde "damask gülü" veya "kazanlık gülü" olarak da isimlendirilmektedir. Damask isminin Suriye'nin "Damascus" (Şam) ili ile bir ilgisinin olmadığı, "damask" isminin aynı özellikleri taşıyan bir çok gül türü için kullanıldığı bildirilmektedir. *R. damascena*, orijini Avrupa ve Ortadoğu olan *R. gallica* ile orijini Yakın Doğu olan *R. phoenicea* 'nin doğal melezlenmesi sonucunda yüzyıllar önce ortaya çıkmıştır (Cogiatti 1986).

Bir goncadaki petallerinin sayısı 30 olan *R. damascena* Doğu Avrupa'da esas olarak attar adı verilen ham gül yağı üretimi amacıyla yetiştirilmektedir (Krüssmann 1981; Haring 1986). Attar'ın bileşiminde rodinol, geraniol, nerol, 1-linalool, fenil-etil alkol, farnesol, sitral, öjenol ve karvon adlı bileşikler yer almaktadır. Attar üretimi amacıyla kullanılan başlıca gül çeşitleri *R. damascena*, *R. alba*, *R. centifolia*, ve *R. gallica*'dir. Bu güller arasında uçucu yağ kalitesi ve verimi yönünden en değerli olanı *R. damascena*' dir. Kışa en dayanıklı olan gül çeşidi ise *R. alba*'dır (Krüssmann 1981).

Avrupa'da 1575 yılından bu yana tanınmakta olan *R. damascena*'nın en belirgin özelliği yoğun ve hoş bir kokuya sahip olmasıdır (Crockett 1975, Lindley 1979).

1989 yılında ülkemizde gül tarımına ayrılmış bulunan arazi toplamı 65.757 dekar olup, bu arazinin % 60'ı Isparta, % 28.5'i Afyon ve % 10'u ise Burdur ili sınırları içerisinde. Aynı yıl, gül yaprağı, gül yağı ve gül konkreti (attar) üretimleri ise sırasıyla 3.946 ton, 987 kilogram ve 1.076 kilogram olup, gül yağının 403 kilogramı, konkretin ise 454 kilogramı yurt dışına satılmıştır (Okur 1989).

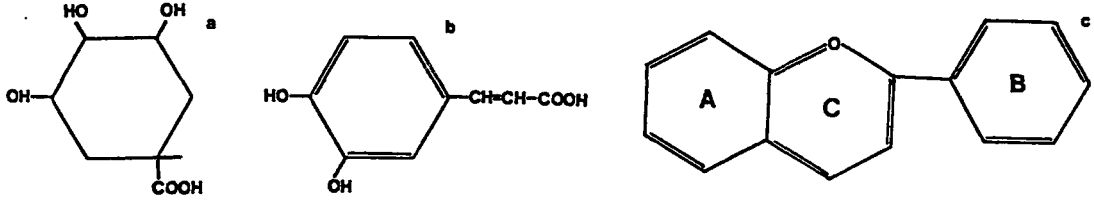
Gül yetiştiriciliği esas olarak gül yağı üretimi için yapılmaktaysa da, bir kısım gül yaprağı ülkemizde reçele işlenmektedir. Gül reçeline işlenmesi açısından gül yaprağının niteliklerinin araştırıldığı herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Ancak Tortopoğlu vd (1986) tarafından yürütülmüş dar kapsamlı bir ön çalışmada bu konuda bazı yargılara varılmaya çalışılmıştır. Ayrıca gül reçeline ilişkin bazı bilgiler ilgili Türk Standardında bulunmaktadır. Nitekim bu standardda (Anonymous 1987) gül reçeli; "Gül bitkisinin (*Rosa damascena* M.) taze veya şeker içinde muhafaza edilmiş taç yapraklarından izin verilen katkı maddeleri ile hazırlanan ve ısı işlemi ile belli koyuluğa getirilmiş olan gıda maddesidir" şeklinde tanımlanmaktadır. Gül reçellerindeki renk sorunu gözönünde tutularak standardda "gerektiğinde renklendirici olarak vişne suyu kullanılabilir" ifadesi de yer almaktadır.

Gül yaprağı üzerinde herhangi bir araştırma yapılmamışsa da gül yağı üzerinde çok sayıda çalışma olduğuna kuşku yoktur. Nitekim Bulgaristan'da üretilen gül uçucu yağlarının kimyasal bileşiminin incelendiği bir araştırmada sekiz farklı gülyacı ele alınmış ve uçucu yağın en önemli iki bileşeninin sitronellol (%22.5) ve geraniol (%22.2) olduğu, aynı araştırmada ele alınan bir Türk gül yağının bileşiminin de diğer örneklerle büyük

bir benzerlik gösterdiği ifade edilmektedir (Dimov ve Tsoutsoulava 1987). Ancak gül yağı bu araştırmamanın konusu dışında bulunmakta olduğundan, bu konuda daha fazla bilgi aktarmaya gerek görülmemiştir.

Diğer taraftan gül reçelini çekici kılan en önemli özelliklerinden birisinin, kendine özgü pembe rengi olduğu unutulmamalıdır. Bu rengin oluşumunda birinci derecede etkili olan antosiyaninler, fenolik maddeler grubuna girerler. Ayrıca son zamanlarda belirlendiği gibi antosiyaninler bitki bünyesinde bulunan diğer fenolik maddelerle etkileşime girerek rengin oluşumu üzerinde ikinci ve daha güçlü bir katkıda bulunmaktadırlar (Mazza ve Brouillard 1990). Bu açıdan gül yaprağının fenolik maddeler içeriği son derece önemlidir. Bitkiler dünyasında çok yaygın olarak bulunan maddelerden birisi olan fenolik maddeler, bitkilerin odunumsu yapıdaki cansız kısımlarının dışında kalan tüm organlarında yer almaktadır. Fotosentez yolu ile üretilen karbonun %2 kadarı fenolik maddelere dönüşmektedir. Tüm dünyadaki bitkisel varlıklar dikkate alınınca bu oran yıllık olarak 1 milyar ton karbona karşılık gelmektedir (Markham 1982).

Fenolik maddeler kendi aralarında fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Fenolik asitler de yine hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Hidroksibenzoik asitler  $C_6-C_1$  yapısında, hidroksisinnamik asitler ise  $C_6-C_3$  yapısında olan maddelerdir. Diğer bir fenolik madde grubu olan flavonoidler ise  $C_6-C_3-C_6$  yapısında maddelerdir. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler renksiz oldukları halde flavonoidlerin bazıları renksiz, bazıları ise renklidirler. En önemli hidroksibenzoik asitler kuinik asit, gallik asit ve 4-hidroksibenzoik asit gibi bileşiklerdir. Meyve ve sebzelerde en yaygın olarak bulunan hidroksisinnamik asitler ise kafeik asit, ferulik asit ve p-kumarik asitlerdir (Şekil 2.1) (Cemeroğlu 1986).



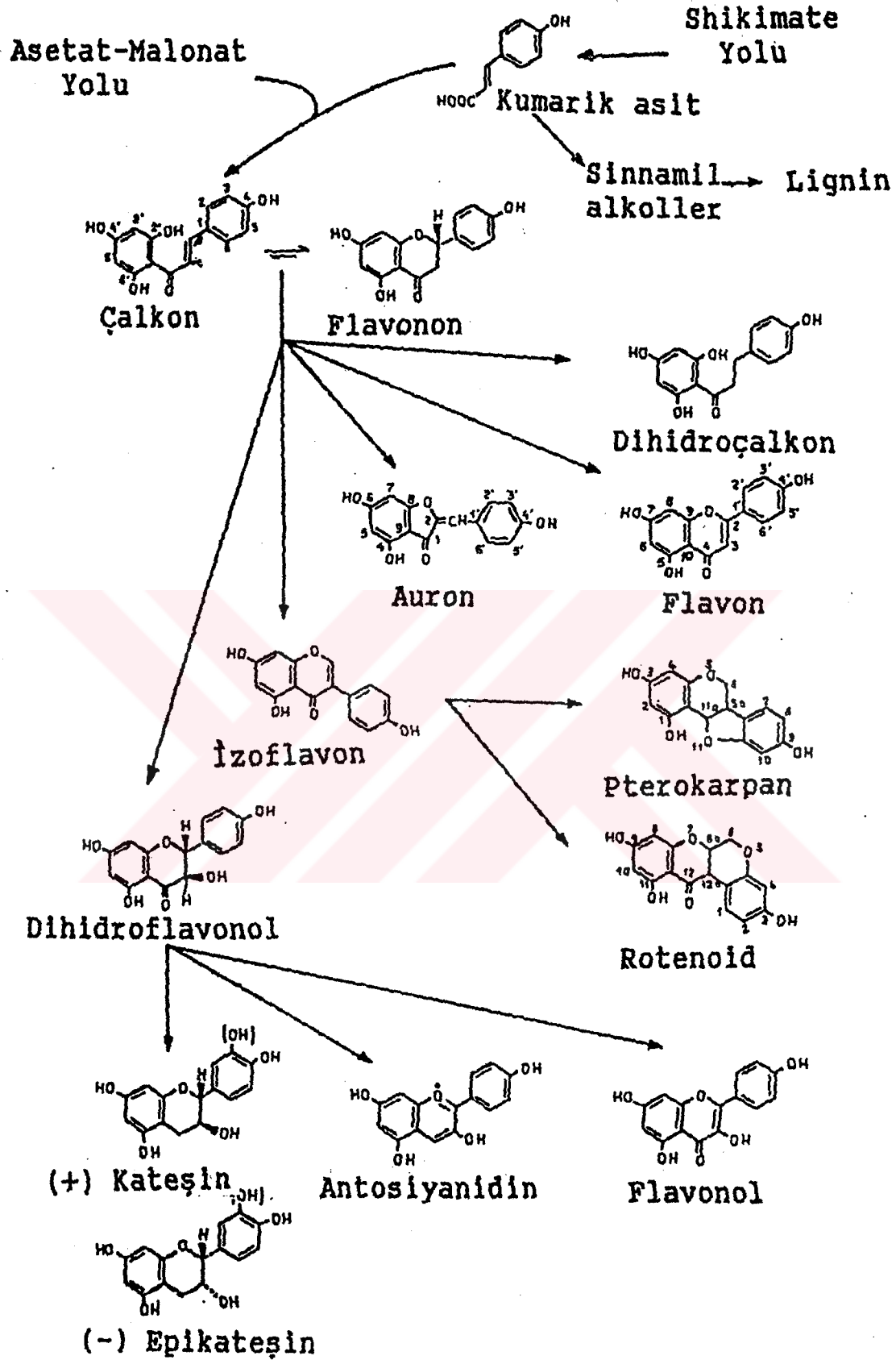
**Şekil 2.1.** Hidroksibenzoik asit(a), hidroksisinnamik asit (b) ve flavonoidlerin(c) genel formülleri.  
(Cemeroğlu 1986)

Günümüzde bilindiği kadarı ile bu üç grupta yer alan maddelerin sentezlenmeleri birbirleri ile yakından ilgilidir. Örneğin sinnamik asit, fenil alaninden, p-kumarik asit ise tirozinden oluşmaktadır. Diğer bir olasılık ise p-kumarik asitin doğrudan sinnamik asitten oluştuğu yönündedir. Daha sonra p-kumarik asitten çalkonlar oluşmakta ve çalkonlardan ise diğer flavonoidler türemektedir (Şekil 2.2) (Wong 1976).

Doğada rastlanan flavonoidlerin en yaygınları ve kimyasal yapıları ise Tablo 2.1'de görülmektedir.

Flavonoidlerin izolasyon ve tanısı oldukça uzun çalışma ve testlerden sonra gerçekleştirilebilmektedir. Örneğin bu amaçla bunların ultraviyole ışık altında ve amonyaklı veya amonyaksız ortamda verdikleri renklerden de yararlanılmaktadır. Bu testle ilgili temel kriterler Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Flavonoidlerin yapısının belirlenmesinde bu maddelerin metanoldeki absorpsiyon spektrumlarından da yararlanılmaktadır. Antosiyaninler üzerinde bu amaçla yapılan testlerde çözücü olarak kullanılan metanol % 0.01 oranında HCl içermelidir. Absorpsiyon spektrumları genellikle iki absorpsiyon maksimumu içermektedir. Bu bantlar, bant II (240-285 nm) ve bant I (300-550 nm) olarak adlandırılmaktadır. Değişik flavonoidlerin absorpsiyon maksimumları Tablo 2.3'de, bunların bazılarına ilişkin spektral eğriler ise Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Flavonoidlerin oluşum basamakları (Wong 1976).

**Tablo 2.1. Flavonoidlerin en yaygınları ve kimyasal yapıları (Markham 1982, Swain 1976 a,b, Geissman 1962)**

| FLAVONLAR     |                   | İZOFLAVONLAR         |                    | BİFLAVONOİDLER   |                                    |
|---------------|-------------------|----------------------|--------------------|------------------|------------------------------------|
| Krisin        | 5,7-OH            | Daidzein             | 7,4'-OH            | Agathisto-flavon | 6,8''-biapijenin                   |
| Bakalein      | 5,6,7-OH          | Formononetin         | 4'-Me daidzein     | Kupresulfoflavon | 8,8''-biapijenin                   |
| Apijenin      | 5,7,4'-OH         | Genistein            | 5,7,4'-OH          | Amentoflavon     | 3'8''-biapijenin                   |
| Akasetin      | 4'-Me apijenin    | Biyosanin-A          | 4'-Me genistein    | Ginkjetin        | Amentoflavon 7,4'dimetil eter      |
| Skutellarein  | 5,6,7,4'-OH       | Orobol               | 5,7,3',4'-OH       | Skiadoptisin     | Amentoflavon 7,4',4''tri-metileter |
| Hispidulin    | 6-Me skutellarein | Tektorijenin         | 5,7,4'-OH 6-OMe    | Robustaf flavon  | 6,3'''-biapijenin                  |
| Luteolin      | 5,7,3',4'-OH      | Baptijenin           | 5,7,3',4',5'-OH    | Hinokiflavon     | 6,4'''bi-O-apijenin                |
| Krisoeriyol   | 3'-Me luteolin    | FLAVONONLAR          |                    | Okinaflavon      | 3',4'''bi-O-apijenin               |
| Diosmetin     | 4'-Me luteolin    | Pinosembirin         | 5,7-OH             | ANTOSİYANİDİNLER |                                    |
| Trisetin      | 5,7,3',4',5'-OH   | Likörیتی-jenin       | 7,4'OH             | Apijenidin       | 5,7,4'-OH                          |
| Trisin        | 3',5'-Me trisetin | Narinjenin           | 5,7,4'-OH          | Luteolini-din    | 5,7,3',4'-OH                       |
| FLAVONOLLAR   |                   | Sakurane-tin         | 7-Me narinjenin    | Pelargoni-din    | 3,5,7,4'-OH                        |
| Galanjin      | 3,5,7-OH          | Eriodikt-yol         | 5,7,3',4'-OH       | Silyanidin       | 3,5,7,3',4'-OH                     |
| Fisetin       | 3,7,3',4'-OH      | Hesperetin           | 4'-Me eriodiktyol  | Peonidin         | 3'-Me silyanidin                   |
| Kampferol     | 3,5,7,4'-OH       | DİHİDROFLAVONOLLAR   |                    | Petunidin        | 3'-Me delfinidin                   |
| Kampferid     | 4'-Me kampferol   | Pinobanksin          | 3,5,7-OH           | Malvidin         | 3',5'-Me delfinidin                |
| Robinetin     | 3,7,3',4',5'-OH   | Aromadendron         | 3,5,7,4'-OH        | GALKONLAR        |                                    |
| Herbasetin    | 3,5,7,8,4'-OH     | Fustin               | 3,7,3',4'-OH       | İzoliküritijenin | 2',4',4-OH                         |
| Kuersetin     | 3,5,7,3',4'-OH    | Taksifolin           | 3,5,7,3',4'-OH     | Buteln           | 2',4',3,4-OH                       |
| Ramnetin      | 7-Me kuersetin    | KATEŞİNLER           |                    | Okanin           | 2',3',4',3,4,-OH                   |
| İzoramnentin  | 3'-Me kuersetin   | (+) kateşin          | 3',4'-OH, 5'-H(2r) | AURONLAR         |                                    |
| Mirisetin     | 3,5,7,3',4',5'-OH | (+) gallo-kateşin    | 3',4',5'-OH (2r)   | Sülfüretin       | 6,3',4'-OH                         |
| Kuersetasetin | 3,5,6,7,3',4'-OH  | (-) epikateşin       | 3',4'-OH, 5'-H(3s) | Aureusidin       | 4,6,3',4'- OH                      |
| Gosipetin     | 3,5,7,8,3',4'-OH  | (-) epigallo-kateşin | 3',4',5'-OH(3s)    | Maritimetin      | 6,7,3',4'- OH                      |
|               |                   |                      |                    | Leptosidin       | 6,3',4'-OH, 7-OMe                  |

**Tablo 2.2. Flavonoidlerin amonyaklı ve amonyaksız ortamda ultraviyole ışık altında verdikleri renkler (Markham 1982)**

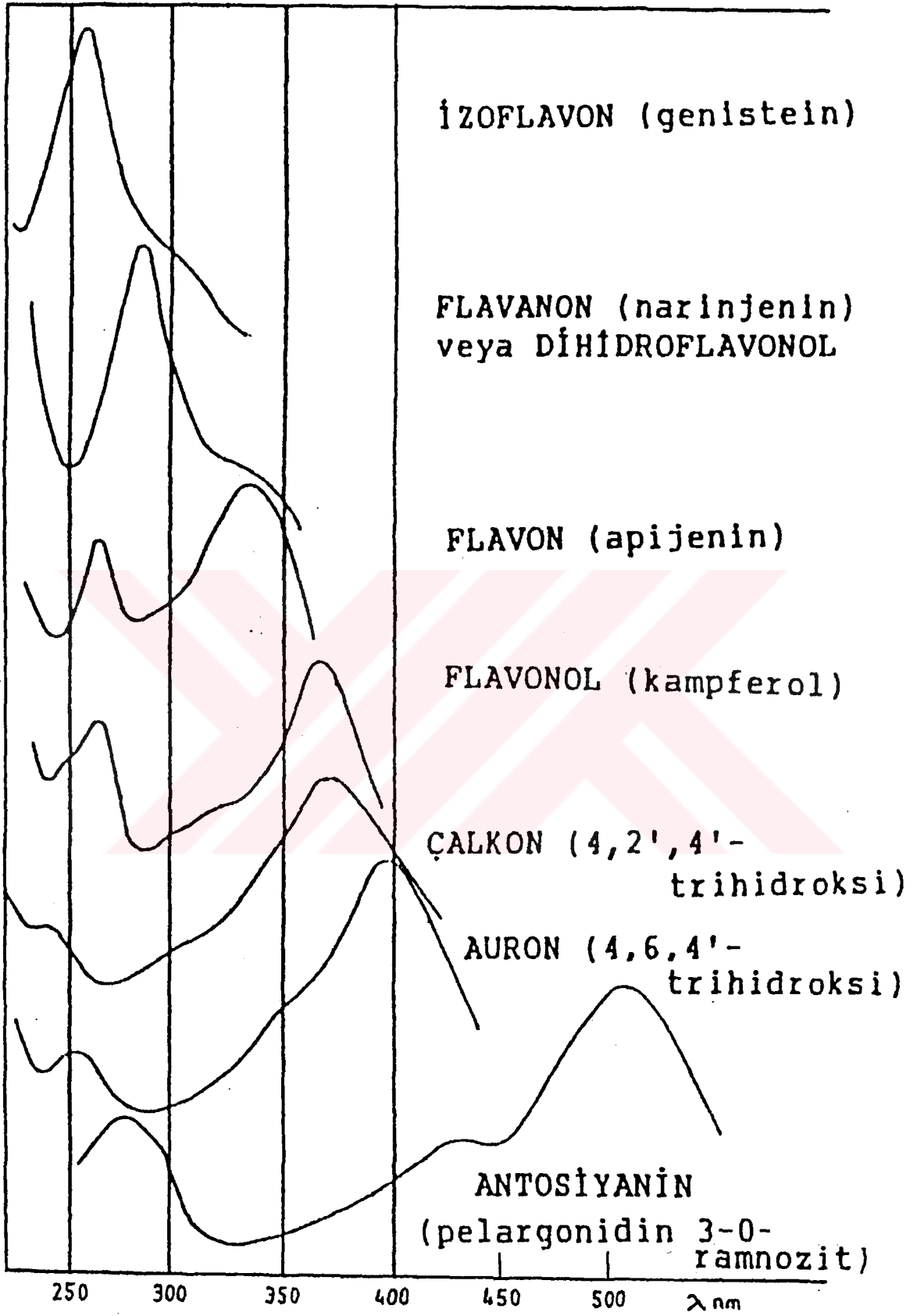
| Flavonoid rengi                      |                                              | Tanı                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amonyaksız ortam                     | Amonyaklı ortam                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Koyu mor                             | Sarı,sarı-yeşil veya yeşil                   | a)5-OH flavonlar veya flavonollar(3-O-da 4'OH mevcut)<br>b)Nadiren 5-OH flavanonlar veya B halkasında OH olmayan 4'-OH çalkonlar                                                                                                                                                          |
|                                      | Renk değişimi çok az veya hiç yok            | a)Genelde flavonlar veya serbest 4'OH tan yoksun 5-OH flavonollar<br>b)Bazı 6-veya 8-OH flavonlar ve 5-OH bulunduran flavonollar<br>c)İzoflavonlar,dihidroflavonollar,bi-flavonlar ve bazı 5-OH içeren flavonlar<br>d)Serbest 2-veya 4- OH içermeyen,ancak 2'-veya 4'-OH içeren çalkonlar |
|                                      | Açık mavi                                    | Bazı 5-OH flavononlar                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                      | Kırmızı veya turuncu                         | Serbest 2-ve/veya 4-OH içeren çalkonlar                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Floresan açık mavi                   | Floresan sarı-yeşil veya floresan mavi-yeşil | a)Serbest 5-OH den yoksun flavonlar veya flavononlar<br>b)3-OH doymuş ancak serbest 5-OH den yoksun flavonollar                                                                                                                                                                           |
|                                      | Renk değişimi çok az veya hiç yok            | Serbest 5-OH den yoksun izoflavonlar                                                                                                                                                                                                                                                      |
|                                      | Parlak floresan açık mavi                    | Serbest 5-OH den yoksun izoflavonlar                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Görünmez                             | Floresan açık mavi                           | Serbest 5-OH den yoksun izoflavonlar                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Mat sarı, sarı veya floresan turuncu | Renk değişimi çok az veya hiç yok            | Serbest 5-OH içeren veya içermeyen ancak serbest 3-OH içeren flavonollar                                                                                                                                                                                                                  |
| Floresan sarı                        | Turuncu veya kırmızı                         | Serbest 4'-OH içeren auronlar ve bazı 2-veya 4-OH çalkonlar                                                                                                                                                                                                                               |
| Sarı-yeşil, mavi-yeşil veya yeşil    | Renk değişimi çok az veya hiç yok            | a)4'-OH den yoksun auronlar ve serbest 5-OH den yoksun flavononlar<br>b)Serbest 5-OH içeren veya içermeyen, ancak serbest 3-OH içeren flavonollar                                                                                                                                         |
| Mat turuncu-kırmızı veya morumsu     | Mavi                                         | Antosiyanidin 3-glukozitler                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Parlak kırmızı veya floresan sarı    | Mavi                                         | Antosiyanidin 3-5 diglukozitlerin birçoğu                                                                                                                                                                                                                                                 |

**Tablo 2.3. Değişik flavonoidlerin absorpsiyon maksimumları (Markham 1982)**

| Band II (nm)       | Band I (nm)                  | Flavonoidler                                  |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|
| 250-280            | 310-350                      | Flavon                                        |
| 250-280            | 330-360                      | Flavonollar (3-OH bağlı)                      |
| 250-280            | 350-385                      | Flavonollar (3-OH serbest)                    |
| 245-275            | 310-330 omuz                 | İzoflavonlar                                  |
| 245-275            | Yaklaşık 320 de pik          | İzoflavonlar (5-deoksi, 6,7-dioksijen içeren) |
| 275-295            | 300-330 omuz                 | Flavononlar ve dihidroflavonollar             |
| 230-270 (az yoğun) | 340-390                      | Çalkonlar                                     |
| 230-270 (az yoğun) | 380-430                      | Auronlar                                      |
| 270-280            | 465-560                      | Antosiyanidin ve antosiyaninler               |
| 270-280            | 465-560 ve 310-330 da 3. pik | Asillenmiş antosiyaninler                     |

Tablo 2.3'de yer alan "asillenmiş antosiyanin" terimi, yapısında aglukon ve şekerin yanı sıra kumarik, kafeik, asetik, malonik, ferulik asitler gibi organik asitler içeren antosiyaninler için kullanılmaktadır.

Flavonoidlerin metanoldeki absorpsiyon spektrumları, bu maddelerin tipleri hakkında büyük ölçüde fikir vermekle birlikte sadece bu verilerle herhangi bir yargıya varabilmek olanaksızdır. Bu nedenle metanol içerisinde çözülmüş durumdaki flavonoid çözeltilerine, yapılarını aydınlatabilmek için değişik kimyasal maddeler eklendikten sonra absorpsiyon maksimumu gösterdikleri dalga boylarının değişimi gözlemlenir. Dalga boylarındaki bu değişim olgusu literatürde "shift oluşumu" olarak adlandırılmaktadır. Örneğin iyi tanınan bir flavonon olan narinjeninin metanoldeki çözeltilisine ait spektral eğrinin pik noktaları 289 nm ve 326 nm (omuz) olduğu halde, sodyum metoksit eklendikten sonra bu değerler 245 nm ve 323 nm olarak değişmektedir. Flavonoidlerin tanısında yararlanmak amacıyla bu shift oluşumlarına ilişkin olarak hazırlanmış bulunan bir çok şekil bir araya getirilmiştir (Mabry vd 1970). Shift reaktiflerinin flavonoidlerin tanısında kullanımını açıklayabilmek için Tablo 2.4, Tablo 2.5, Tablo 2.6 ve Tablo 2.7 verilmiştir.



Şekil 2.3. Eşit hidroksillenme basamağındaki bazı flavonoidlerin ultraviyole-görünür spektrumdaki spektral eğrileri (Markham 1982).

**Tablo 2.4. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde NaOMe eklendikten sonra oluşan değişimler (Markham 1982) <sup>1</sup>**

| Flavonoid                                         | Oluşan değişimler                                  |                                              | Tanı                                                                          |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|                                                   | Band I                                             | Band II                                      |                                                                               |
| Flavonlar<br>Flavonollar                          | Sürekli azalan yoğunluk, yapı bozulması            |                                              | 3,4'-OH, A-halkasında o-diOH, B- halkasında 3 teğet OH                        |
|                                                   | +45 ile 65 nm de sabitleşme, yoğunlukta azalma yok |                                              | 4'-OH                                                                         |
|                                                   | +45 ile 65 nm de sabitleşme, azalan yoğunluk       |                                              | 3-OH, serbest 4'-OH yok                                                       |
|                                                   | 320-335 nm de yeni band                            |                                              | 7-OH                                                                          |
| İzoflavonlar<br>Flavononlar<br>Dihidroflavonollar |                                                    | Shift yok                                    | A-halkasında-OH yok                                                           |
|                                                   |                                                    | Süre ile azalan yoğunluk                     | A-halkasında o-diOH (azalma çok yavaş ise izoflavonlarda B-halkasında o-diOH) |
|                                                   |                                                    | 280 nm den 325 nm ye shift, azalan yoğunluk, | 5,7-OH flavononlar ve dihidroflavonollar                                      |
|                                                   |                                                    | fakat 330-340 nm ye kadar                    | 7-OH, serbest 5-OH yok                                                        |
| Çalkonlar<br>Auronlar                             | +80 ile 95 nm (artan yoğunluk)                     |                                              | 4'-OH (auronlar)                                                              |
|                                                   | +60 ile 70 nm (artan yoğunluk)                     |                                              | 6-OH, 4'oksijen yok (auronlar)                                                |
|                                                   | Daha küçük shift                                   |                                              | 6-OH, 4'oksijen var (auronlar)                                                |
|                                                   | +60 ile 100 nm (artan yoğunluk)                    |                                              | 4-OH çalkonlar                                                                |
|                                                   | +60 ile 100 nm (yoğunlukta artma yok)              |                                              | 2-OH veya 4'-OH ve 4-OH yok                                                   |
|                                                   | +40 ile 50 nm                                      |                                              | 4'-OH (ayrıca 2'-OH veya 4-OH da var)                                         |

<sup>1</sup>Shift reaktiflerinin hazırlanışları araştırmancının Materyal ve Metod kısmında verilmiştir.

**Tablo 2.5. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde, NaOAc eklendikten sonra oluşan değişmeler (Markham 1982)**

| Oluşan değişmeler                        |                                  |                                                             |                                                                   |
|------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Flavonoid                                | Band I                           | Band II                                                     | Tanı.                                                             |
| Flavonlar<br>Flavonollar<br>İzoflavonlar |                                  | +5 ile 20 nm<br>(6-veya 8-<br>oksijenasyon<br>varsa daha az | 7-OH                                                              |
|                                          | Zamanla azalan yoğunluk          |                                                             | Alkaliye duyarlı<br>grup (6,7 veya 7,8<br>veya 3',4'-<br>diOH)    |
| Flavononlar<br>Dihidrofla-<br>vonollar   |                                  | +35 nm<br>+60 nm                                            | 7-OH(ve 5-OH)<br>7-OH(5-OH yok)                                   |
|                                          | Zamanla azalan yoğunluk          |                                                             | Alkaliye duyarlı<br>grup(6,7 veya<br>7,8-diOH)                    |
| çalkonlar<br>Auronlar                    | Uzun dalga<br>boylarında<br>omuz |                                                             | 4' ve/veya 4-OH<br>(çalkonlar) 4' ve/<br>veya 6-OH<br>(çalkonlar) |

**Tablo 2.6. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> eklendikten sonra oluşan değişmeler (Markham 1982)**

| Oluşan değişmeler                                      |                                                |                                                |                                           |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Flavonoid                                              | Band I                                         | Band II                                        | Tanı                                      |
| Flavonlar<br>Flavonollar<br>Auronlar<br>çalkonlar      | +12 ile 36 nm<br>(MeOH<br>spektrumuna<br>göre) |                                                | B-halkasında<br>o-diOH                    |
|                                                        | Daha küçük<br>shift                            |                                                | A- halkasında<br>o-diOH (6,7 veya<br>7,8) |
| İzoflavonlar<br>Flavononlar<br>Dihidrofla-<br>vononlar |                                                | +10 ile 15 nm<br>(MeOH<br>spektrumuna<br>göre) | A- halkasında<br>o-diOH (6,7 veya<br>7,8) |

**Tablo 2.7. Flavonoidlerin metanoldeki spektral eğrilerinde,  $AlCl_3$  ve  $AlCl_3/HCl$  eklendikten sonra sonra oluşan değişmeler (Markham 1982)**

| Flavonoid ve reaktif                               | Oluşan değişmeler                                                             |                                                                                                     | Tanı                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    | Band I                                                                        | Band II                                                                                             |                                                                                                                                            |
| Flavonlar ve flavonollar<br>( $AlCl_3/HCl$ )       | +35 ile 55 nm<br>+17 ile 20 nm<br>Değişme yok<br>+50 ile 60 nm                |                                                                                                     | 5-OH<br>5-OH (6 oksijenasyon)<br>6-prenyl ve muhtemelen 5-OH)<br>Muhtemel 3-OH (5-OH var veya yok)<br>B-halkasında o-diOH                  |
| ( $AlCl_3$ )                                       | $AlCl_3/HCl$ shifti<br>+30 ile 40 nm<br><br>$AlCl_3/HCl$ shifti +20 ile 25 nm |                                                                                                     | A-halkasında o-diOH<br>(B-o-diOH in yanısıra)                                                                                              |
| İzoflavonlar<br>Flavononlar<br>Dihidroflavonollar  |                                                                               | +10 ile 14 nm<br>+20 ile 26 nm                                                                      | 5-OH<br>(İzoflavonlar)<br>5-OH<br>(Flavononlar, dihidroflavonollar)                                                                        |
| ( $AlCl_3$ )                                       |                                                                               | $AlCl_3/HCl$ shifti<br>+11 ile 30 nm<br><br>$AlCl_3/HCl$ shifti<br>+30 ile 38 nm<br>(NaOAc duyarlı) | A-halkasında o-diOH<br>(6,7 ve 7,8)<br><br>5-OH içermeyen<br>Dihidroflavonol                                                               |
| Auronlar<br>Çalkonlar<br>( $AlCl_3/HCl$ )          | +48 ile 64 nm<br>+40 nm<br>+60 ile 70 nm                                      |                                                                                                     | 2'-OH<br>Çalkonlar<br>2'-OH<br>Çalkonlar<br>(3'-oksijen var)<br>4-OH auronlar<br>B-halkasında o-diOH<br><br>Muhtemelen A-halkasında o-diOH |
| ( $AlCl_3$ )                                       | $AlCl_3/HCl$ shifti<br>+40 ile 70 nm<br>Daha az artış                         |                                                                                                     |                                                                                                                                            |
| Antosiyaninler<br>Antosiyanidinler<br>( $AlCl_3$ ) | +25 ile 35 nm (pH 2-4 te)<br>Daha büyük shift                                 |                                                                                                     | o-diOH<br><br>Çoklu o-diOH veya o-diOH (3-deoksi antosiyanidinler)                                                                         |

Antosiyaninlerin tanısında tüm shift reaktiflerinin kullanılmalarının gerekli olmadığına yukarıda değinilmişti. Bunlarda shift reaktifleri yerine, %0.01 oranında HCl içeren metanolde elde olunan absorpsiyon spektrumlarından yararlanılarak saptanan  $E_{440}/E_{VIS\ max}$  ve  $E_{UV\ max}/E_{VIS\ max}$  değerlerinden yararlanılmakta ve sonuçların daha anlamlı olması açısından bunlar yüzde olarak ifade edilmektedir. Burada  $E_{440}$ : 440 nm'deki absorbans değerini;  $E_{VIS\ max}$ : Görünür spektrumda maksimum absorbans dalga boyundaki absorbans değerini ve nihayet  $E_{UV\ max}$ : Ultraviyole spektrumda maksimum absorbans dalga boyundaki absorbans değerini göstermektedir. Bazı antosiyaninlere ilişkin spektral veriler Tablo 2.8'de görülmektedir (Francis 1982).

**Tablo 2.8.** Bazı antosiyaninlere ilişkin spektral veriler (Francis 1982)

| Pigment                    | %0.01 meta-<br>noldeki $\lambda\ max$<br>değeri | $E_{UV\ max}/$<br>$E_{VIS\ max}$<br>(%) | $E_{asilpik}/$<br>$E_{VIS\ max}$<br>(%) | $E_{440}/$<br>$E_{VIS\ max}$<br>(%) |
|----------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
| Pg 5-G                     | --, 513                                         | --                                      |                                         | 15                                  |
| Pg 7-G                     | 270,508                                         | 51                                      |                                         | 42                                  |
| Pg 3-G                     | 270,506                                         | 64                                      |                                         | 38                                  |
| Pg 3-5-GG                  | 269,504                                         | 45                                      |                                         | 21                                  |
| Pg 3-7-GG                  | 279,498                                         | 69                                      |                                         | 42                                  |
| Pg 3-RGa                   | 268,508                                         | 70                                      |                                         | 39                                  |
| Cn 3-G                     | 274,523                                         | 60                                      |                                         | 24                                  |
| Cn 3-Ga                    | --, 526                                         |                                         |                                         | 24                                  |
| Cn 3-5-GG                  | 273,524                                         | 44                                      |                                         | 13                                  |
| Pn 3-G                     | 274,523                                         | 60                                      |                                         | 24                                  |
| Dp 3-G                     | 276,534                                         | 54                                      |                                         | 18                                  |
| Dp 3-5-GG                  | 273,533                                         | 42                                      |                                         | 11                                  |
| Pt 3-G                     | 276,534                                         | 54                                      |                                         | 18                                  |
| Mv 3-G                     | 276,534                                         | 54                                      |                                         | 18                                  |
| Mv 3-5-GG                  | 273,533                                         | 42                                      |                                         | 11                                  |
| Pg 3-5-GG<br>+kumarik asit | 289,313,507                                     | --                                      | 60                                      | 21                                  |
| Pg 3-5-GG<br>+kafelik asit | 285,329,507                                     | --                                      | 48                                      | 21                                  |

Tablo 2.8 (devamı)

| Pigment                                                           | %0.01 meta-<br>noldeki $\lambda$ max<br>değeri | $E_{\lambda max}/$<br>$E_{VISmax}$<br>(%) | $E_{asılıpık}/$<br>$E_{VISmax}$<br>(%) | $E_{440}/$<br>$E_{VISmax}$<br>(%) |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|
| Pg 3-XG-5G-<br>+kumarik+<br>ferulik asit                          | 289,328,509                                    | ---                                       | 92                                     | 20                                |
| Pg 3-GG-5G+<br>kumarik asit                                       | 278,310,523                                    | ---                                       | 60                                     | 17                                |
| Cn 3-GG-5G<br>+2ferulik<br>asit                                   | 282,333,530                                    | ---                                       | 88                                     | 14                                |
| Cn 3-G+ku-<br>marik asit                                          | 284,310,527                                    | ---                                       | 64                                     | 21                                |
| Dp 3-RG-<br>5,3'5'GGG<br>+2 kafeik,<br>ferulik ve<br>kumarik asit | 302,320,544                                    | ---                                       | 142                                    | 19                                |
| Pt 3-RG-5-G<br>+kumarik asit                                      | 282,310,538                                    | ---                                       | 71                                     | 11                                |
| Pt 3-RG-5-G<br>+2 kumarik<br>asit                                 | ---,310,540                                    | ---                                       | 130                                    | 12                                |
| Mv 3-5-GG<br>+ kumarik<br>asit                                    | 282,305,536                                    | ---                                       | 64                                     | 10                                |

Not: Pg:pelargonidin; Cn:siyanidin; Pn:peonidin;  
Pt:petunidin; Dp:delfinidin; Mv: malvidin;  
G:glukoz; R:ramnoz; X:ksiloz; Ga:galaktoz.

Bitkiler aleminde bu kadar yaygın olan fenolik maddelerin kuşkusuz ki hayvanların metabolizması üzerinde değişik fonksiyonları vardır. Ancak flavonoidlerin insan organizmasındaki işlevleri henüz yeteri kadar araştırılmamıştır. Halen bilindiği kadarı ile flavonol aglukonları kanama durdurucu ve cilt gerginleştirici etkiye sahiptir. Biflavonoidlerin Vitamin P aktivitesine sahip oldukları ve askorbik asit ile sinerjistik etkileşime girerek damar sertliklerini azalttıkları bilinmektedir. İzoflavonoidler ise zayıf östrojenik aktivite göstermektedirler (Francis 1985).

Antosiyanin pigmentlerinin ödem önleyici etkisi de kanıtlanmış bulunmaktadır. Özellikle Vaccinium türlerinden elde olunan pigment ekstraktları halen bu amaçla kullanılmaktadır (Harborne ve Grayer 1988).

Flavonoidlerin gıda endüstrisi açısından önemleri ise bu maddelerin gıdaların işlenmeleri sırasında bazı esmerleşme reaksiyonlarında yer almalarından kaynaklanmaktadır. Turunçgil flavononlarından bazıları yapay tadlandırıcı olarak gelecek vaad etmektedir. Ayrıca bu maddelerin bazılarının odalardaki istenmeyen kokuları gidermeleri ve oda havasını dezenfekte etme olanakları üzerinde durulmaktadır. Diğer taraftan flavonoidlerin birçoğu antioksidan etkiye sahipse de bu maddelerin sudaki çözünürlüklerinin sınırlı oluşu, bu amaçla kullanımlarını sınırlamaktadır (Francis 1985).

Flavonoidlerin bitkiler dünyasındaki önemleri ise bu maddelerin böcekleri cezbederek tozlanmayı sağlama-larından (Swain 1976a) ve yüksek molekül ağırlığındaki prosiyanidinlerin, proteinlerle bağlanması ile ortaya çıkan bileşiklerin bitkilerin savunma sisteminde önemli bir rol oynamasından kaynaklanmaktadır (Stafford 1988, Putman ve Butler 1989). Ayrıca antosiyaninler böceklerde larva gelişimini durdurmaktadır. Kateşinlerin antosiyaninlerle ortak etkileşimi sonucunda bu olgu daha da güçlenmektedir (Harborne ve Grayer 1988).

Fenolik madde analizleri, araştırmacıları en çok uğraştıran konulardan birisi olmuştur. Bir taraftan bunların yapılarının oldukça karmaşık olması, çok sayıda maddeyi içermesi ve bazılarının iz miktarda bulunması, diğer taraftan bunların izolasyonu ve tanısında kullanılan yöntem ve gereçlerin yetersizliği, bu alandaki ilk çalışmaların yeterince başarılı olmasını engellemiştir. Önceleri daha çok kağıt kromatografisine dayalı analiz metodları, yerini son yıllarda HPLC metodlarına bırakmış ve böylece bu maddelerin kimyasal yapısını aydınlatmada büyük ge-

lişmeler sağlanmıştır. HPLC' nin diğer yöntemlere göre başlıca üstün yönleri, duyarlılığı, hızı ve nicel analizde kullanım kolaylığıdır (Harborne ve Grayer 1988). HPLC ile flavonoidlerin tanısı konusundaki ilk araştırma- lara 1970 lerde başlanmış ve yapılan birkaç araştırmada flavonoidlerin HPLC ile kısa süre içerisinde birbirle- rinden ayrılabilircekleri gösterilmiştir (Schwartz ve von Elbe 1982). Bu konudaki ilk önemli araştırma Wulf ve Nagel (1976) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar tek solventin kullanıldığı, absorbandsın sadece iki dalga bo- yunda belirlendiği, gerekli yüksek basıncın sisteme azot gazı verilerek sağlandığı ve piklerin geliş sürelerinin kronometre ile saptandığı bu çalışmada, günümüz koşulla- rına göre ilkel sayılabilecek bir sistemle çalışarak 23 adet standardın geliş sürelerini belirlemişlerdir.

Wulf ve Nagel (1978) tarafından yapılan bir baş- ka araştırmada bu kez ikili solvent sistemi ile çalışan bir HPLC kullanılarak Cabarnet Sauvignon zmlerinin ya- pısında bulunan ondokuz antosiyanin pigmentinden onaltı- sının yapısı belirlenmiştir. Ayrıca aynı araştırma ile ilk kez pigmentlerin miktarları da saptanmıştır. Bu amaç- la saf malvidin 3 glukozidin bilinen orandaki çözeltisi hazırlanmış, bu pigmentin pik alanı ile diğer pigmentle- rin pik alanları karşılaştırılmıştır. Yine zmler ze- rinde yapılan bir başka araştırmada HPLC aygıtında ayırı- cı solventlerden birisi olarak ilk kez perklorik asit - zeltisi kullanılmıştır (Bakker ve Timberlake 1985). Hale vd (1986) tarafından yapılan bir başka araştırmada ise solvent olarak ilk kez fosforik asit çözeltisi kullanıl- mıştır.

Yakın dönemlere kadar özellikle, bilinen stan- dardların değişik sistemlerdeki (farklı kolon, farklı solventler ve farklı program) geliş süreleri ve bu süre- lerin farklı olma nedenleri üzerinde durulmuştur. Antosi- yanin pigmentlerinde geliş süresinin, (1): B halkasındaki hidroksil ve metoksil gruplarının durumuna, (2): Moleküle

bağlı şekerlerin sayısına, yapısına ve bağlantı şekline, (3): yapıdaki asillenmeye bağlı olduğu gösterilmiştir. Buna göre şekerlerin ve hidroksillerin sayısı arttıkça pigmentin geliş süresi kısalmaktadır. Yapıdaki metil gruplarının sayısının artışı ve asillenme ise geliş süresini uzatmaktadır (Strack vd 1980, Akavia ve Strack 1980, Schram vd 1983, Castelee vd 1983 ve Takeda vd 1986a,b). Yapısında iki adet metil grubu taşıyan malvidinin glukozitlerinin geliş süreleri genellikle daha fazladır (Harborne ve Grayer 1988). Siyanidinin değişik şekerlerle olan 3-glukozitleri ele alınacak olursa, geliş süreleri sırasıyla; galaktozit, glukozit, arabinozit ve ksilozittir (Mazza ve Velioğlu 1990). Delfinidinin (Dp) değişik türevlerinin yapılarındaki hidroksil sayıları ve geliş süreleri ise ; Dp 3-5 diğlukozit (3), 9:98 dak; Dp 3-glukozit (5), 13:82 dak; ve Dp klorid (6), 15:13 dak. şeklindedir (Castelee vd 1983).

Daigle ve Conkerton (1982) tarafından HPLC aygıtı ile Bondapak kolon kullanarak 34 adet flavonoidin geliş süreleri saptanmıştır. Bulgulara göre en kısa geliş süresi D-kateşin'de (2:14 dak), en uzun süre ise tetrokrisinde (36:25 dak) saptanmıştır. Kullanılan sistemde bazı flavonoidler kolayca birbirinden ayrılırlarken, bazıları çok güçlkle ayrılmaktadır. Örneğin mirisetin ile robinin'in geliş süreleri arasındaki fark yalnızca 1 saniyedir.

"Fotodiyot array dedektör" ilk kez Andersen (1985) tarafından kullanılmıştır. Bu sayede kolondan ayrılmış olarak gelen her bir pikin absorpsiyon spektrumu anında bir taraftan gözlenirken, diğer taraftan da kayıt edilebilmektedir.

Diğer taraftan antosiyaninlerin arıtılmasında değişik yollar izlenmektedir. Örneğin başlangıçta Sephadex kolondan geçirilen antosiyaninlerin, bir kez de Polyclar AT (2.5g), Kieselgel G, TLC (5g) ve Kieselgel G

60 (17.5g) içeren kolondan geçirilmesi durumunda HPLC ile saflaştırma işlemi öncesinde oldukça iyi düzeyde bir ön saflaştırma sağlanmaktadır (Pouget vd 1990).

ABD' de kullanımına izin verilen ticari antosiyanin preparatlarının aglukon yapılarının HPLC ile incelendiği bir araştırmada ele alınan 10 örneğin tamamında siyanidin, dört tanesinde delfinidin ve peonidin, üçer adedinde ise petunidin ve malvidinin glukozitlerine rastlanılmıştır. Obi-pektin firmasınca üretilen "morello cherry" adlı preparat % 100 oranında cyanidin glukozitleri içerirken, gene aynı firma tarafından üretilen "bilberry" adlı preparat % 31 delfinidin, % 24 siyanidin, % 19 petunidin, % 18 malvidin ve % 8 oranında da peonidin değişik glukozitlerini içermektedir. Ticari preparatlardaki pigment profilinin belirlendiği bu araştırmada pigmentlerin yüzde oranları, pik alanlarından yararlanılarak hesaplanmıştır (Hong ve Wrolstad 1990).

Strack vd (1980) bazı fenolik asit ve antosiyanin standartlarını LiChrosorb kolonuna uygulamışlar ve piklerin geliş sürelerini belirlemişlerdir. Ulaşılan bulgular, piklerin net bir şekilde ayrılmaları için standartların çözündürüldüğü solventin metanol ve asitin yanı sıra su da içermesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Kateşinler ve diğer bazı flavonoid ve fenolik asit örneklerinin ele alındığı bir araştırmada, kateşinlerin HPLC ile ayrılmalarında antosiyanin ve antosiyanidinlerde olduğu gibi geliş süreleri ile ilgili olarak birtakım kurallar konulmasının çok güç olduğu belirtilmektedir. Ancak genel olarak "prosiyanidin trimerlerinin (prosiyanidin C-2) dimerlere (prosiyanidin B-1, B-2, B-3, B-4, B-5, A-2), dimerlerin de monomerlere (kateşin, epikateşin, afzalein) göre daha önce elue edildikleri söylenebilmektedir (Castele vd 1983).

Üzüm fenoliklerinin HPLC ile tanısı konusunda

yapılan bir araştırmada araştırmacılar özellikle tartaratları, kateşinleri ve prosiyanidinleri ele almışlar ve antosiyaninleri bu maddelerden arındırabilmek amacıyla "Seppak" adlı kartuşlardan yararlanmışlardır (Jaworski ve Lee 1987).

Özellikle yapılarında asil grubu içeren antosiyaninlerin nötral pH düzeyindeki gıdalarda dahi renklendirici olarak gelecek vaad etmekte olduklarının öğrenilmesinden sonra (Saito vd 1971, Saito vd 1972, Goto vd 1983, Asen vd 1970, 1977, Yoshitama ve Abe 1977, Yoshitama 1978, Yoshitama 1981, Hoshino vd 1980, Hoshino vd 1981) asillenmiş pigmentler içerebilecekleri tahmin edilen bitki organlarının (özellikle mavi renkli çiçeklerin) antosiyanin yapıları yoğun bir şekilde incelenmiş ve bu amaçla birçok meyve, sebze ve çiçeğin antosiyanin pigmentleri çoğunlukla HPLC ile saflaştırılmış ve tanısı gerçekleştirilmiştir (Takeda vd 1986a, Barberan vd 1987, Takeda vd 1988, Kim vd 1989, Takeda vd 1989, Takeda vd 1990).

Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda mineral asitlerin kullanılması nedeniyle yakın zamana kadar birçok antosiyanine gerçek anlamda tanı konamamıştır (Barberan vd 1987). Ekstraksiyon solventlerinde asitlendirici olarak yoğun bir şekilde hidroklorik asitin kullanıldığı 1960 lardan günümüze kadar yapılmış bulunan pek çok araştırmalarda ulaşılan bulguların, bu kuvvetli asitin moleküldeki asil grubunu uzaklaştırması nedeniyle güvenli olmadığı, bu deneylerin belki de yeniden ve ancak bu defa daha ılımlı asitlerin kullanılmasıyla tekrar edilmelerinin gerekli olduğu Strack ve Wray (1989) tarafından ileri sürülmüş bulunmaktadır. Örneğin, yapısında glukoronik asit içeren bir pigmentin varlığı ilk kez ancak 1986 yılında gösterilebilmiştir (Takeda vd 1986b). Ayrıca yapılarındaki antosiyaninde malonik asitin yer aldığı bir çok pigment de gösterilmiştir (Terahara vd 1986, 1989, 1990, Terahara ve Yamaguchi 1986). 1988 yılına kadar tanısı ya-

pılmış antosiyaninler Harborne ve Grayer (1988) tarafından bir listede toplanmış bulunmaktadır.

Flavonoid kimyası konusundaki araştırmalar, HPLC nin oldukça güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle, gide-rek antosiyanin dışındaki diğeri flavonoidlerin de bu sis-temle belirlenmesi konusuna yönelmiştir.

Schram vd (1983) petunya bitkisi çiçeklerinde HPLC ile yaptıkları bir araştırmada bazı dihidroflavonol glukozitlerini (narinjenin, eridiktyol, dihidrokampferol vb.), antosiyaninleri ve fenolik asitleri belirlemişler-dir. Uygulamada 4 farklı solvent sisteminden yararlanıl-mış ve çiçek renklerindeki küçük değişikliklerin p- kuma-rik asit ile asillenmiş antosiyaninlerin tip ve miktarla-rının farklılığından oluştuğu ortaya konmuştur.

Mazza (1986) "saskatoon berry" (*Amelanchier al-nifolia* Nutt.) meyvelerinde HPLC ile yaptığı araştırmada değişik siyanidin glukozitlerinin yanı sıra rutin ve klo-rojenik asitin varlığını da kesin olarak göstermiştir. Ay-rıca kromatogramda görülen kimi piklerin bazı verilere da-yanılarak, değişik kateşinler ve dihidronarinjenin ksilo-zit olabilecekleri üzerinde durulmuştur.

Siewek ve Galensa (1984) flavonol glukozitleri-nin tanısında yeterli saflıkta ve yeterli miktarda örnek sağlanması oldukça güç olduğunu, bu durumun ise özel-likle yapıdaki şekerin belirlenmesini güçleştirdiğini i-leri sürmekte ve bu amaçla "Egger" testinden yararlanıla-bileceğini göstermiş bulunmaktadırlar. Araştırcılar dene-mede flavonoidin benzollenme işlemine tabi tutulmadan ön-ceki ve sonraki absorbans oranlarından bir yargıya var-maya çalışmışlardır. Örneğin bu oranlar kampferolde 2.8 iken, kampferol 3-glukozitte 4.9 ve kampferol 3-rutino-zitte 6.0 dir. Önerilen bu metodda görülen bazı sapmalar nedeniyle bu uygulama henüz yaygınlık kazanmamıştır.

Elma kabuğunun fenolik yapısının HPLC ile incelendiği bir araştırmada beş adet kuersetin glukoziti ve bir dihidroçalkon olan floretinin iki glukoziti belirlenmiştir. Bunların yanısıra yapıdaki bazı flavan 3-ol'lerin (kateşinler), flavan 3-4 diol'lerin (prosiyanidinler) ve klorojenik asitin varlığı gösterilmiştir (Oleszek vd 1988).

Golden Delicious, Empire ve Rhode Island Greening elma çeşitlerinin esas fenolik bileşiklerinin tahmin edildiği gibi kateşin olmadığı, bunun yerine epikateşin ve prosiyanidin B-2 olduğu gösterilmiştir (Burda vd 1990).

Elmalardaki esmerleşme reaksiyonlarının incelenmesi amacıyla, enzim olarak ortodifenoloksidaz enzimi, substrat olarak da klorojenik asit, epikateşin B-2 ve epikateşin C-1'in kullanıldığı bir model sistem hazırlanmış ve sistem üzerine kuersetin ve floretinin glukozitlerinin etkisi araştırılmıştır. Floretin glukozitlerinin esmerleşme üzerindeki sinerjitik etkisi bu araştırma ile ilk kez ortaya konmuştur (Oleszek vd 1989).

HPLC ile prosiyanidinlerin değişik koşullardaki stabilitelerinin de incelenmesi mümkündür. Örneğin bir prosiyanidin fraksiyonunun %0.01'lik asetik asit çözeltisi içerisinde iki gün bekletilmesi halinde kromatografik profil değişirken, reaksiyonda 1mM'lük askorbik asit veya fitik asit kullanılması halinde bu değişikliğin görülmediği bu yolla saptanabilmektedir. Buna göre C-18 kolondaki prosiyanidinlerin geliş süreleri polimerizasyonun artışı ile artmaktadır. Nitekim B-3 adlı kateşin dimerinin geliş süresi 1:15 dakika iken bu süreler B-2' de (epikateşin dimer) 3:20 dakika ve B-9'da (epikateşin trimer) 7:60 dakika kadar olduğu saptanmıştır (Putman ve Butler 1989).

Prosiyanidinleri, antosiyanidinlere dönüştürmek

amacı ile uygulanan n-butanol-hidroklorik asit testinde ortamda demir tuzlarının bulunması halinde reaksiyonun tekrarlanabilirliği artmaktadır. Kobalt, bakır ve magnezyum kullanımında ise sonuç aynı derecede yeterli olmaktadır (Porter vd 1986).

Son yıllarda HPLC'nin araştırmalarda yaygın biçimde kullanılmasıyla fenolik maddeler üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmış ve bir çok bitkinin fenolik yapısı aydınlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucu avokado meyvelerinde toplam olarak 16.5-29.8 mg/kg düzeyinde olmak üzere 16 adet fenolik asit bulunduğu (Torres vd 1987), böğürtlende asillenmiş bir kuersetin glukozitinin varlığı (Wald vd 1986), *Brickella longifolia* bitkisinde 3 adet kuersetagetin sulfat ve bir tane kuersetagetin glukozit bulunduğunu (El-Sayed vd 1990) saptanmıştır. Aynı şekilde Markham ve Given (1988) güney kutbuna yakın bölgelerde yetişen maki türünde bir bitki olan "antartic byrum" adlı bitkinin başlıca flavonoidlerini saptamışlardır. Buna göre bitkide, apijenin ve luteolinin değişik glukozitleri, bunların 6' malonil esterleri, 8-hidroksiapijenin ve 8-hidroksiluteolin belirlenmiştir.

Diğer taraftan antosiyanince zengin meyvelerden üretilen ürünlerde, örneğin reçellerde renk düzeyinin ve rengin stabilitesinin önemli bir kalite kriteri olduğu kuşkusuzdur. Ancak son yıllarda reçel üretimi konusunda yapılmış bulunan birkaç araştırma dışında pek fazla sayıda yayına rastlanamamıştır. Yapılmış bulunan az sayıdaki araştırmalarda da daha çok mekaniki yöntemle hasat edildikleri için olgunlaşmamış meyveler içeren çileklerin, reçel üretimine uygunlukları incelenmiştir. Morris vd (1980), yarı olgun çilekler kullanılarak üretilen reçellerde antosiyanin miktarının daha az olduğunu, ancak depolama süresinde bu reçellerdeki antosiyanin kaybının oransal olarak olgun meyvelerden yapılanlara göre fark göstermediğini bildirmektedirler.

Bu konuda yapılan bir başka çalışmada reçele işlenecek antosiyanince zengin meyvelerde Gardner kolorimetresi ile ölçülen "L" değerinin artışı, elde olunacak olan reçel renginin mat olmasına yol açarken, "a" değerinin artışının ise rengin daha kırmızı olmasına neden olduğu bildirilmektedir (Scholey 1973).

Ham çileklerin de kullanılması ile elde olunan reçellerde kalite kaybı üzerinde en etkili faktörün depolama sıcaklığı olduğu ve 35°C nin üzerindeki sıcaklıkta depolanan reçellerin altı ay içerisinde tüketilemez nitelik kazandığı da bir başka araştırmada belirtilmektedir (Spayd ve Morris 1981a). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir başka araştırmada, çilek reçeli üretiminde % 25 oranı gibi düşük miktarda olgun meyve kullanılmasına rağmen depolama sıcaklığının 2°C yi aşmaması halinde altı ayın sonunda bile rengin kabul edilebilir düzeyde kaldığını, oysa depolama sıcaklığının 25°C ye yükselmesi halinde rengin kabul edilebilir düzeyde kalması için olgun meyve oranının en az % 50 olması gerektiğini bildirmektedirler (Spayd ve Morris 1981b). Renk sadece görünüş açısından değil, ürünün diğer özelliklerini de yansıtabilen bir kriterdir. Nitekim çilek reçeli üretimi için Jonsok, Totem ve Bounty varyetelerinin en uygun varyeteler olduğu saptanan bir araştırmada bunlardan üretilen reçellerde duyusal değerler ile antosiyanin miktarı arasında yüksek bir korelasyonun bulunmakta olduğu saptanmıştır (Skrede 1980).

### 3-MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Araştırmada esas olarak gül yağı üretimi amacıyla Isparta yöresinde tarımı yapılan ve Gülbirlik tarafından sağlanan gül taç yaprakları kullanılmıştır. Çiçeklerin taç yaprakları elle ayrıldıktan sonra bunların muhafazası amacıyla aşağıda verilmiş olan çeşitli ön işlemler uygulanmıştır.

#### 3.2. Yöntemler

##### 3.2.1. Muhafaza yöntemleri

###### 3.2.1.1. Haşlama uygulandıktan sonra dondurarak muhafaza

**Uygulama-A:** Gül yaprakları beyaz tülbent torbalara konduktan sonra % 0.25, % 0.5 ve % 1.0 oranında sitrik asit (SA) içeren suda 1, 2 ve 3 dakika süre ile haşlanmıştır. Örnekler daha sonra musluk suyu altında iki dakika süre ile soğutulmuş, suyun fazlasının süzülmesi beklendikten sonra hermetikli kapanan cam kavanozlarda, analiz anına kadar -25°C'de muhafaza edilmiştir.

**Uygulama-B:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak bu defa farklı olarak örnekler, % 0.5 sitrik asit + % 0.5 askorbik asit (AA) çözeltisi içerisinde 1 ve 3 dakika süre ile haşlanmıştır.

**Uygulama-C:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak farklı olarak, örnekler %0.5 oranında askorbik asit içeren suda 1 ve 3 dakika süre ile haşlanmıştır.

**Uygulama-D:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere

re ancak bu defa sitrik asit çözeltileri yerine etilendiamintetraasetik asit (di sodyum tuzu) çözeltileri (EDTA) kullanılmıştır.

**Uygulama-E:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak bu defa farklı olarak 10, 25, 50, 100, 150, 250 ppm düzeyinde kalay iyonu içeren çözeltilerde 1 ve 3 dakika süre ile haşlama yapılmıştır. Bu amaçla metalik kalay çok az miktardaki hidroklorik asit içerisinde çözündürülmüş ve kalayın öngörülen konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır.

**Uygulama-F:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak bu defa farklı olarak, saf su içerisinde 1 ve 3 dakika süre ile haşlama yapılmıştır.

#### 3.2.1.2. Haşlama uygulandıktan sonra şeker şurubu içerisinde dondurarak muhafaza

**Uygulama-G:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak bu defa farklı olarak, dondurma işlemi öncesinde örneklerle 75 brikslik şeker şurubu eklenmiştir.

**Uygulama-H:** Uygulama-A'daki tüm koşullar aynı olmak üzere, ancak bu defa farklı olarak yapraklara, % 0.5 düzeyinde sitrik asit içeren suda 1 ve 3 dakika süre ile haşlama uygulanmış ve sonra üzerine 40 brikslik şeker şurubu ilave edilmiştir.

#### 3.2.1.3. Pastörizasyon yolu ile muhafaza

**Uygulama-I:** Kavanozlara doldurulan gül yaprakları üzerine kaynar haldeki saf su eklenmiş ve kapakları kapatılan kavanozlar 100°C sıcaklıkta 10 dakika süre ile pastörize edilmiştir. Örnekler analiz anına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### 3.2.1.4. Sıcak dolum yolu ile muhafaza

**Uygulama-J:** Yapraklar % 0.5 oranında sitrik asit içeren suda 1 ve 3 dakika süre ile haşlanmış ve örnekler sıcak haldeki kavanozlara haşlama suyu ile birlikte sıcak olarak doldurulmuş ve hemen kapatılmıştır. Örnekler analiz anına kadar oda sıcaklığında saklanmıştır.

#### 3.2.1.5. Gül yapraklarının "maya" halinde muhafazası

**Uygulama-K:** 1 kısım yaprak üzerine 1 kısım kristal şeker eklenmiş ve 6 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda bunun üzerine karışımındaki yaprak ağırlığının % 1'i kadar sitrik asit eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra kavanozlara doldurulup oda sıcaklığında saklanmıştır.

**Uygulama L:** Bu uygulamada halen geleneksel olarak gül mayası üretiminde uygulanan yöntem esas alınmış olup, örnekler Uygulama-K'da anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Ancak üretimde sitrik asit kullanılmamıştır. Bu deney kontrol amacıyla hazırlanmıştır.

### 3.2.2. Analiz yöntemleri

#### 3.2.2.1. Toplam antosiyanin tayini

Yukarıda belirtilen şekillerde hazırlanmış bulunan örneklerde toplam antosiyanin tayini 1, 3, 6 ve 12. aylarda pH differansiyel ve tekli yöntemlere göre yapılmış ve sonuçlar literatürdeki genel eğilime uyularak (Strack ve Wray 1989) siyanidin 3-glukozit cinsinden hesaplanmıştır. Bu pigmentin moleküler ekstinsiyon katsayısı 29600, molekül ağırlığı ise 445 tir (Fuleki ve Francis 1968a,b ). Hesaplamalarda bu değerler kullanılmıştır.

### 3.2.2.2. Flavonoidlerin kalitatif olarak belirlenmesi

#### Flavonoidlerin yapraklardan ekstraksiyonu:

Dondurulmuş halde saklanmakta olan örneklerden 20 g tartılmış, 200 ml EAW (Etanol: Asetik asit: Su; 10: 1: 9) solventi ile birlikte bir blenderde 5 dakika süre ile tam hızda karıştırılmış ve homojenat Whatman No 44 filtre kağıdından vakum altında filtre edilmiştir. Filtre kağıdı üzerindeki kalıntı, 50 ml ekstraksiyon solventi ile yıkanmıştır. Süzüntü, sıcaklığın 30°C yi aşmamasına dikkat edilerek döner evaporatörde kurutulmuştur (Takeda vd 1989). HPLC ve kağıt kromatografisi uygulamalarından hemen önce, gerektiği kadar örnek MAW (Metanol: Asetik asit: Su: 10:1:9) solventi ile çözündürülmüş ve gözenek çapı 45 µm olan Millipore filtreden süzölmüştür.

#### Standartlar:

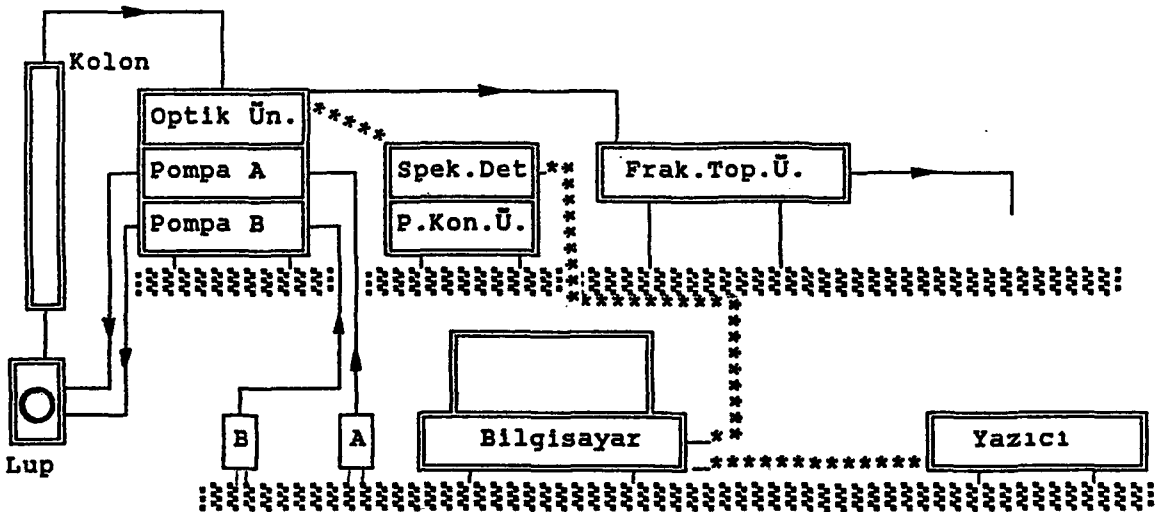
Araştırmada kullanılan standartlar çeşitli kaynaklardan sağlanmıştır. Protokatekhuik asit, p-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve p-hidroksibenzoik asit Karl Roth firmasından (Karlsruhe, B. Almanya); sinamik asit, kuersetin, rutin, mirisetin, apijenin ve krisin Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD); D-kateşin ve narinjenin Nutritional Biochem. firmasından (Cleveland, OH, ABD); gallik asit Fisher Sci. firmasından (Fairlawn, NJ, ABD); eskülin J.T.Baker firmasından (Philisburg, NJ, ABD); siyanidin 3-glukozit, siyanidin 3-galaktozit, siyanidin 3-rutinozit ve peonidin klorür Extrasynthese firmasından (Genay, Fransa) satın alınmıştır. Peonidin 3-5-diglukozit Dr. J. G. Sweeny tarafından (The Coca Cola Co., Atlanta, GA, ABD); siyanidin 3-5-diglukozit, pelargonidin 3-5-diglukozit, pelargonidin klorür ve siyanidin klorür Dr. K. Yoshitama tarafından (Kumamoto Univ., Kum. Japonya); kuersetin 3 arabinozit ve kampferol Dr. T. Fuleki tarafından (Ontario Min.of Agric. and Food,

Vineland, ON, Kanada) bu araştırmada kullanılmak üzere armağan edilmiştir.

#### Flavonoidlerin arıtılmaları:

Yoğun haldeki ekstrakt, Whatman No:3 kromatografi kağıdına band halinde uygulandıktan sonra BAW (n-butanol: Asetik asit: Su; 4:1:5, üst faz) solventi ile develop edilmiştir. İşlem sonunda elde olunan bandlar şeritler halinde kesilmiş ve bu şeritler üzerinde bulunan flavonoidler ekstraksiyon solventi ile elue edilmiştir. Eluatlar HPLC aygıtına enjekte edilmeden önce bir kez daha Millipore filtre ile filtre edilmiştir.

Araştırmada kullanılan HPLC sistemi (LKB-Bromma, İsveç), 2 adet pompa (LKB Model 2150), kontrol ünitesi (LKB Model 2152), 20 veya 100 µl'lik lup içeren Rheodyne 7125 enjeksiyon ünitesi, ultrapack dolgulu 250x4.6mmx10µm boyutlarında Spheri 10 RP18 kolon (Brownlee Labs, Santa Clara, CA, ABD), fotodiyot array dedektör (LKB Model 2140) ve fraksiyon toplayıcıdan (LKB Model 2211 Superrac) oluşmaktadır. Tüm sistem IBM PC bilgisayara ve Canon A-1210 renkli yazıcıya bağlantılıdır.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan HPLC sistemi (A ve B solventlerdir).

Flavonoidlerin arıtılmalarında kullanılan solvent sistemi ve eluasyon profili aşağıda açıklanmıştır:

**Solvent A:** formik asit-su; 5:95 v/v, **solvent B:** metanol. **Eluasyon profili:** 0-10 dak, %17-22 B (linear gradient), 10-12 dak, %22-27 B; 12-33 dak, %27-37 B; 33-39 dak, %37-55 B; 39-49 dak, %55-59 B. **Solvent akış hızı:** 1 ml/dak, **kolon basıncı:** 34-40 bar'dır. Ayırma işlemleri  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  de yapılmıştır.

Solventler işlem öncesinde  $0.45 \mu\text{m}$ 'lik filtreden süzöldükten ve gaz çıkarma işlemi uygulandıktan sonra analizde kullanılmıştır. Dedeksiyon işlemi 190-370 nm'ler arasında anında yapılmıştır. Piklerin geliş sürelerinin ve spektral niteliklerinin hesaplanmasında Wavescan, Ver. 1.07 (LKB 2140-202) kodlu bilgisayar programından yararlanılmıştır. Kapasite faktörünün hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (Kirkland 1971).

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

Burada:

$t_r$  = Bileşiğin geliş zamanı,

$t_0$  = Enjeksiyon sonrası dedektör tarafından ilk olarak algılanan solvent pikinin geliş zamanı

$k'$  = Bileşiğin kapasite faktörü

Spektral dedektör tarafından belirlenen piklerin alanları ve bu alanların yüzde oranları, yukarıda değinilen bilgisayar tarafından, Model 3600, Rev. 3. 1 (Nelson Analytical Inc., Cupertino, CA, ABD) kodlu program kullanılarak belirlenmiştir.

Piklerin gelişleri monitörde izlenmiş ve seçilen pikler kolon çıkışından ayrı ayrı toplanmıştır. Yeterli saflığa ulaşabilmek için gerektiği durumlarda aynı pikler defalarca kolona enjekte edilmiştir. Saf oldukları anlaşılan pikler sıcaklığın  $30^\circ\text{C}$  yi aşmamasına dikkat edilerek, döner evaporatörde kurutulmuş ve daha sonraki ana-

lizlerde kullanılmak üzere +4°C sıcaklıkta saklanmıştır.

#### Spektral analiz:

Flavonoidlerin çeşitli bileşiklerle oluşturduğu shiftler, bu maddelerin teşhisi ve özellikle de molekülde yer alan şekerin bağlantı şeklini göstermesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla aşağıda belirtilen sistem ile isimleri ve bileşimleri verilen reaktifler kullanılmıştır.

Spektral okumalarda, IBM PC bilgisayar ve Epson RX-80 yazıcı ile bağlantılı olarak çalışan Beckman DU-50 model spektrofotometreden yararlanılmıştır. Absorpsiyon spektrumlarının pik noktalarının belirlenmesinde "Peak Pick" adlı programdan (Beckman Quant 1 softpak, Beckman Instruments Inc., Scientific Ins. Div., Irvine, CA, ABD) yararlanılmıştır.

Saflaştırılmış antosiyanin pigmenti %0.01 oranında hidroklorik asit içeren metanolde, diğer flavonoidler ise saf metanolde çözündürüldükten sonra morötesi ve görünür spektrumda spektral nitelikleri saptanmıştır (Markham 1982).

#### Shift reaktifleri ve uygulanmaları:

Değişik kimyasal maddeler eklendiğinde, flavonoidlerin "maksimum absorbands dalga boylarının" değişmesi olgusunun "shift oluşumu" olarak adlandırılmakta olduğuna "Kuramsal Temeller ve Kaynak Araştırması" bölümünde değinilmişti. Araştırmada kullanılan başlıca shift reaktifleri ve bunların uygulanma şekilleri aşağıda bildirilmiştir.

**Sodyum metoksit:** 21.61 g sodyum metoksit ( $\text{CH}_3\text{NaO}$ ) 1 litre

metanolde çözüldürülmüş ve ağzı plastik kapaklı şişede saklanmıştır.

**Sodyum asetat:** Susuz, toz halde ve analitik saflıkta sodyum asetat ( $\text{NaOAc}$ ) kullanılmıştır.

**Alüminyum klorür:** 5 g yeni kurutulmuş alüminyum klorür ( $\text{AlCl}_3$ ) dikkatlice 100 ml metanol içerisinde çözüldürülmüştür. (Suyun varlığında patlayıcıdır!) Tam olarak çözünme birkaç gün içerisinde sağlanabilmektedir. Karışım, ağzı plastik kapaklı şişede saklanmıştır.

**Hidroklorik asit:** 1 kısım yoğun hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ ), iki kısım damıtık su ile karıştırılmıştır.

**Borik asit:** Saf, susuz borik asit ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) kullanılmıştır.

Bu reaktifler ise aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır:

-Bir miktar saf flavonoid, metanolde çözüldürülüp spektrofotometrede 250-700 nm'ler arasında spektral eğrisi belirlenmiştir. Okuma metanole karşı yapılmıştır.

Bu yolla örneklerin metil alkoldeki spektral eğrisi belirlendikten sonra küvete (1 cm, 2 ml) 3 damla sodyum metoksit çözeltisi eklenip, küvet çalkalanmış ve spektral eğrisi kaydedilmiştir. 5 dakika beklendikten sonra spektral eğri yeniden kaydedilmiştir. Küvet içeriği dökülmüş ve küvete yeniden flavonoid çözeltisi doldurulmuştur.

-Küvetteki flavonoid çözeltisine bu defa 6 damla alüminyum klorür çözeltisi konmuş ve spektral eğrisi kaydedilmiştir. Bunu izleyerek aynı çözelti üzerine 3 damla hidroklorik asit çözeltisi eklenmiş ve yeniden spektral eğri kaydedilmiştir. Küvet içeriği boşaltılmış ve yeniden aynı flavonoid çözeltisi doldurulmuştur.

-Flavonoid çözeltisi üzerine toz haldeki sodyum asetatın yaklaşık olarak 2 mm'lik bir tabaka oluşturacak şekilde eklendikten sonra, karışım çalkalanmış ve spektral eğrisi kaydedilmiştir. Daha sonra aynı küvete toz haldeki borik asitten sodyum asetat miktarının yaklaşık yarısı kadar eklenmiş ve spektral eğrisi yeniden kaydedilmiştir (Markham 1982).

Şunu da kaydetmek gerekir ki; antosiyanin pigmentlerinin incelenmesinde shift reaktiflerinden sadece alüminyum klorürün kullanılması yeterli bulunmaktadır (Harborne 1967).

**Flavonoidlerin hidrolizi:** 1-2 mg kadar saf flavonoid metanolde çözündürülüp bir test tüpüne konduktan sonra, üzerine 2 ml 2N HCl eklenmiş ve tüpün ağzı uygun büyüklükte bir cam bilya ile kapatılmıştır. Karışım kaynar su banyosunda 1 saat tutulduktan sonra, geri soğutulmuş ve aglukon kısmı amil alkolle ekstrakte edilmiştir. Şekerleri içeren sulu kısım asitin iyice uzaklaştırılabilmesi için vakum altında uzun süre tutularak kurutulmuştur (Markham 1982). Antosiyanin pigmentlerindeki uygulamalarda ise kurutma işleminden önce, kalmış olması muhtemel olan aglukonun uzaklaştırılması amacıyla di-n-oktilmetilaminin kloroform içerisindeki % 10'luk çözeltisi kullanılmıştır (Francis 1982).

**Aglukonun belirlenmesi:** Aglukon içeren amil alkollü ekstrakt, HPLC ye enjekte edilerek bilinen standartlarla karşılaştırılmıştır. Ancak gerekli standartların bulunamaması halinde, aglukonun amonyaklı ve amonyaksız ortamda verdiği renkler, morötesi ışık altında incelenmek ve ayrıca HPLC ile elde olunan absorpsiyon spektrumlarının değerlendirilmesi suretiyle tanıya ilişkin sonuçlar çıkarılmaya çalışılabilir. Yeterli sonuca ulaşılamazsa, shift reaktifleri ile yukarıda belirtilen işlemler uygulanır. Ancak bu işlem için oldukça fazla miktarda örnek gerekeceği unutulmamalıdır (Markham 1982).

**Şekerlerin belirlenmesi:** Şekerler çok az miktarda saf su içerisinde çözündürüldükten sonra Whatman No 1 kromatografi kağıdına bilinen şekerlerle birlikte uygulanmıştır. Uygulanan örnekler yukarıdan aşağı inen kromatografi tekniği ile ve BEW (n-butanol: etanol: su; 4: 1: 2.2 v/v) solventi kullanılarak develope edilmiştir. Developeden sonra kurutulan kağıtlara anilin hidrojen fitalat indikatörü püskürtülerek görünür hale getirilen şekerler, şahitlerle karşılaştırılarak tanıya ulaşılmıştır (Markham 1982).

**Flavan 3-ol lerin (kateşinler) varlığının kanıtlanması:**

HPLC ile elde olunan absorpsiyon spektrumlarında 275-280 nm lerde pik veren flavonoidler çoğunlukla; antosiyanin, antosiyanidin, proantosiyanidin (flavan 3-4 diol) , kateşinler (flavan 3- ol) veya bazı fenolik asitlerdir (Harborne 1967, Markham 1982, Mabry vd 1970, Putman ve Butler 1989). Bir flavonoidin antosiyanin veya antosiyanidin olduğunun belirlenmesinde pigmentin, amonyak ile mavi renk verip vermediğine bakılmaktadır. Bu iki flavonoid amonyak ile mavi renk vermektedirler (Francis 1982).

Proantosiyanidinler ile kateşinlerin tanısında ve bunların birbirlerinden ayrılmasında aşağıda açıklanan "vanilin" ve "n-butanol-hidroklorik asit" testlerinden yararlanılmıştır.

**Vanilin testi:** Bu amaçla iki çözelti kullanılmıştır.

1. Çözelti: Saf metanol içerisinde %4 oranında hidroklorik asit ve %0.5 oranında vanilin çözündürülerek hazırlanmıştır.

2. Çözelti: Glasiyal asetik asit içerisinde %4 oranında hidroklorik asit ve %0.5 oranında vanilin çö-



şüpheleniliyorsa, piklerin diazotize p-nitroanilin ve diazotize p-nitrosulfanilik asitlerle verdikleri renkler kontrol edilir (Seikel 1964).

#### 3.2.2.3. Askorbik asit tayini

Gül yapraklarında askorbik asit, spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir (Regnel 1976).

#### 3.2.2.4. Toplam katı madde tayini

Toplam katı madde tayini, vakumlu kurutma dolabında yapılmıştır (Regnel 1976).

#### 3.2.2.5. Kül tayini

Kül tayininde Regnel (1976) tarafından belirtilen metod uygulanmıştır.

#### 3.2.2.6. Çözünür katı madde tayini

Yaprakların özsuğu bir tülbent arasında preslenerek çıkarılmış, çözünür katı madde bu sıvıda refraktometre ile belirlenmiştir (Regnel 1976).

#### 3.2.2.7. Protein tayini

Protein tayini kjehdahl yöntemine göre yapılmış, ve bulunan azot miktarı 5.7 faktörü ile carpılarak örnekteki protein miktarı hesaplanmıştır (Horwitz 1970).

#### 3.2.2.8. Titrasyon asitliği ve pH tayini

Titrasyon asitliği tayini için 30 gram yaprak

120 gram su ile bir blenderde parçalanmış ve ayarlı 0.1-n NaOH cözeltisi ile pH 8.1'e kadar titre edilmiştir. Harcanan baz miktarına göre örneğin asit içeriği, susuz sitrik asit (SSA) cinsinden hesaplanmıştır (Horwitz 1970). Karışımında pH tayini dijital bir pH-metre ile yapılmıştır.

#### 3.2.2.9. Demir, çinko, mangan, bakır ve magnezyum tayinleri

Örnekten 5 gram tartılmış ve yaş yakma sonucu elde edilen çözeltideki demir, çinko, mangan, bakır ve magnezyum konsantrasyonları her elementin tayinine özgü koşullarda ayarlanan Varian Techtron AA 175 atomik absorpsiyon spektrofotometre (AAS) ile belirlenmiştir (Horwitz 1970).

#### 3.2.2.10. Fosfor tayini

Fosfor miktarı, Pye Unicam SP 6-550 spektrofotometre cihazı kullanılarak vanadomolibdofosforik sarı renk yöntemine göre tayin edilmiştir (Kacar 1972).

## 4-ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Gül Yapraklarının Bileşimi

Araştırmada materyal olarak kullanılan Isparta Gülünün guncası ve taç yapraklarının bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri saptanmış ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1. Gül gonca ve yapraklarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri**

| Özellik                             | Birim    | Miktar |
|-------------------------------------|----------|--------|
| <b>Gonca</b>                        |          |        |
| Gonca ağırlığı                      | g        | 2.14   |
| Goncadaki yaprakların ağırlığı      | g        | 1.58   |
| Goncadaki normal yaprak sayısı      | adet     | 23     |
| Goncadaki kör yaprak sayısı         | adet     | 6      |
| <b>Yaprak</b>                       |          |        |
| Nem oranı                           | %        | 80.68  |
| Kül oranı                           | %        | 0.63   |
| Çözünür katı madde (refraktometrik) | %        | 11.0   |
| Protein                             | %        | 1.63   |
| Askorbik asit                       | mg/100 g | 91.52  |
| pH                                  |          | 5.92   |
| Titrasyon asitliği (SSA)            | %        | 0.64   |
| <br>Toplam antosiyanin (pH dif.)    | mg/kg    | 285    |
| Magnezyum                           | mg/kg    | 140    |
| Fosfor                              | mg/kg    | 79     |
| Demir                               | mg/kg    | 9.7    |
| Çinko                               | mg/kg    | 2.6    |
| Bakır                               | mg/kg    | 3      |
| Mangan                              | mg/kg    | 5.3    |

#### 4.2. Yaprakların Muhafaza Yöntemleri

Materyal ve Metod bölümünde açıklandığı gibi yaprakların muhafazası amacıyla, bir tanesi geleneksel yöntem olmak üzere 11 farklı metod denenmiştir. Her metod içinde bazı parametreler değiştirilerek 47 farklı uygulama yapılmıştır. Uygulanan muhafaza yöntemlerini değerlendirmede, en önemli kriter olarak antosiyaninin korunma düzeyi alınmıştır. Bu nedenle değişik yöntemlerle muhafaza edilen yapraklarda 1, 3, 6, ve 12. aylarda "pH differansiyel" ve "tekli" metodlara göre toplam antosiyanin tayini yapılmıştır. pH differansiyel yönteminin ısı uygulanmış örneklerde daha olumlu sonuçlar verdiği bilinmektedir (Wrolstad 1976). Bu yüzden araştırmada hazırlanmış bulunan kırkyedi adet örneğin kırkbeş adedinin ısı etkisinde kalmış bulunması ve sonuçların daha fazla tekrarlanabilir olması nedeniyle değerlendirmede sadece pH differansiyel yöntemi ile elde olunan bulgular kullanılmıştır. Bununla birlikte tekli yöntem ile ulaşılan değerler "bağımlı değişken", pH differansiyel yöntemi ile ulaşılan değerler ise "bağımsız değişken" kabul edilerek metodlar arası farkın istatistikî değerlendirilmesi yapılmıştır. Buna ilişkin sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiş olup, analizin bu materyallerde uygulanması durumunda metodlar arasında büyük bir fark bulunmadığı görülmektedir.

**Tablo 4.2. Tekli ve pH differansiyel metodları arasındaki farkın istatistikî değerlendirilmesi**

|        | F       | PR>F   | R <sup>2</sup> | CV      |
|--------|---------|--------|----------------|---------|
| 1. ay  | 424.84  | 0.0001 | 0.90422        | 10.8298 |
| 3. ay  | 1279.94 | 0.0001 | 0.96603        | 7.7776  |
| 6. ay  | 1088.29 | 0.0001 | 0.96022        | 9.3847  |
| 12. ay | 683.06  | 0.0001 | 0.93819        | 13.7135 |

Değişik yöntemlere göre muhafaza edilen örneklerdeki antosiyanin miktarları ve belirtilen sürelerin sonunda korunan antosiyaninin yüzde oranları Tablo 4.3 de gösterilmiştir.

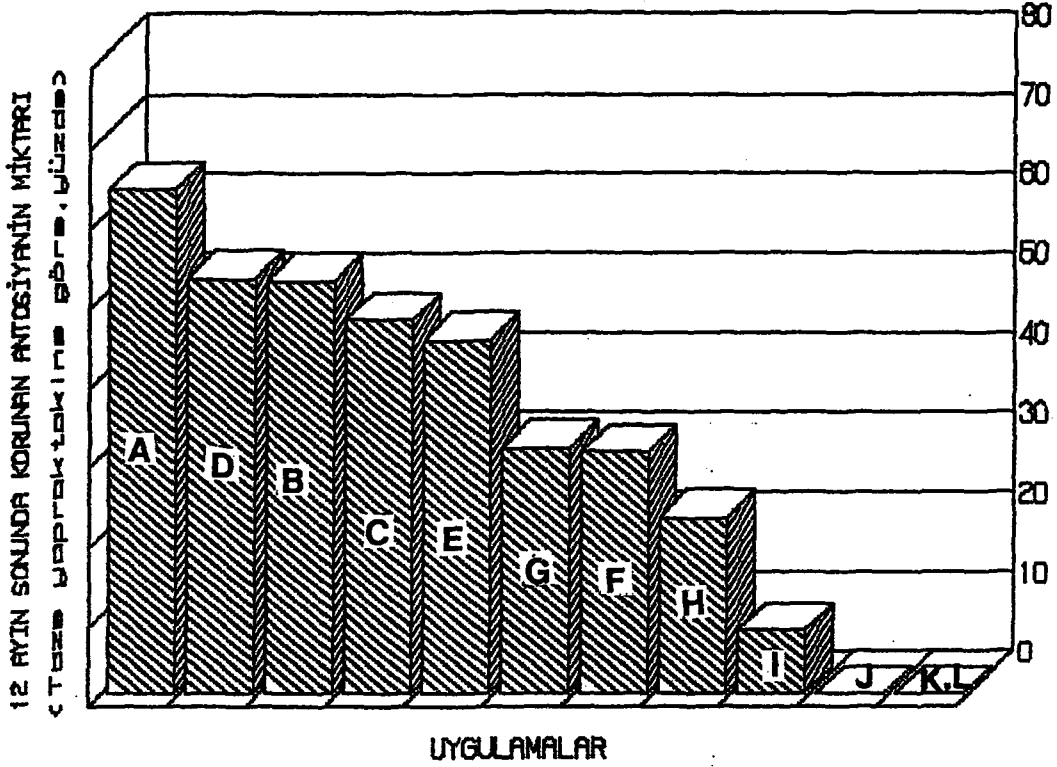
Tablodan alınan değerler, ısıtma işlem süresi ve uygulamada kullanılan maddelerin yoğunlukları gözönüne alınmaksızın ayrıca bilgisayar ile değerlendirilmiş ve ulaşılan bulgular Şekil 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.3. Değişik uygulama yöntemlerine göre muhafaza edilen örneklerin antosiyanin miktarlarında depolama süresince beliren azalmalar**

| Uygulama Kodu | Uyg.+Kons. | Haş. Sür. | Top.Acy.Mik.(mg/kg) |     |     |     | Korunan Acy.Mik.(%) |    |    |    |
|---------------|------------|-----------|---------------------|-----|-----|-----|---------------------|----|----|----|
|               |            |           | Aylar               |     |     |     | Aylar               |    |    |    |
|               |            |           | 1                   | 3   | 6   | 12  | 1                   | 3  | 6  | 12 |
| A             | %0.25 SA   | 1         | 244                 | 196 | 187 | 173 | 85                  | 69 | 66 | 61 |
|               | %0.50 SA   | 1         | 248                 | 238 | 207 | 200 | 87                  | 83 | 73 | 70 |
|               | %1.0 SA    | 1         | 248                 | 230 | 228 | 203 | 87                  | 81 | 80 | 71 |
|               | %0.25 SA   | 2         | 207                 | 204 | 201 | 190 | 73                  | 71 | 71 | 67 |
|               | %0.50 SA   | 2         | 227                 | 204 | 197 | 175 | 80                  | 71 | 69 | 61 |
|               | %1.00 SA   | 2         | 239                 | 233 | 212 | 197 | 84                  | 82 | 74 | 69 |
|               | %0.25 SA   | 3         | 207                 | 204 | 192 | 182 | 73                  | 71 | 67 | 64 |
|               | %0.50 SA   | 3         | 166                 | 166 | 154 | 140 | 58                  | 58 | 54 | 49 |
|               | %1.00 SA   | 3         | 192                 | 184 | 176 | 153 | 67                  | 64 | 62 | 54 |
|               | .5SA+.25AA | 1         | 241                 | 209 | 195 | 181 | 84                  | 73 | 68 | 63 |
| B             | .5SA+.25AA | 3         | 200                 | 162 | 141 | 113 | 70                  | 57 | 49 | 40 |
| C             | %0.25 AA   | 1         | 227                 | 203 | 179 | 167 | 80                  | 71 | 63 | 59 |
|               | %0.24 AA   | 3         | 203                 | 166 | 136 | 100 | 71                  | 58 | 48 | 35 |
| D             | %0.5 EDTA  | 1         | 209                 | 203 | 201 | 199 | 73                  | 71 | 70 | 70 |
|               | %0.5 EDTA  | 3         | 151                 | 133 | 113 | 111 | 53                  | 47 | 40 | 39 |
|               | %1.0 EDTA  | 1         | 190                 | 203 | 187 | 187 | 67                  | 71 | 66 | 65 |
|               | %1.0 EDTA  | 3         | 146                 | 132 | 132 | 96  | 51                  | 46 | 46 | 34 |
| E             | 10 ppm Sn  | 1         | 185                 | 174 | 149 | 147 | 65                  | 61 | 52 | 51 |
|               | 10 ppm Sn  | 3         | 121                 | 101 | 83  | 79  | 42                  | 35 | 29 | 28 |
|               | 25 ppm Sn  | 1         | 192                 | 177 | 155 | 140 | 67                  | 62 | 54 | 49 |
|               | 25 ppm Sn  | 3         | 127                 | 104 | 100 | 90  | 44                  | 36 | 35 | 31 |
|               | 50 ppm Sn  | 1         | 194                 | 185 | 170 | 169 | 68                  | 65 | 60 | 59 |
|               | 50 ppm Sn  | 3         | 120                 | 101 | 96  | 93  | 42                  | 35 | 34 | 33 |

Tablo 4.3. (devamı)

| Uygulama Kodu | Uyg.+Kons. | Haş. Sür. | Top.Acy.Mik.(mg/kg) |     |     |     | Korunan Acy.Mik.(%) |    |    |    |
|---------------|------------|-----------|---------------------|-----|-----|-----|---------------------|----|----|----|
|               |            |           | Aylar               |     |     |     | Aylar               |    |    |    |
|               |            |           | 1                   | 3   | 6   | 12  | 1                   | 3  | 6  | 12 |
| E<br>(Devamı) | 100 ppm Sn | 1         | 121                 | 200 | 171 | 168 | 74                  | 70 | 60 | 59 |
|               | 100 ppm Sn | 3         | 90                  | 99  | 90  | 88  | 32                  | 35 | 31 | 31 |
|               | 150 ppm Sn | 1         | 214                 | 201 | 190 | 185 | 75                  | 71 | 67 | 65 |
|               | 150 ppm Sn | 3         | 142                 | 137 | 123 | 110 | 50                  | 48 | 43 | 39 |
|               | 250 ppm Sn | 1         | 239                 | 225 | 217 | 200 | 84                  | 79 | 76 | 70 |
|               | 250 ppm Sn | 3         | 64                  | 62  | 56  | 51  | 22                  | 22 | 19 | 18 |
| F             | Saf su     | 1         | 159                 | 136 | 129 | 128 | 56                  | 48 | 45 | 45 |
|               | Saf su     | 3         | 82                  | 65  | 54  | 44  | 29                  | 23 | 19 | 15 |
| G             | .25SA+70Bx | 1         | 139                 | 137 | 124 | 112 | 49                  | 48 | 43 | 39 |
|               | .5SA+70Bx  | 1         | 168                 | 137 | 106 | 79  | 59                  | 48 | 37 | 38 |
|               | 1.0SA+70Bx | 1         | 144                 | 125 | 119 | 93  | 50                  | 44 | 42 | 33 |
|               | .25SA+70Bx | 2         | 141                 | 135 | 104 | 72  | 49                  | 47 | 36 | 25 |
|               | .5SA+70Bx  | 2         | 140                 | 128 | 103 | 96  | 49                  | 45 | 36 | 34 |
|               | 1.0SA+70Bx | 2         | 137                 | 119 | 117 | 105 | 48                  | 42 | 41 | 37 |
|               | .25SA+70Bx | 3         | 119                 | 108 | 94  | 93  | 42                  | 38 | 33 | 32 |
|               | .5SA+70Bx  | 3         | 112                 | 104 | 92  | 73  | 39                  | 36 | 32 | 26 |
|               | 1.0SA+70Bx | 3         | 122                 | 92  | 69  | 64  | 43                  | 32 | 24 | 22 |
|               | .5SA+40Bx  | 1         | 106                 | 94  | 76  | 75  | 37                  | 33 | 27 | 26 |
| H             | .5SA+40Bx  | 3         | 103                 | 96  | 48  | 51  | 36                  | 34 | 17 | 18 |
| I             | Pastörize  | -         | 111                 | 73  | 60  | 23  | 39                  | 26 | 21 | 8  |
| J             | .5SA+H.S.  | 1         | 12                  | 1   | 0   | 0   | 4                   | 0  | 0  | 0  |
|               | .5SA+H.S.  | 3         | 10                  | 1   | 0   | 0   | 4                   | 0  | 0  | 0  |
| K             | Gelen.+SA  | -         | 91                  | 59  | 37  | 0   | 32                  | 21 | 13 | 0  |
| L             | Geleneksel | -         | 104                 | 68  | 39  | 0   | 36                  | 24 | 14 | 0  |



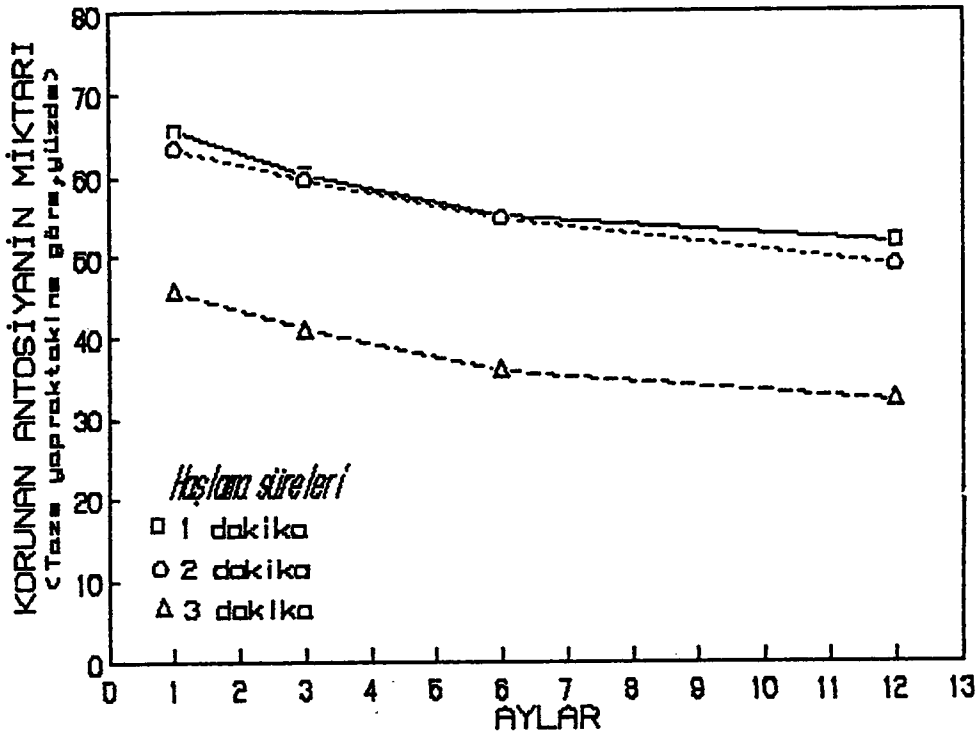
Şekil 4.1. Gül yapraklarının muhafazasındaki uygulama farklılıklarına göre antosiyani miktarlarındaki değişimler.

Şekil 4.1'den açıkça görüldüğü gibi 12 aylık depolama sonunda en iyi sonuç, sitrik asit çözeltisi içerisinde haşlandıktan sonra dondurulan örneklerde alınmaktadır. Bunu haşlama suyunda EDTA kullanılması ile hazırlanan D kodlu örnekler izlemektedir.

Haşlama sürelerinin dikkate alınıp, diğer faktörlerin ihmal edilmesi ile yapılan değerlendirme sonuçları ise Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

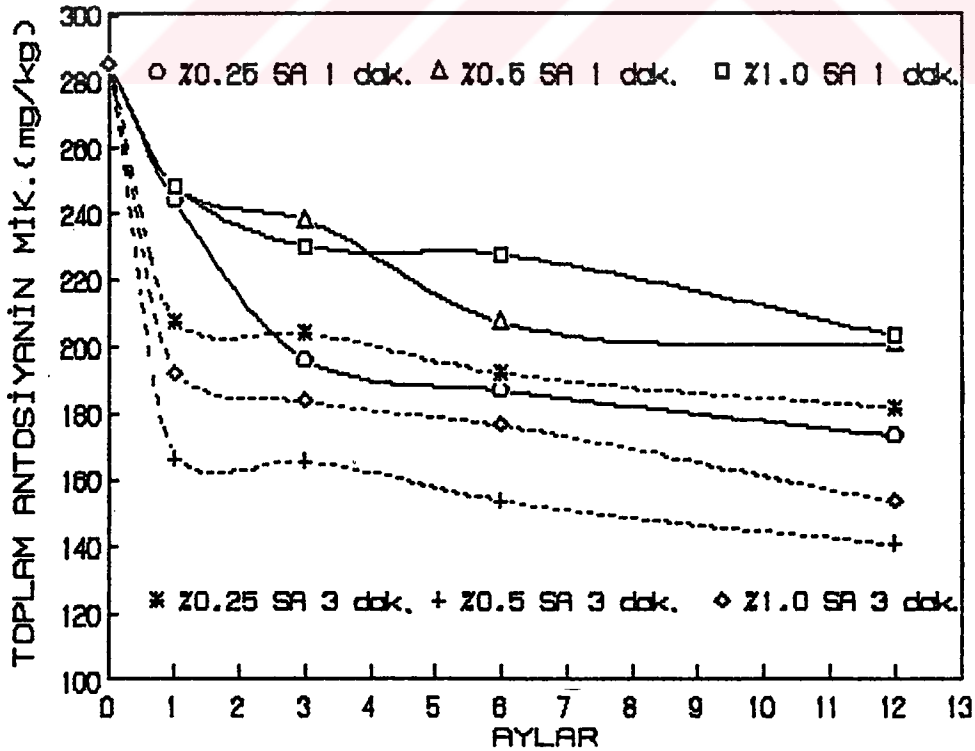
Şekil 4.2'den açıkça görüldüğü gibi haşlama süresinin 1 dakikadan 2 dakikaya yükselmesi halinde, korunan antosiyani miktarında büyük bir değişiklik ortaya çıkmamışken, sürenin 3 dakikaya uzatılması halinde kayıp önemli düzeyde artmaktadır.

Yukarıda değinildiği gibi antosiyani en iyi koruma yöntemleri, yaprakların sitrik asit veya EDTA çözeltilerinde değişik süreler haşlanmasından sonra dondurulmasıdır. Bu iki uygulamada haşlama suyunda kullanılan

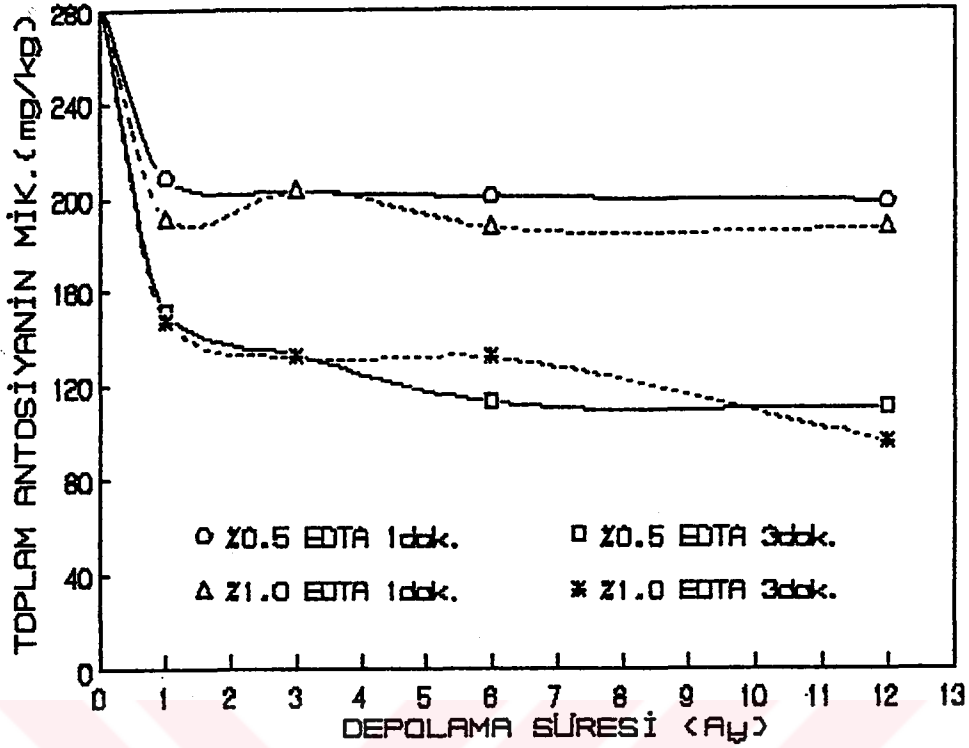


Şekil 4.2. Haşlama sürelerinin muhafaza edilen yapraklarda antosiyanin korunması üzerine etkileri.

maddelerin konsantrasyonları ile haşlama süreleri dikkate alınarak yapılan değerlendirme sonuçları ise Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



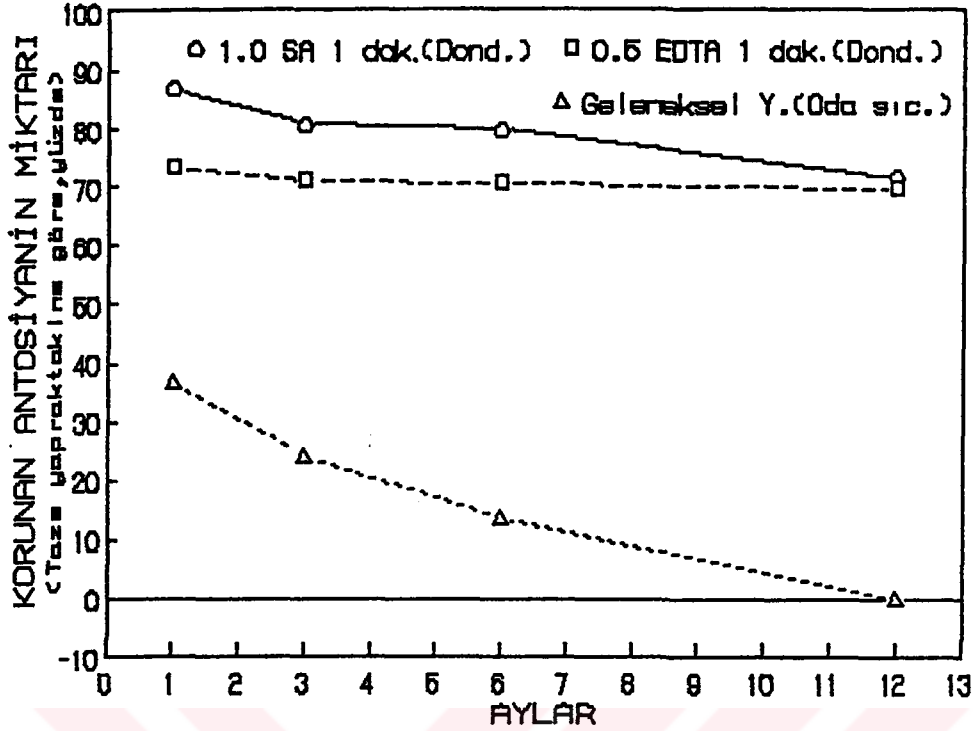
Şekil 4.3. Antosiyanin miktarı üzerine haşlama suyundaki sitrik asit oranı ile haşlama sürelerinin etkileri.



Şekil 4.4. Antosiyanin miktarı üzerine haşlama suyundaki EDTA oranı ile haşlama sürelerinin etkileri.

Araştırmada gül yapraklarının muhafazası üzerinde olumlu sonuç verebileceği belirlenen çok değişik faktörler incelenmiştir. Bu faktörlerle bunlara ilişkin sonuçlar Tablo 4.3'de verilmişti. Tablodaki değerlerden yararlanılarak çeşitli uygulamalar kendi içinde veya diğer uygulamalarla kıyaslanarak irdelenmiş ve bunlara ilişkin çeşitli grafikler hazırlanmıştır. Ancak bunların burada ayrı ayrı verilmesinden kaçınılmış ve esas olarak Tablo 4.3'ün verilmesiyle yetinilmiştir. Bununla birlikte gül yapraklarının en iyi muhafaza yöntemi olarak önerdiğimiz uygulamalar ile geleneksel yöntemin kıyaslamasını içeren Şekil 4.5'in verilmesinde yarar görülmüştür.

Şekil 4.5'den anlaşılabacağı gibi gül yapraklarının % 1.0 oranında sitrik asit veya %0.5 oranında EDTA içerisinde 1 dakika süre ile haşlandıktan sonra dondurulması ile hazırlanan ara üründe antosiyanin kaybı 12 ay süresince hemen hemen sabit kalmaktadır.



Şekil 4.5. Tarafımızdan önerilen yöntemlerle geleneksel yöntemin karşılaştırılması.

#### 4.3. Gül Yapraklarının Flavonoid Yapısı

##### 4.3.1. Araştırmada kullanılan standartlara ilişkin olarak saptanmış bulunan bazı veriler

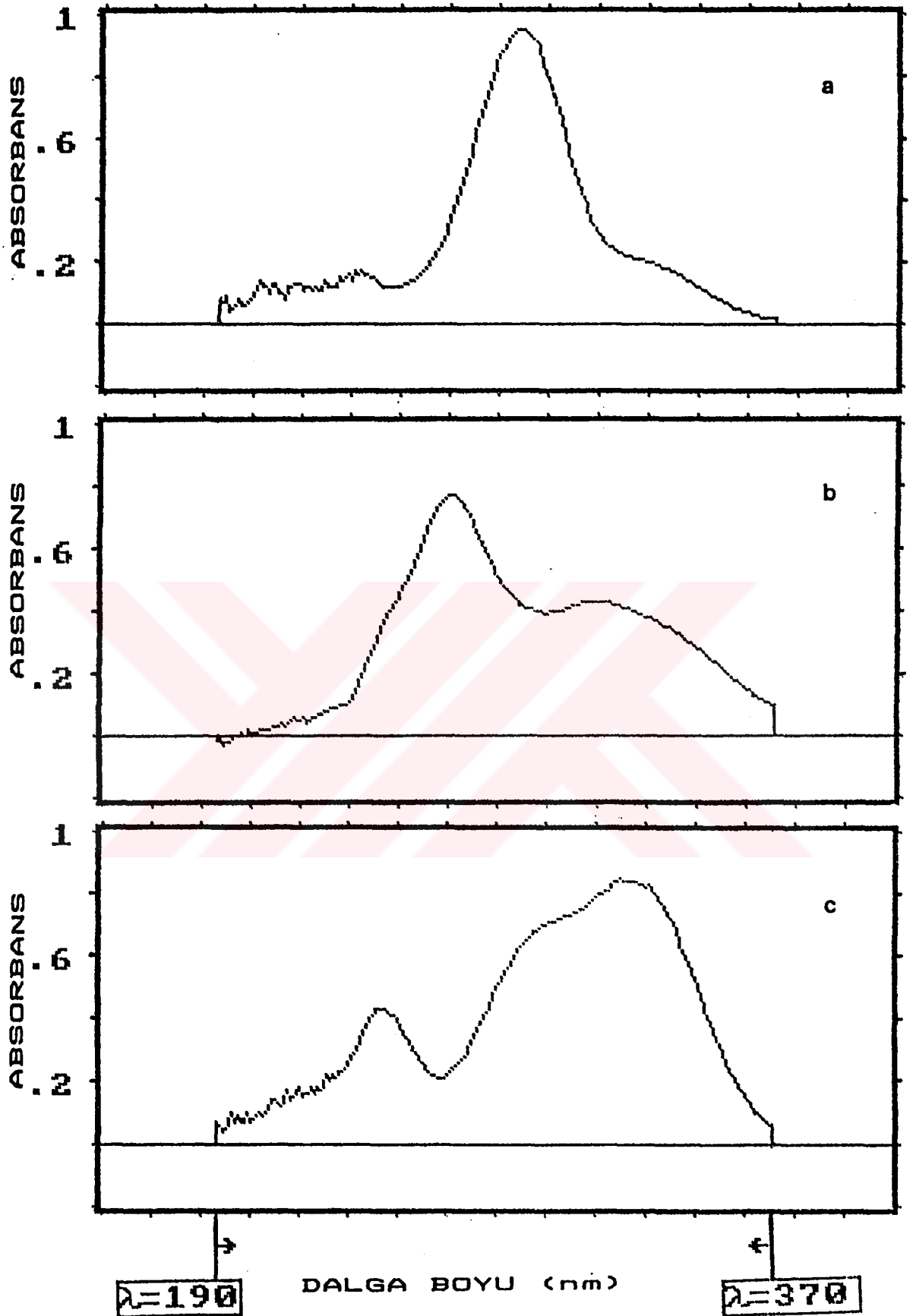
Flavonoidlerin gül yapraklarından izolasyonu ve tanısı için ilk aşamada, bu araştırmada standart olarak kullanılan 28 adet farklı fenolik madde HPLC kolonuna uygulanarak bunların geliş süreleri ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ) ve kapasite faktörleri ( $k'$ ) belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Bir fikir verme amacıyla değişik spektral niteliklere sahip bazı standartların HPLC ile tarafımızdan saptanmış bulunan spektral eğrileri örnek olarak Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu veriler literatürde muhtemelen ilk kez yer almaktadır.

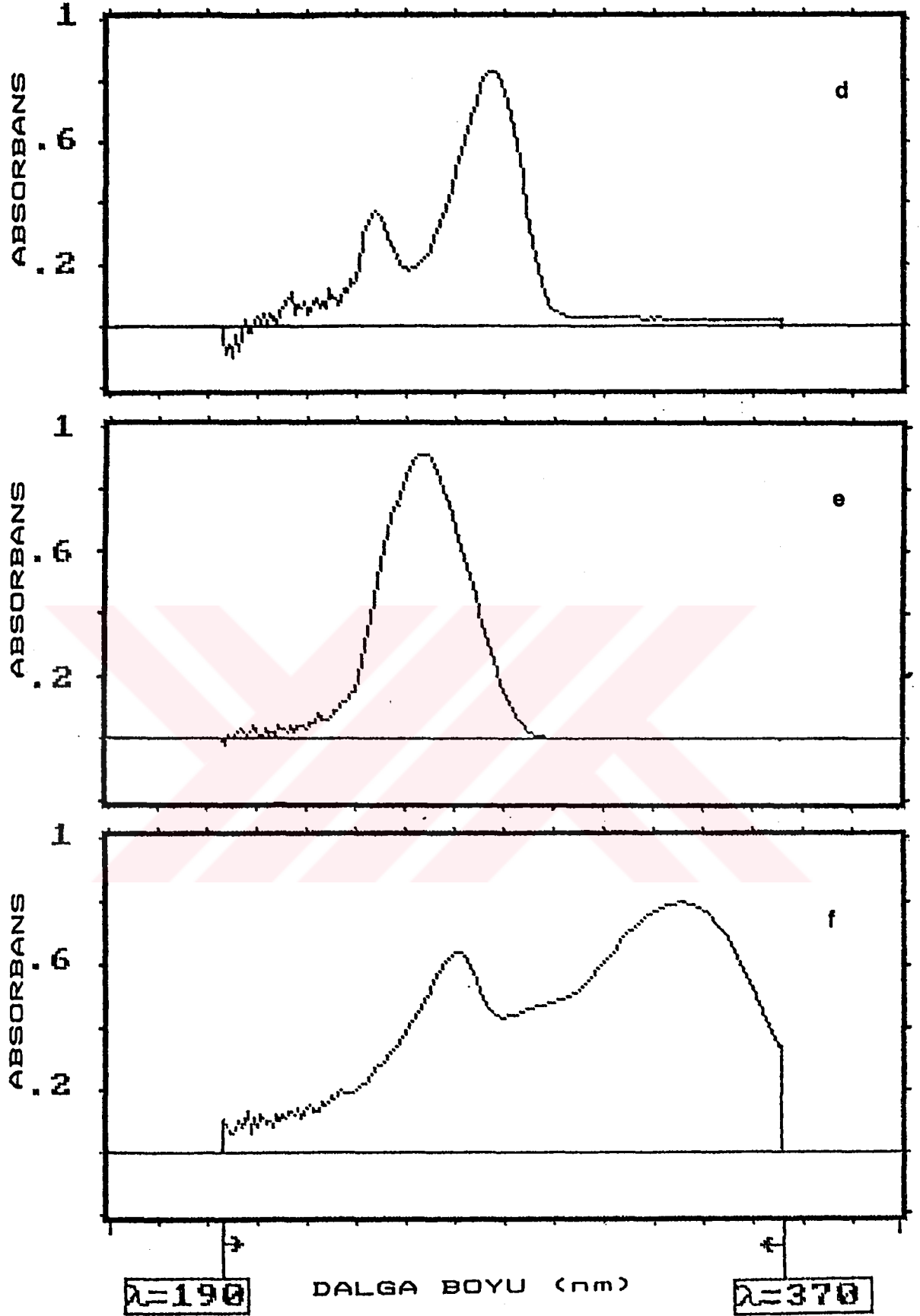
**Tablo 4.4.** Bazı fenolik maddelerin geliş süreleri ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ) ve kapasite faktörleri ( $k'$ )

| Bileşik              | $t_r$ (dak) | $\lambda_{max}$ (nm)      | $k'$ |
|----------------------|-------------|---------------------------|------|
| Gallik asit          | 3.5         | 271                       | 0.3  |
| Protokatekuik asit   | 5.3         | 259,293                   | 1.0  |
| D(-) kateşin         | 6.5         | 239,277                   | 1.3  |
| Eskülin              | 6.5         | 246,296 <sup>o</sup> ,332 | 1.4  |
| p-hidroksibenzoik a. | 8.3         | 254                       | 2.0  |
| Klorojenik asit      | 9.5         | 244,301 <sup>o</sup> ,321 | 2.4  |
| Kafeik asit          | 11.4        | 244,319                   | 3.2  |
| Sirinjik asit        | 13.2        | 273                       | 3.7  |
| Cn-3,5 GG            | 14.1        | 274                       | 3.8  |
| Pg-3,5 GG            | 15.5        | 272                       | 4.2  |
| p-kumarik asit       | 16.3        | 291 <sup>o</sup> ,308     | 4.9  |
| Pn-3,5 GG            | 17.3        | 276                       | 5.2  |
| Cn-3 Ga              | 18.5        | 278                       | 5.4  |
| Ferulik asit         | 19.4        | 243,301 <sup>o</sup> ,321 | 5.7  |
| Cn-3 G               | 20.2        | 278                       | 6.1  |
| Cn-3 Ru              | 24.1        | 279                       | 7.2  |
| Rutin                | 30.4        | 256,354                   | 10.0 |
| Mirisetin            | 31.1        | 254,370                   | 10.0 |
| Kuersetin-3 A        | 31.2        | 256,301 <sup>o</sup> ,351 | 9.4  |
| Sinnamik asit        | 32.1        | 276                       | 10.4 |
| Cn-klorid            | 38.3        | 274                       | 12.4 |
| Pg-klorid            | 42.2        | 266                       | 13.0 |
| Narinjenin           | 40.1        | 288,335 <sup>o</sup>      | 14.3 |
| Kuersetin            | 40.6        | 255,370                   | 13.5 |
| Pn-klorid            | 43.5        | 272                       | 13.5 |
| Kampferol            | 43.6        | 263,364                   | 13.6 |
| Apijenin             | 44.1        | 266,337                   | 14.3 |
| Krisin               | 45.3        | 266,313                   | 14.4 |

Not: Cn=siyanidin; Pg=pelargonidin; Pn=peonidin; G=glukoz; Ga=galaktoz; A=arabinoz; Ru=rutinoz; <sup>o</sup>=omuz.



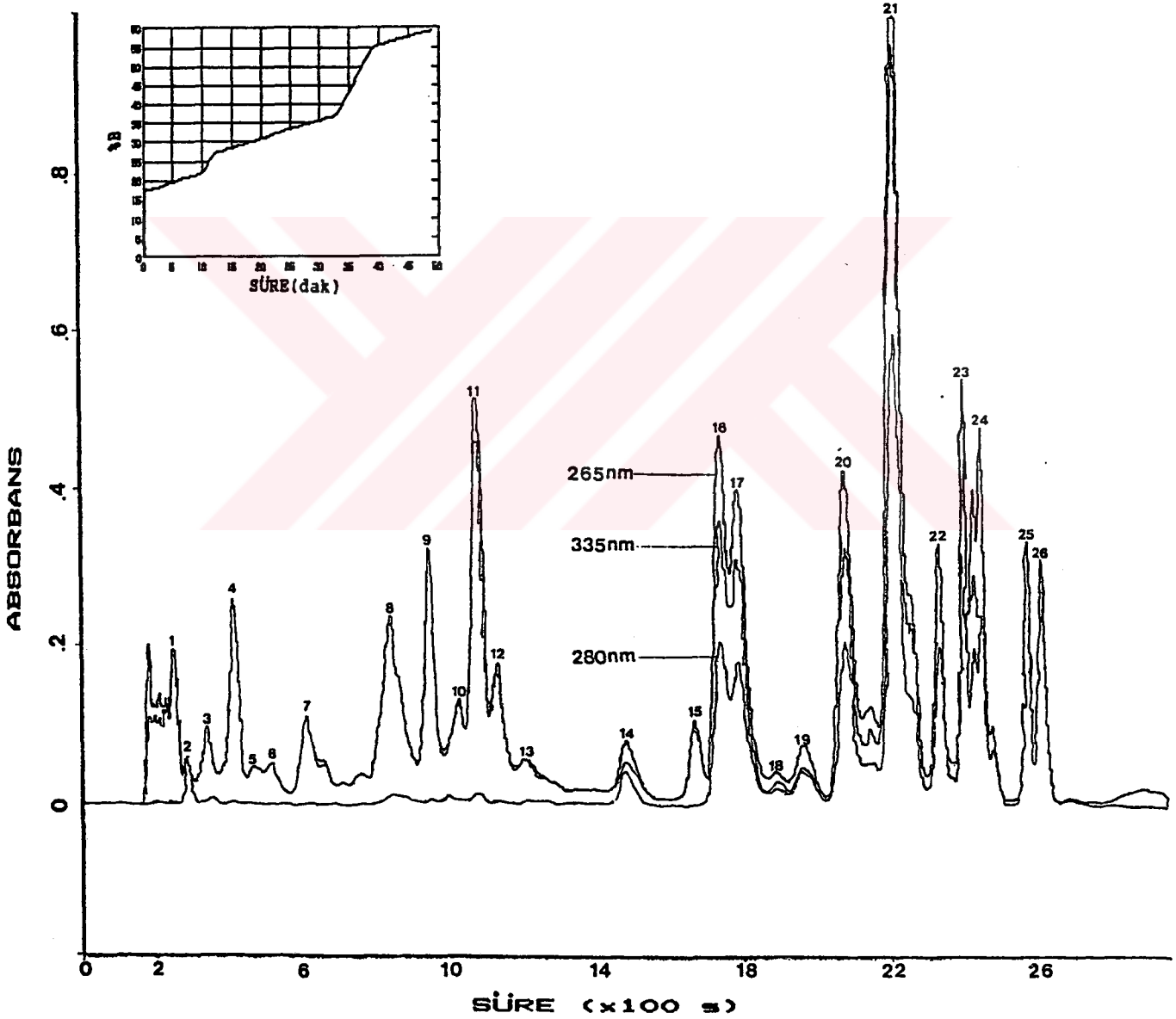
Şekil 4.6. Bazı standartların HPLC yardımıyla saptanmış spektral eğrileri [Narinjenin(a), Krisin(b), Klorojenik asit(c)].



Şekil 4.7. Bazı standartların HPLC yardımıyla saptanmış spektral eğrileri [D(-) Kateşin(d), p-hidroksibenzoik asit(e), Apijenin(f)].

#### 4.3.2. Gül yapraklarının flavonoidleri

Isparta Gülü'nün flavonoidlerine ilişkin olarak saptanmış bulunan bir kromatogram Şekil 4.8'de verilmiştir. Böyle bir kromatogramın hazırlanmasında 190-370 nm ler arasında dörde kadar istenilen dalda boyları seçilebilmektedir. Sunulan kromatogram, antosiyanin ve flavonolları kapsamaması nedeniyle 265 nm, 280 nm ve 335 nm'ler olmak üzere 3 dalga boyu seçilerek ve bu dalga boylarındaki absorbans değerleri esas alınarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.8. Gül (R.damascena) yapraklarının flavonoidlerine ilişkin kromatogram (Küçük şekil eluasyon profilini göstermektedir).

Gül flavonoidlerine ilişkin olarak elde edilen kromatogramdaki piklerin geliş süreleri ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ), kapasite faktörleri ( $k'$ ), 280 ve 335 nm'lerdeki pik alanları (birimsiz) ve bu piklerin yüzde oranları Tablo 4.5'de verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Gül flavonoidlerine ilişkin olarak elde edilen kromatogramdaki piklerin özgül değerleri ve pik alanları. [geliş süresi ( $t_r$ ), pik noktaları ( $\lambda_{max}$ ), kapasite faktörü ( $k'$ )]

| Pik no | $t_r$ | $\lambda_{max}$ (nm) | $k'$ | P.alanı |        | P.alanı(%) |        |
|--------|-------|----------------------|------|---------|--------|------------|--------|
|        |       |                      |      | 280 nm  | 335 nm | 280 nm     | 335 nm |
| 1      | 4.2   | 242°,272             | 0.4  | 64.2    | -      | 3.0        | -      |
| 2      | 4.9   | 245°,305             | 0.6  | 16.3    | 9.4    | 0.8        | 0.6    |
| 3      | 5.7   | 252°,270             | 0.9  | 36.4    | 2.5    | 1.7        | 0.2    |
| 4      | 7.0   | 243°,272             | 1.3  | 86.5    | 0.7    | 4.1        | 0.1    |
| 5      | 7.8   | 243°,275             | 1.6  | 17.3    | -      | 0.8        | -      |
| 6      | 8.7   | 243°,274             | 1.8  | 27.2    | -      | 1.3        | -      |
| 7      | 10.3  | 248°,274             | 2.4  | 51.4    | 1.3    | 2.4        | 0.1    |
| 8      | 14.1  | 274                  | 3.7  | 171.9   | 8.0    | 8.1        | 0.6    |
| 9      | 15.9  | 274                  | 4.3  | 116.8   | 2.0    | 5.5        | 0.1    |
| 10     | 17.2  | 274                  | 4.7  | 59.0    | 4.3    | 2.8        | 0.3    |
| 11     | 18.0  | 245°,275             | 5.0  | 191.2   | 3.8    | 9.0        | 0.3    |
| 12     | 18.9  | 252°,276             | 5.2  | 77.0    | 0.8    | 3.6        | 0.1    |
| 13     | 20.0  | 275                  | 5.6  | 54.1    | -      | 2.6        | -      |
| 14     | 24.7  | 262,285°,35          | 7.2  | 43.0    | 16.0   | 2.0        | 1.1    |
| 15     | 27.8  | 275                  | 8.2  | 46.9    | -      | 2.2        | -      |
| 16     | 29.0  | 255,301°,35          | 8.6  | 87.7    | 152.   | 4.1        | 10.5   |
| 17     | 29.8  | 256,301°,35          | 8.9  | 91.4    | 149.   | 4.3        | 10.3   |
| 18     | 31.6  | 257,301°,35          | 9.4  | 7.3     | 8.9    | 0.3        | 0.6    |
| 19     | 32.7  | 261,301°,35          | 9.8  | 26.2    | 21.9   | 1.2        | 1.5    |
| 20     | 34.6  | 262,301°,34          | 10.5 | 98.4    | 158.   | 4.6        | 10.9   |
| 21     | 36.8  | 264,298°,34          | 11.2 | 280.0   | 450.   | 13.3       | 31.0   |
| 22     | 38.8  | 265,293°,34          | 11.8 | 63.9    | 70.5   | 3.0        | 4.9    |
| 23     | 40.0  | 263,298°,34          | 12.2 | 58.3    | 88.2   | 2.8        | 6.0    |
| 24     | 40.4  | 262,298°,34          | 12.4 | 109.1   | 146.   | 5.2        | 10.1   |
| 25     | 42.8  | 263,298°,34          | 13.2 | 41.6    | 50.1   | 2.0        | 3.5    |
| 26     | 43.5  | 265,313              | 13.4 | 65.0    | 62.6   | 3.1        | 4.3    |

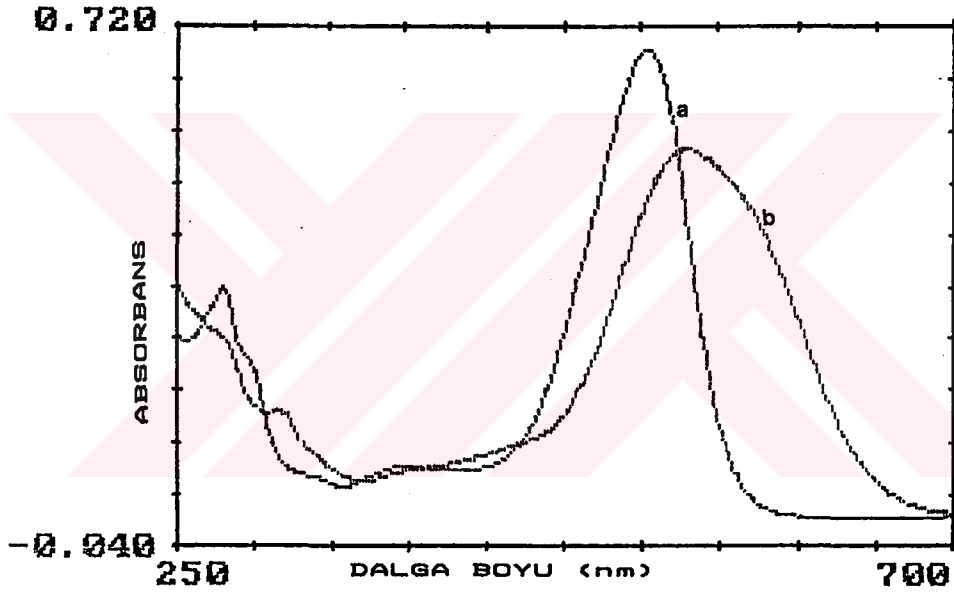
Tablo 4.5'deki piklerden 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 15 numaralı olanların HPLC ile elde olunan absorpsiyon maksimum değerleri dikkate alınarak, "Kuramsal Temeller ve Kaynak Araştırması" bölümünde verilmiş bulunan Tablo 2.3 ve Şekil 2.3'deki verilerle birlikte değerlendirilince, bunların antosiyaninler olabilecekleri olasılığı ortaya çıkmaktadır. Ancak HPLC kolonundan geliş izlenince bunlar arasında yalnızca 8 no'lu pikin renkli olduğu saptanmıştır. Bu durum bu pikin antosiyanin olma olasılığını çok kuvvetlendirici bir veridir. Bununla birlikte yukarıda numarası verilmiş pikler fraksiyon halinde toplanıp, yoğunlaştırıldıktan sonra filtre kağıdı üzerinde amonyak buharına tutulmuş ve bunlardan sadece 8 no'lu pikin mavi renk verdiği saptanmıştır. Bu bulgulara göre 8 no'lu pikin antosiyanin olduğu, diğerlerinin ise flavan 3-ol'ler olabilecekleri sonucuna varılmıştır. Bu nedenle öncelikle 8 no'lu pik HPLC yardımıyla % 100'e yakın saflıkta elde edilmiş ve 250-700 nm'ler arasındaki absorpsiyon spektrumu belirlenmiştir. Tablo 4.6 ve Şekil 4.9'da verildiği gibi amonyaklı ve amonyaksız ortamda gösterdiği renkten, absorpsiyon spektrumundaki pik noktalarından,  $E_{440}/E_{vis.max.}$  ve nihayet  $E_{UV.max.}/E_{vis.max.}$  değerlerinden 8 no'lu pikin siyanidin veya peonidinin 3-5 diglukoziti olabileceği sonucuna varılmıştır. Pigmentin yapısındaki aglukonun ve şekerin belirlenmesi amacıyla asit hidrolizine tabi tutulduktan sonra, şekerler kağıt kromatografisi ile, aglukon kısım ise HPLC ile incelenmiştir. Sonuçları Tablo 4.8'de verilen bu incelemelerle bu pigmentin "siyanidin 3-5-diglukozit" olduğu kesin olarak saptanmış bulunmaktadır.

R.damascena'ya ait kromatogramdaki 14 no'lu pik ile 16-26 arasındaki piklerin HPLC ile elde olunan spektral eğrilerinden ulaşılan bulgular bu piklerin flavonollere ait olabilecekleri kanısını uyandırmaktadır. Bunlardan 16, 17, 20, 21, 23, 24, 25, 26 no'lu pikler HPLC ile ayrı ayrı ve saf olarak izole edilebilmiştir. Daha sonra

Tablo 4.6. *R.damascena* antosiyaninine ilişkin spektral veriler

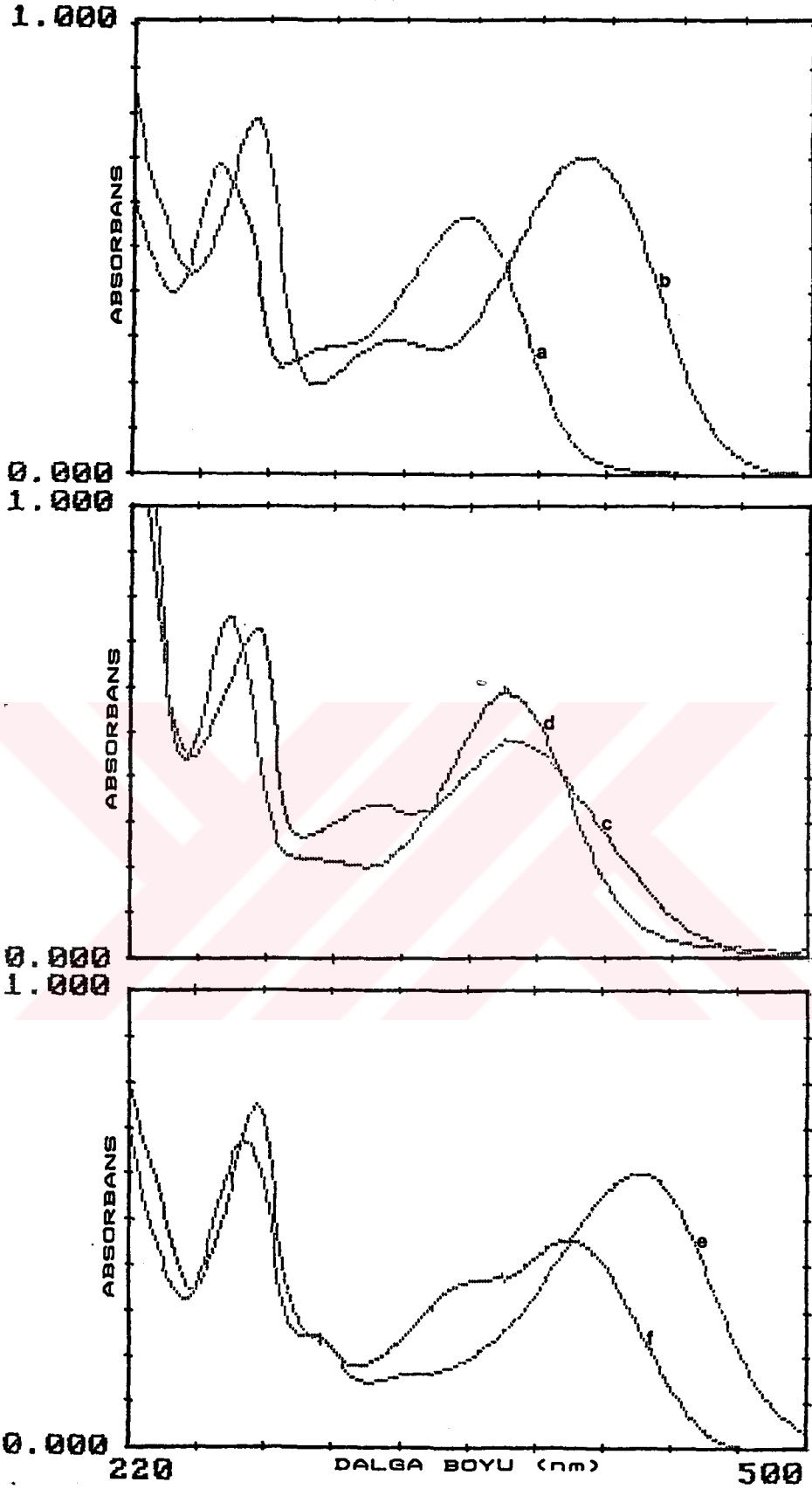
| Test Materyali       | Gör. | UV | NH <sub>3</sub> | $\lambda$ max (nm) | $E_{440}/E_{vis-max}$ | $E_{UV max}/E_{vis-max}$ | AlCl <sub>3</sub> Shift |
|----------------------|------|----|-----------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 8 No'lu pik          | Mc   | Pk | M               | 277<br>523         | 12.4                  | 42.5                     | +                       |
| Cn 3,5-GG (Standart) | Mc   | Pk | M               | 277<br>522         | 12.2                  | 42.1                     | +                       |
| * Cn 3,5-GG          | Mc   | Pk | M               | 273<br>524         | 13.0                  | 44.0                     | +                       |

Not: Mc=macenta; Pk=parlak kırmızı; M=mavi \*=Harborne (1967)'dan alınmış veriler.

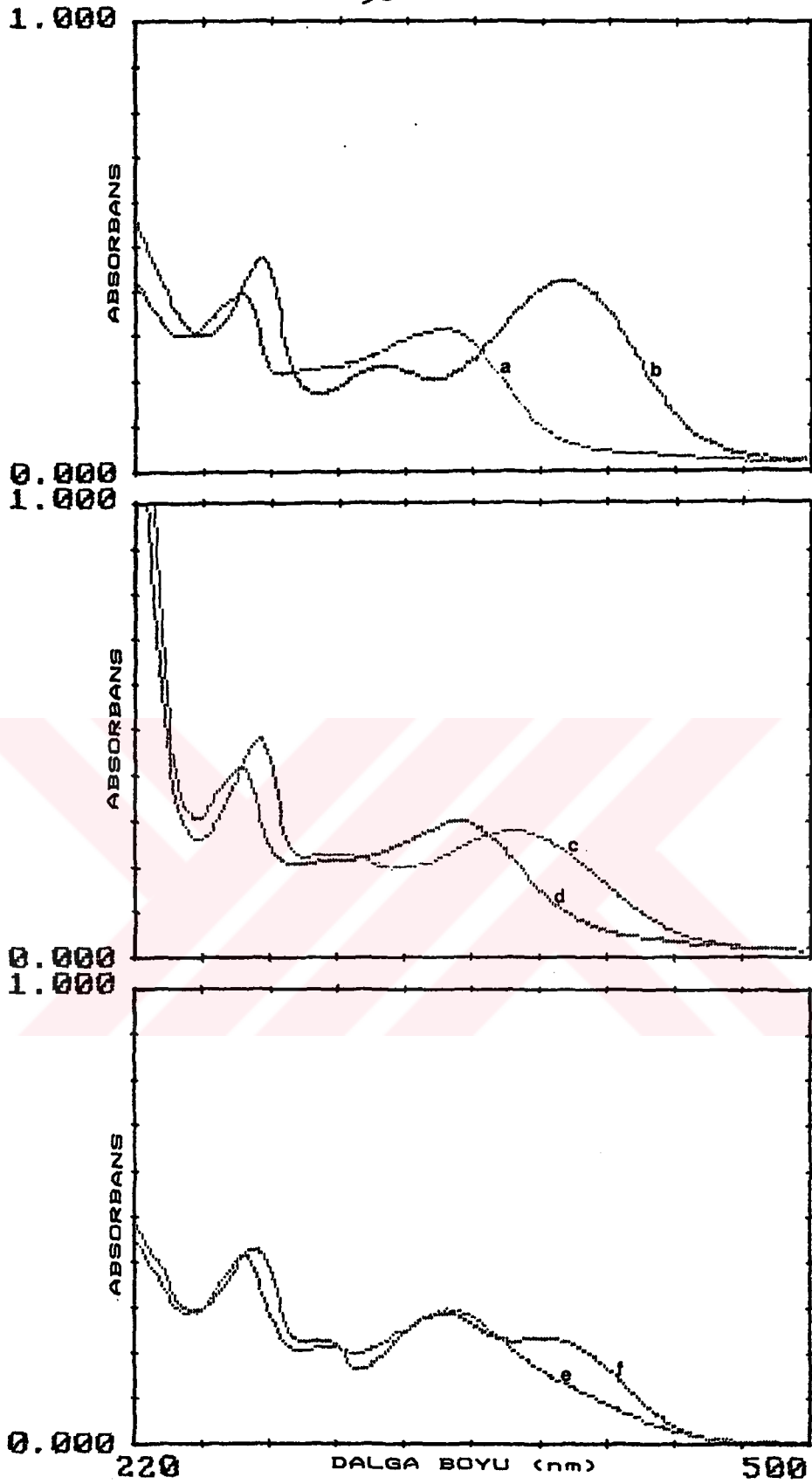


Şekil 4.9. *R.damascena* antosiyaninine ilişkin spektral eğri [%0.01 HCl içeren metanolde(a), aynı çözelti +AlCl<sub>3</sub>(b)].

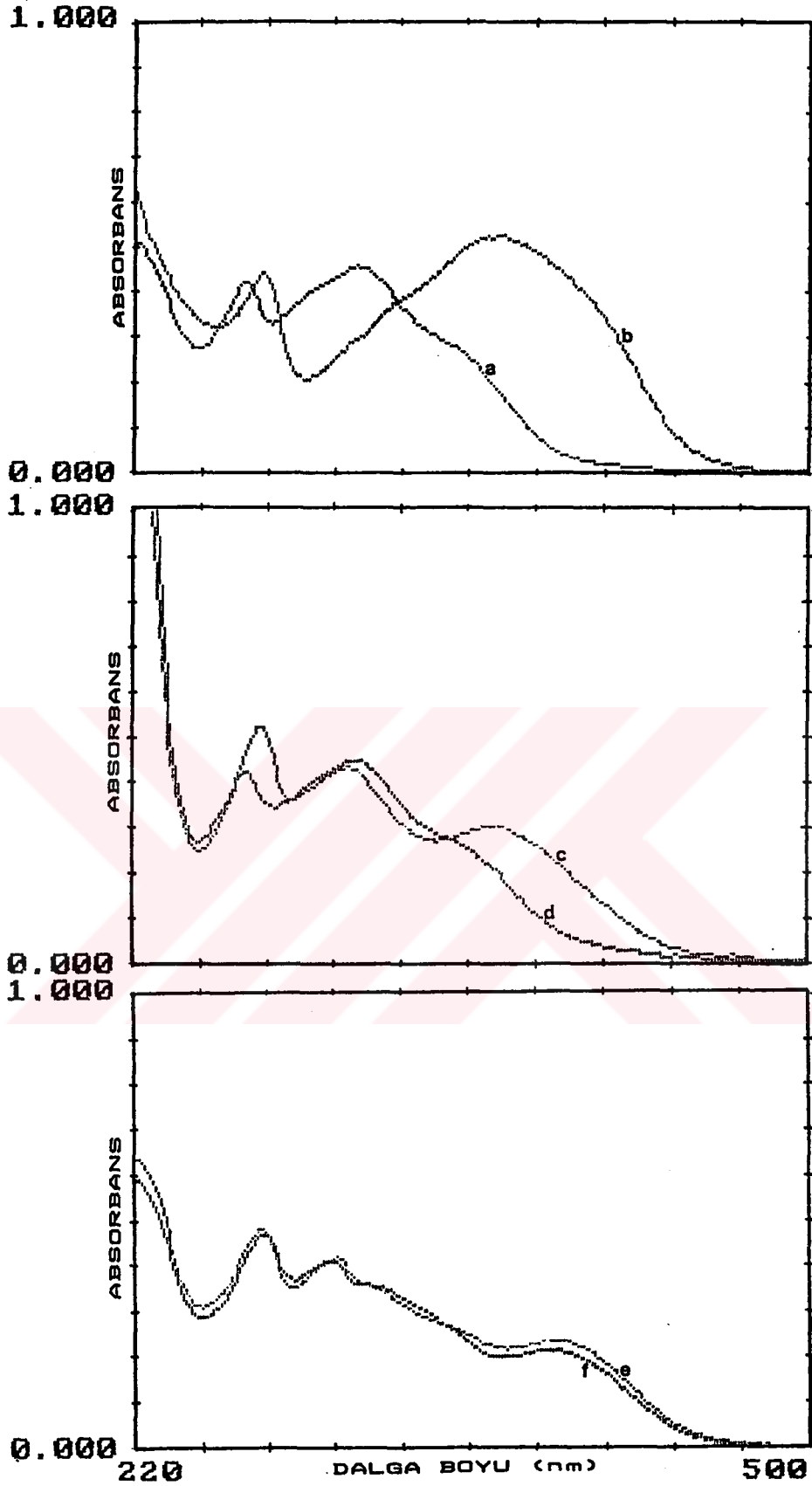
oksidasyon düzeyinin ve serbest hidroksillerin (dolayısıyla yapıdaki şekerin bağlantı yerinin) saptanabilmesi amacıyla bu piklerdeki shift oluşumları incelenmiş ve değişik spektral eğriler elde edilmiştir. Farklı niteliklere sahip olan 16, 21 ve 22 no'lu piklere ait spektral eğriler örnek olarak Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de gösterilmiştir. Flavonollara ait diğer bütün pikler için aynı işlemler yapılmış ve bunlara ilişkin spektrogramlar elde edilmiştir. Bununla birlikte bu spektrogram-



şekil 4.10. 16 nolu pikin değişik shift reaktiflerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile].



Şekil 4.11. 21 nolu pikin değişik shift reaktiflerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile].



şekil 4.12. 26 nolu pikin değişik shift reaktiflerinin varlığındaki spektrogramları [Metanol(a), NaOMe(b), NaOAc(c), NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>(d), AlCl<sub>3</sub>(e), AlCl<sub>3</sub>+HCl(f) ile].

ların burada verilmesine gerek görülmeyerek, sadece shift reaktifleriyle gösterdikleri kaymalar, bu spektrogramlardan çıkarılarak, Tablo 4.7'de toplu halde verilmiştir. Tablo 4.7'deki (+) değerler, kaymanın daha yüksek dalga boylarına doğru (yani sağ tarafa) olduğunu göstermektedir. Buna karşın (-) olarak belirtilmiş bulunan değerler ise bunun aksini, yani kaymanın daha düşük dalga boylarına doğru olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.7. R.damascena flavonal glukozitlerinin metanoldeki ve 5 farklı shift reaktifindeki spektral nitelikleri**

| Pik No | $\lambda_{max}(nm)$<br>Metanolde |       | $\Delta\lambda$<br>NaOMe | $\Delta\lambda$<br>NaOAc | $\Delta\lambda$<br>NaOAc/<br>H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | $\Delta\lambda$<br>AlCl <sub>3</sub> | $\Delta\lambda$<br>AlCl <sub>3</sub> /<br>HCl |
|--------|----------------------------------|-------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
|        | BandII                           | BandI | BandI                    | BandII                   | BandI                                                       | BandI                                | BandI                                         |
| 16     | 255,293 <sup>a</sup>             | 357   | +48                      | +17                      | +18                                                         | +74                                  | +45                                           |
| 17     | 255,295 <sup>a</sup>             | 357   | +50                      | +17                      | +18                                                         | +68                                  | +46                                           |
| 20     | 264,301 <sup>a</sup>             | 352   | +46                      | +9                       | +7                                                          | -3                                   | +41                                           |
| 21     | 264,301 <sup>a</sup>             | 345   | +52                      | +8                       | +9                                                          | +5                                   | +41                                           |
| 23     | 265,294 <sup>a</sup>             | 346   | +46                      | +8                       | +4                                                          | +45                                  | +47                                           |
| 24     | 264                              | 341   | +46                      | +7                       | +2                                                          | +5                                   | +53                                           |
| 25     | 264                              | 338   | +47                      | +7                       | +4                                                          | +52                                  | +55                                           |
| 26     | 266                              | 313   | +55                      | +8                       | 0                                                           | +25                                  | +78                                           |

<sup>a</sup>: omuz

Daha sonra R. damascena'dan izole edilen pikler antosiyaninde yapıldığı gibi hidrolize edilmiş ve aynı şekilde aglukon ve şeker yapıları belirlenmiş ve bulgular Tablo 4.8'de verilmiştir.

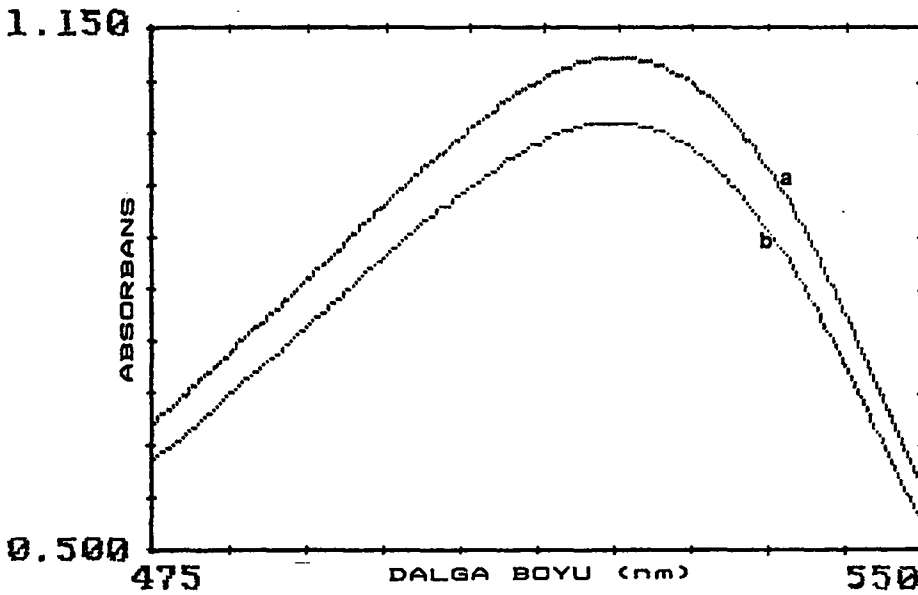
Diğer taraftan flavan 3-ol'ler olabilecekleri tahmin edilen pikler, fraksiyonlar halinde vanilin testine tabi tutulmuştur. Absorbans değerlerinin belirlenmesi sonucunda 2 nolu test çözeltisi kullanılarak hazırlanan örneklerde (Şekil 4.13'de görüldüğü gibi) daha yüksek absorbans değerleri saptanmıştır. Bu durum ele alınan

**Tablo 4.8. R.damascena flavonoidlerinin aglukon ve şeker kısımlarına ilişkin kromatografik veriler**

|                             | Pik No |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|
|                             | 8      | 16   | 17   | 20   | 21   | 22   | 24   | 25   |
| <b>Aglukonlar</b>           |        |      |      |      |      |      |      |      |
| Geliş Sür.<br>(dak)         | 38.1   | 41.1 | 40.0 | 42.4 | 43.1 | 42.5 | 43.3 | 43.3 |
| $\lambda_{max}$ (Bd.II)     | 274    | 255  | 255  | 264  | 263  | 263  | 263  | 263  |
| $\lambda_{max}$ (Bd.I)      | -      | 370  | 370  | 365  | 366  | 364  | 366  | 365  |
| <b>Şekerler</b><br>(RGx100) | 100    | 100  | 91   | 90   | 100  | 150  | 96   | 89   |
|                             |        |      | 88   | 147  | 144  |      | 270  | 275  |

| 26   | Standardlar |    |     |     |     |      |      |      |
|------|-------------|----|-----|-----|-----|------|------|------|
|      | G           | Ga | Xy  | Ar  | Ra  | Cn   | Ku   | Ka   |
| 43.1 | -           | -  | -   | -   | -   | 38.3 | 40.6 | 43.6 |
| 264  | -           | -  | -   | -   | -   | 274  | 255  | 263  |
| 367  | -           | -  | -   | -   | -   | -    | 370  | 365  |
| 96   | 100         | 88 | 176 | 154 | 284 | -    | -    | -    |
| 146  |             |    |     |     |     |      |      |      |
| 265  |             |    |     |     |     |      |      |      |

G:glukoz, Ga:galaktoz, Xy:ksiloz, Ar:arabinoz,  
Ra:ramnoz, Cn:siyanidin, Ku:kuersetin, Ka:kampferol



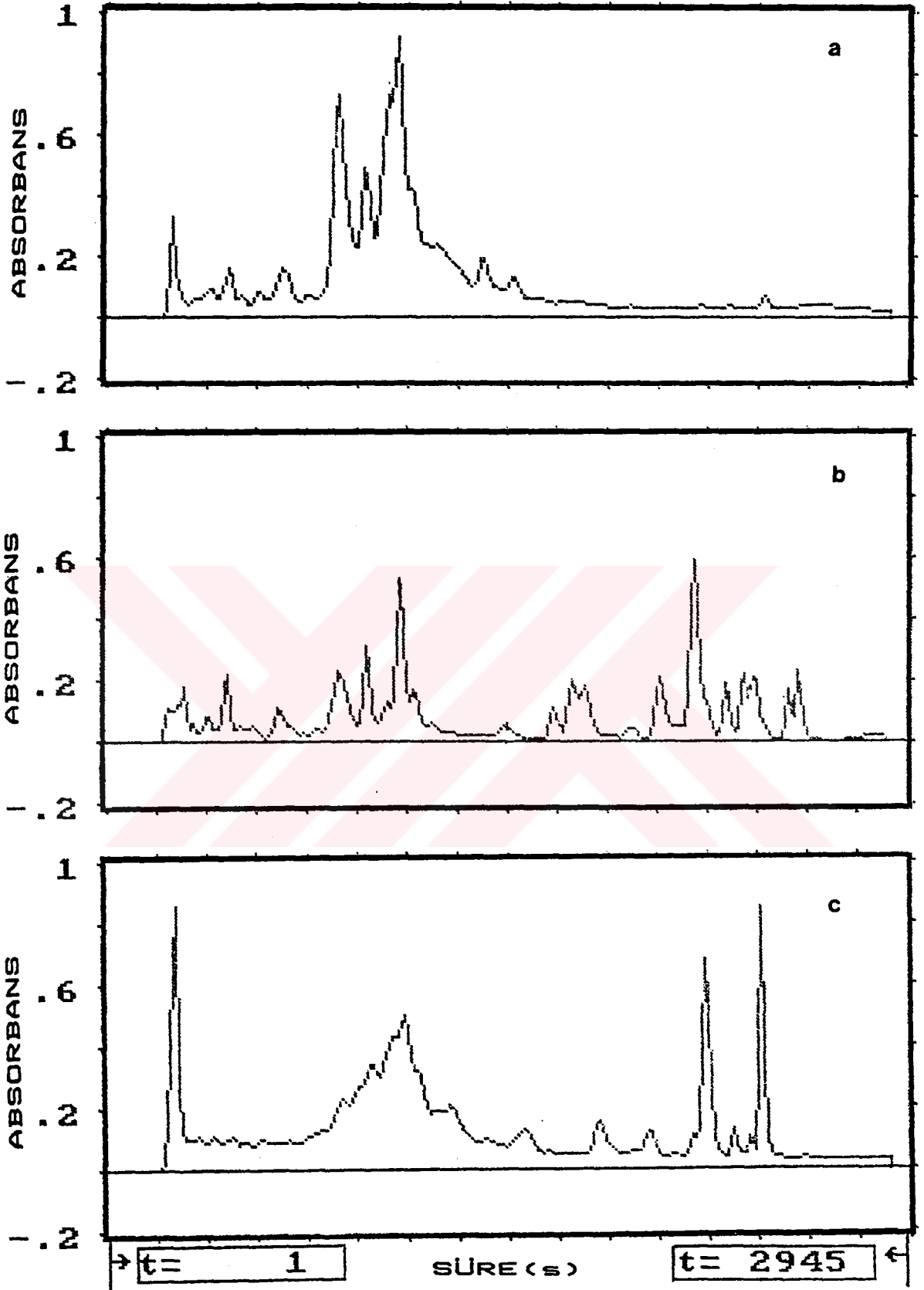
**Şekil 4.13. Vanilin testine ilişkin spektrogram [Asetik asit(a), metanol(b) içeren test çözeltileri ile].**

flavonoid fraksiyonunun prosiyanidinler veya kateşinler olabileceğini göstermektedir. Konuyu aydınlatmak amacıyla daha sonra bu fraksiyonlarda n-butanol-hidroklorik asit testi uygulanmış ve test sonucunda pigmentlerin kromatografik profilinde bir değişiklik gözlenememiştir. Bu durumda ele alınan flavonoidlerin flavan 3-ol'lerin değişik monomer, dimer ve trimerleri oldukları sonucuna varılmıştır. Ancak bu flavonoidlerin bireysel olarak ayrı ayrı tanımlanması bu araştırma ile gerçekleştirilememiştir. Bu konuda ulaşılmış genel bulguların kesin bir tanıya götürülmesi için değişik standartlar kullanılarak çeşitli testlerin yürütülmesi gerekmektedir.

Yürütülmüş bulunan bütün bu analiz sonuçlarına göre *R.damascena* flavonoidlerinin teşhisi yapılmış olanları Tablo 4.9'da gösterilmiş bulunmaktadır.

Tablo 4.9. *R.damascena*'da tanısı yapılmış flavonoidler

| Pik no     | Bileşik                                        |
|------------|------------------------------------------------|
| 1,3-7      | Flavan 3-ol (Daha ileri tanıya gidilememiştir) |
| 8          | Siyanidin 3-5 diglukozit                       |
| 9-13,15    | Flavan 3-ol (Daha ileri tanıya gidilememiştir) |
| 16         | Kuersetin 3-glukozit                           |
| 17         | Kuersetin 3-glukozilgalaktozit                 |
| 18         | Kuersetin 3-arabinozit                         |
| 20         | Kampferol 3-galaktozilarabinozit               |
| 21         | Kampferol 3-glukozilarabinozit                 |
| 23         | Kampferol 3-arabinozit                         |
| 24         | Kampferol 3-ramnozilglukozit                   |
| 25         | Kampferol 3-ramnozilgalaktozit                 |
| 26         | Kampferol 3- rutinozil-7-arabinozit            |
| 2,14,19,22 | Tanısı yapılamamıştır                          |



Şekil 4.14. Gül çeşitlerinin HPLC ile saptanmış flavonoid profilleri [Koyu kırmızı gül(a), R. damascena(b), beyaz gül(c)].

Tabloda gösterilmiş bulunan piklerden 18 nolu olanı saf olarak elde edilememiştir. Ancak bu pikin gerek geliş süresinin, gerekse de HPLC ile elde olunan spektral değerlerinin kuersetin 3-arabinozit standardı ile tamamen eşdeğer olduğu belirlendiğinden bu flavonoidin kuersetin 3-arabinozit'ten başka bir madde olmadığı sonucuna varılmıştır.

Isparta gülünün (*R. damascena*) HPLC ile saptanmış bulunan flavonoid profilinin, diğer bazı gül çeşitlerinin flavonoid profiliyle kıyaslanması amacıyla yapılan deney sonuçlarına ilişkin kromatogramlar Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



## 5-SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Gül yapraklarının üretim döneminin yaklaşık 1 ay kadar olması, yıl boyunca sürdürülecek reçel üretiminde kullanmak amacıyla bu yaprakların muhafazasına uygun bir yöntemin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Bu amaca dönük olarak yürütülmüş bulunan bu araştırmada, halen sürdürülen geleneksel yöntemin yerini alabilecek muhafaza metodları araştırılmış ve tarafımızdan bazı öneriler ortaya konmuştur. Gül yapraklarının bu amaçla muhafazasında renk, en önemli kriter olarak ele alınmış, ve öncelikle rengin korunmasını sağlayacak parametreler incelenmiştir.

Daha önce Tortopoğlu vd (1986) tarafından yapılan bir çalışmada, gül yapraklarının muhafazası amacıyla halen uygulanan geleneksel yöntem incelenmiş, yaprakların kristal şekerle karıştırıldıktan sonra ağzı kapalı kaplar içinde saklandığı belirlenerek, rengin korunması için kaplardaki tepe boşluğunun en az düzeyde tutulması önerilmiştir. Oysa oksijen, gül yapraklarına rengini veren antosiyaninlerin bozunması üzerine etkili olan faktörlerden yalnızca bir tanesi ve belki de en sonuncusudur. Nitekim, oksijenin antosiyaninlerin bozunması üzerindeki etkisinin, ısı, pH, ve enzimler gibi diğer faktörlerin etkisine göre oldukça sınırlı olduğu saptanmıştır (Markakis 1982). Bu nedenle araştırmada, öncelikle ısı-  
nın, pH'in ve enzim inaktivasyonunun antosiyaninin kayıp düzeyi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Yapraklar haşlanarak, diğer enzimler yanında özellikle antosiyaninlerin kaybı ile ilgili olan peroksidaz, fenoloksidaz ve polifenoloksidaz enzimlerinin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Gerek haşlama suyunda, gerekse yapraklara eklenen dolgu sıvısında sitrik asit kullanılarak pH'in bu husustaki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun gibi değişik uygulamalarla hazırlanan yap-

raklar, dondurarak saklanmış ve böylece depolamadaki sıcaklık derecesinin etkileri ortaya konmuştur. Diğer taraftan fenolik maddeler üzerine metal iyonlarının olumsuz etkileri öteden beri bilinmekte olduğundan bu husus da araştırılmıştır. Bu amaçla yapraklar EDTA ilave edilmiş suda haşlanarak, ortamda bulunması muhtemel metal iyonlarının kelat olarak bağlanması yoluna gidilmiştir. Aynı düşüncelerle, yaprakların muhafazasında metal kap kullanılmasından kaçınılmış, örnekler cam kavanozlarda saklanmıştır.

Bilindiği gibi şeker şurubu içinde oksijenin erirliği ve difüzyonu oldukça sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle incelenen bazı muhafaza yöntemlerinde yapraklar şeker şurubu içinde saklanmış ve böylece oksijenin olumsuz etkisi olabildiğince önlenmeye çalışılmıştır.

Diğer taraftan, indirgen özelliği nedeniyle kalayın, antosiyaninlerin rengini açtığı öteden beri bilinmektedir. Buna karşın Sistrunk ve Cash (1970) tarafından çilek pulpu renginin kalay tuzları ile stabilize edilebildiği bildirilmekte olduğundan, gül antosiyaninleri üzerine kalay iyonlarının etkisi de bu araştırmada incelemeye alınmıştır.

Asit özelliği nedeniyle askorbik asit bir taraftan antosiyaninlerin stabilitesi üzerine olumlu etkide bulunurken, diğer taraftan bizzat kendisi bozunmaya uğrayarak hidrojen peroksit oluşumuna neden olmaktadır. Hidrojen peroksit ise renk açıcı bir maddedir (Shirikhande ve Francis 1974). Bu yüzden araştırmada haşlama suyuna askorbik asit eklenerek bu maddenin olumlu ve olumsuz etkileri karşılaştırılmıştır.

İncelenen tüm bu faktörlerden alınan sonuçlara göre, ülkemizde gül yapraklarının muhafazasında halen uygulanan yöntemden daha olumsuz bir muhafaza metodunun söz konusu olamayacağı sonucuna varılmıştır. Gerçekten gele-

neksel yöntemle muhafaza edilen yapraklarda antosiyanin miktarı başlangıç düzeyine göre, daha 6 aylık depolama sonunda % 13'e, 12 ay sonunda ise % 0'a düşmüş bulunduğu saptanmıştır. Buna karşın sitrik asit içeren su içerisinde haşlandıktan sonra dondurularak muhafaza edilen yapraklarda 1 yıl sonra bile antosiyaninin % 70 civarında korunabildiği belirlenmiştir. Ulaşılan bulgular daha önceki araştırmalarla da ortaya konduğu gibi (Lukton vd 1966, Grommeck ve Markakis 1964, Pilferi ve Cultrera 1974, Ebeling ve Montgomery 1990, Segal ve Negutz 1969, Van Buren vd 1968, Siegel vd 1971) sıcaklığın pH derecesinin ve enzimlerin önemli etkilerinin bulunduğunu göstermektedir. Buna göre aşağıda değinilen başlıca sonuçlar ortaya çıkmıştır.

a) Gül yapraklarının muhafazasında, yaprakların kesinlikle haşlanması ve bu yolla enzimlerin inaktive edilmesi zorunludur.

b) Haşlamanın % 0.5-1.0 konsantrasyondaki sitrik asit çözeltisinde yapılması, bu maddenin hem haşlama sırasında, hem de daha sonraki muhafaza aşamasında pH derecesini düşürme bakımından yararlı bulunmaktadır.

c) Haşlama suyuna EDTA eklenmesi ile EDTA'nin metal iyonları ile kelat oluşturması antosiyaninlerin korunmasında önemli rol oynamaktadır.

d) Haşlama suyunda kalay kullanılmasının görünüşte sağlamış olduğu yararın daha çok, yaprakların haşlanmış ve dondurulmuş olmasına dayandığı sanılmaktadır.

e) Yaprakların şeker şurubu içinde muhafaza edilmesinin bir yararı olmadığı, hatta az da olsa olumsuz etkide bulunduğu sonucuna varılmıştır.

f) Haşlama suyuna askorbik asit katılması, sitrik asitte olduğu kadar olumlu sonuç vermemektedir.

g) İncelenen tüm faktörler içinde antosiyaninlerin korunması açısından en etkininin depolama sıcaklığı olduğu belirgin olarak ortaya çıkmıştır.

Bütün bunların incelenmesi sonucunda, gül yapraklarının muhafazasında en uygun yöntemin, yaprakların sitrik asit çözeltisinde haşlanmasıdır. polietilen torbalarda dondurularak saklanması olduğu anlaşılmaktadır.

Diğer taraftan Isparta Gülü'ne özgü rengi veren pigmentin sadece "siyanidin 3-5-diğerlukozit" olduğu HPLC ile yapılan analizler sonucu belirlenmiştir. pH differansiyel metoduyla yapılan kantitatif analiz sonucuna göre, taze yapraklarda bu pigmentin konsantrasyonunun 285 mg/kg düzeyinde bulunduğu saptanmıştır.

Antosiyanin pigmentlerinin pH 1-3 civarında turuncu-kırmızı, pH 4-5'te renksiz ve pH 7-8'de mavi-yeşil renkte olduğu ve bu durumun pigmentlerin değişik pH derecelerinde, değişik formlarda (sırasıyla, flaviliyum, karbinol ve kuinoidal) bulunmasından ileri geldiği bilinmektedir (Wrolstad 1976, Mazza ve Brouillard 1987). Tablo 4.1'de verildiği gibi R. damascena'nın pH'sı 5.92 olarak saptanmıştır. Marousky ve Carlyle (1985) da inceledikleri güllerde pH derecesinin 5.11 ile 5.51 arasında olduğunu bildirmektedirler. Bu bulgulara göre, gül yapraklarının yüksek pH nedeniyle teorik olarak kırmızı veya pembe renkte olmaması gerekirken renkli olmalarının nedeni antosiyaninlerin, diğer flavonoidlerle "kopigment" oluşturması ile açıklanabilmektedir. Örneğin  $2 \times 10^{-3}M$  siyanidin 3-glukozit çözeltisi üzerine renksiz bir bileşik olan (+)kateşinin  $6 \times 10^{-3}M$  lük çözeltisi eklendiğinde spektrofotometrede absorpsiyon maksimum dalga boyunda ölçülen absorbans değerinde %78 oranında artış ortaya çıkmaktadır. Pigment üzerine kateşin yerine aynı yoğunlukta kuersetin 3-galaktozit çözeltisi eklenmesi durumunda bu artış % 282'ye ulaşmaktadır (Asen vd 1972). Aynı şekilde, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan klorojenik asit de değişik pigmentlerde değişik oranlarda absorbans artışına neden olmaktadır (Mazza ve Brouillard 1990). Şekil 4.8 ve Tablo 4.5'de verildiği gibi R. damascena'da bulunan anto-

siyanin, toplam flavonoidlerin ancak % 8'ini oluşturmaktadır. Tarafımızdan analizi yapılan gül yapraklarında yer alan bir çok flavan 3-ol'lere ve flavonollara bağlı olarak yüksek pH'ya rağmen gülün renkli oluşu, çok büyük bir olasılıkla yukarıda sözü edilen "kopigmentasyon" olgusundan kaynaklanmaktadır.

Tarafımızdan önerilmiş bulunan yöntemle göre muhafaza edilecek gül yapraklarından reçel üretilmesi durumunda büyük bir olasılıkla, standartta önerilen vişne suyu katkısına gerek duyulmayacaktır. Ayrıca vişne suyu gül reçelinin renklendirilmesi için uygun bir kaynak değildir. Vişne antosiyaninleri üzerinde yapılmış bulunan araştırmaların (Harborne 1967, Shrikhande ve Francis 1973, Dekazos 1970 ; Timberlake 1981'den) hiçbirinde R. damascena'da yer alan siyanidin 3-5-diglukozite rastlanmamıştır. Hatta, incelenen örneklerde hiç bir 3-5-diglukozite de rastlanmamıştır. Tablo 2.8'de verildiği gibi 3-glukozitlerle, 3-5-diglukozitlerin spektral nitelikleri birbirlerinden oldukça farklıdır. Gül reçelinin mutlaka doğal boyalarla renklendirilmesi isteniyorsa, yapısında yüksek miktarda siyanidin 3-5-diglukozit içeren pigment preparatının kullanılması gereklidir. Ancak bu yönden fazla bir seçenek söz konusu değildir. Çünkü doğadaki antosiyaninlerin % 50'sini siyanidin türevleri oluşturmalarına karşın, 3-5-diglukozitlerin yaygınlığı, 3-glukozitlere oranla 2.5 kat daha azdır ve bunlar arasında da özellikle siyanidin 3-5-diglukozit fazlaca bulunmamaktadır (Timberlake ve Bridle 1982). Ticari antosiyanin preparatlarının incelendiği bir araştırmada ele alınan "elderberry", "blackberry", "blackraspberry" ve "morello-cherry" adlı ürünlerin % 100 oranında siyanidin türevleri içermelerine rağmen bunların hiç birinde 3-5-diglukozite rastlanmamıştır (Hong ve Wrolstad 1990). Bu konuda belki de tek seçenek tatlı patatesten (*Dioscorea alata*) elde edilecek pigmentin kullanılmasıdır. Çünkü Isparta gülünün rengini veren bileşik bu patateslerin temel pigmentini oluşturmaktadır (Rasper ve Coursey 1967; Timberlake ve

Bridle 1982'den). Ancak ülkemizde bu patatesin yetiştirilmesi bir yana hatta hiç tanınmamakta oluşuna ek olarak, bu yol pek ekonomik bir seçenek gibi görünmemektedir.

Bilindiği gibi kuersetin türevleri doğada en yaygın olarak bulunan flavonollardır. Bunu kampferol türevleri izlemektedir. Örneğin, tanınan 255 adet kuersetin türevinin tam bir listesi Harborne ve Williams (1982) tarafından derlenmiş olarak verilmektedir. Bu listeye kısa sürede 94 adet daha kuersetin türevi eklenmiştir (Harborne ve Williams 1988). Bu nedenle R. *damascena*'da tanısı yapılan tüm flavonolların bu iki gruptaki bileşiklerden oluşması büyük bir olasılıkla bu maddelerin doğada gerçekten çok yaygın olmasından kaynaklanmaktadır.

Eşit koşullarda ekstrakte edilen 3 farklı renkteki güllere ilişkin Şekil 4.14'te verilen kromatogramlar bazı irdelemelere olanak vermektedir. Nitekim koyu kırmızı renkli gülde flavonolların miktarının az oluşu, hemen göze çarpmaktadır. Bu duruma rağmen bu gülün renginin son derece koyu oluşu, yapıda yer alan pigmentlerin miktarının yüksekliğinden ve türlerinin farklılığından ileri gelmektedir. Her ne kadar yukarıda kopigmentasyon olayının öneminden söz edilmişse de, renk tonu ve yoğunluğu üzerinde asıl belirleyici faktörün antosiyanin pigmentlerinin cins ve miktarının olduğu burada bir kez daha ortaya çıkmaktadır. Şekil 4.14'ten çıkarılan bir başka sonuç ise, R. *damascena*'da flavan 3-ol'ler olarak tanısı yapılan bazı pikler konusundaki görüşümüzün doğrulanmasıdır. Nitekim bu piklerin hemen hemen tamamı beyaz renkli gülde de yer almaktadır. Bu piklerin ultraviyole spektrumdaki absorbans maksimumları antosiyaninlerle büyük benzerlik göstermesine karşılık bu gülün beyaz renkli olması, piklerin antosiyaninler olmadığını ortaya koymaktadır. Buna göre kırmızı gülün renginin esas olarak antosiyaninler ve flavan 3-ol'lerden, pembe renkli R. *damascena*'nin renginin esas olarak antosiyaninlerden, flavan 3-

ol'ler ve flavonollardan, beyaz gülün kendine özgü beyaz renginin ise flavan 3-ol'ler ve flavonollardan kaynaklandığı anlaşılmaktadır. "Eğer doğada flavonoidler olmasaydı çiçekler yarı saydam olacaktı" görüşü, beyaz renkli bir gülde dahi flavonoidlerin bu kadar yaygın oluşu ile doğrulanmaktadır (Wong 1976).

Flavonoidler üzerinde çalışan araştırmacılar da-  
ima saf halde standartlara gereksinim duyarlar. Bu madde-  
lerden birisi de siyanidin 3-5-diğlukozittir. İşte R. da-  
mascena, siyanidin 3-5-diğlukozitin sağlanması yönünden  
oldukça iyi bir kaynak gibi görünmektedir. Yine R. damas-  
cena kampferol 3-glukozilarabinozit yönünden de oldukça  
zengindir. Bu madde ilaç endüstrisi için gerekli bir bi-  
leşik olduğundan R. damascena' dan bu amaçla yararlanı-  
labileceği bu araştırma ile ortaya konmuş bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- AKAVIA, N. ve STRACK, D., 1980. High Performance Liquid Chromatography of Anthocyanidins as a New Approach to Study Pigment Genetics. Z. Naturforsch. 35c :16-19.
- ANDERSEN, Y. M., 1985. Chromatographic Separation of Anthocyanins in Crowberry (Lingonberry) *Vaccinium vitis-ideae* L. J. Food Sci. 50: 1230-1232.
- ANONYMOUS, 1987. Gül Receli Standardi, TS. 5135, Türk Standardları Enstitüsü. Ankara. 8 s.
- ASEN, S., STEWART, R. N. ve NORRIS, K. H., 1972. Co-pigmentation of Anthocyanins in Plant Tissues and Its Effect on Color. Phytochem. 11: 1139-1144.
- ASEN, S., STEWART, R. N. ve NORRIS, K. H., 1977. Anthocyanin and pH Involved in the colour of "Heavenly Blue" Morning Glory. Phytochem. 16: 1118-1121.
- ASEN, S., STEWART, R. N., NORRIS, K. H. ve MASSIE, D.R., 1970. A Stable Blue Non-metallic Copigment Complex of Delphinin and C-glucosyl flavones in Prof. Blaauw Iris. Phytochem. 9: 619-623.
- BAKKER, J. ve TIMBERLAKE, C. F., 1985. The Distribution of Anthocyanins in Grape Skin Extracts of Port Wine Cultivars as Determined by High Performance Liquid Chromatography. J. Sci. Food Agric. 36: 1315-1324.
- BARBERAN, F. A. T., HARBORNE, J. B. ve SELF, R., 1987. Dimalonated Anthocyanins from the Flowers of *Salvia splendens* and *S. coccinea*. Phytochem. 26: 2759-2760.
- BURDA, S., OLESZEK, W. ve LEE, C. Y., 1990. Phenolic Compounds and Their Changes in Apples during Maturation and Cold Storage. J. Agric. Food Chem. 38: 945-948.
- BUTLER, L. G., PRICE, M. L. ve BROTHERTON, J. E., 1982. Vanillin Assay for Proanthocyanidins (Condensed tannins): Modification of the Solvent for Estimation of the Degree of Polymerization. J. Agric. Food Chem. 30: 1087-1089.

- CASTEELE, K. V., GEIGER, H., LOOSE, R. D. ve SUMERE, C. I. V., 1983. Separation of Some Anthocyanidins, Anthocyanins, Proanthocyanidins and Related Substances by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromat. 259: 291-300.
- CEMEROĞLU, B., 1986. Meyve ve Sebzelerin Bileşimi. "Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi". B.Cemeroğlu ve J.Acar (Ed.ler), Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 6. Ankara. 1-49.
- CEMEROĞLU, B., ARTIK, N. ve VELİOĞLU, Y. S., 1989. Reçel Üretimi Amacıyla Gül Yapraklarının Muhafaza Yöntemleri Üzerinde Araştırmalar. Gıda Sanayii. Cilt 3, Sayı 2: 35, 38-39, 42-45.
- COGIATTI, S., 1986. Simon and Scuhester's Guide to Roses. Simon and Scuhester Inc., New York. 256 s.
- CROCKETT, J. U., 1975. Roses. Time-Life Books. Alexandria, VA. 160 s.
- DAIGLE, D. J. ve CONKERTON, E. J., 1982. High-Performance Liquid Chromatography of 34 Selected Flavonoids. J. Chromat. 240: 202-205.
- DIMOV, N. ve TSOUTSOULOVA, A., 1987. Pattern Recognition Methods for Discrimination of Essential Oils (Rose Oils) by Their Gas Chromatograms. Perfumer and Flavorist 12: 45-50.
- EBELING, P. W. ve MONTGOMERY, M. W., 1990. Strawberry Polyphenoloxidase. Its Role in Anthocyanin Degradation. J. Food Sci. 55: 731-734, 745.
- EL-SAYED, N. H., NORRIS, J. A., AHMED, A. A. ve MABRY, T.J., 1990. Flavonoids of *Brickellia longifolia*. Phytochem. 29: 2364-2365.
- FRANCIS, F. J., 1982. Analysis of Anthocyanins. In: "Anthocyanins as Food Colors". P.Markakis (Ed.), Academic Press, New York. 182-207.
- FRANCIS, F. J., 1985. Pigments and Other Colorants. In: "Food Chemistry". O.R.Fennema (Ed), Marcel Dekker Inc., New York and Basel. 546-582.
- FULEKI, T. ve FRANCIS, F. J., 1968a. Quantitative Methods for Anthocyanins. 1-Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. J. Food Sci. 33: 72-77.
- FULEKI, T. ve FRANCIS, F. J., 1968b. Quantitative Methods for Anthocyanins. 2-Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. J. Food Sci. 33: 78-83.

- GEISSMAN, T.A., 1962. The Chemistry of Flavonoid Compounds. Pergamon Press. New York. 255 s.
- GOTO, T., KONDO, T., TAMURA, H., KAWAHORI, K. ve HATTORI, H., 1983. Structure of Platyconin, a Diacylated Anthocyanin Isolated from the Chinese-Bell Flower *Platycodon grandiflorum*. Tetrahedron Letters 24: 2181-2184.
- GROMMECK, R. ve MARKAKIS, P., 1964. The Effect of Peroxidase on Anthocyanin Pigments. J. Food Sci. 29: 53-57.
- HALE, M. L., FRANCIS, F. J. ve FAGERSON, I. S., 1986. Detection of Enocyanin in Cranberry Juice Cocktail by HPLC Anthocyanin Profile. J. Food Sci. 51: 1513-1515.
- HARBORNE, J. B., 1967. Comparative Biochemistry of Flavonoids. Academic Press, New York. 383 s.
- HARBORNE, J. B. ve WILLIAMS, C. A., 1982. Flavone and Flavonol Glycosides. In "The Flavonoids, Advances in Research" J. B. Harborne ve T. J. Mabry (Ed.ler). Chapman and Hall, London, New York. 261-311.
- HARBORNE, J. B. ve WILLIAMS, C. A., 1988. Flavone and Flavonol Glycosides. In "The Flavonoids, Advances in Research Since 1980". J. B. Harborne (Ed.). Chapman and Hall, London, New York. 303-328.
- HARBORNE, J. B. ve GRAYER, R. J., 1988. The Anthocyanins. In "The Flavonoids, Advances in Research Since 1980". J. B. Harborne (Ed.). Chapman and Hall, London, New York. 1-20.
- HARING, P. A., 1986. Modern Roses. The International Checklist of Roses In Cultivation or of Historical or Botanical Importance. The American Rose Society, Shreveport, LO. 402 s.
- HONG, V. ve WROLSTAD, R. E., 1990. Characterization of Anthocyanin-Containing Colorants and Fruit Juices by HPLC/Photodiode Array Detection. J. Agric. Food. Chem. 38: 698-708.
- HORWITZ, W., 1970. Official Methods of Analysis of the AOAC Association of Official Analysis Chemists. Washington. 1015 s.
- HOSHINO, T., MATSUMOTO, U. ve GOTO, T., 1980. The Stabilizing Effect of the Acyl Group on the Co-pigmentation of Acylated Anthocyanins With C-glucosylflavones. Phytochem. 19: 663-668.

- HOSHINO, T., MATSUMOTO, U. ve GOTO, T., 1981. Self-Association of Some Anthocyanins in Neutral Aqueous Solutions. *Phytochem.* 20: 1971-1975.
- JAWORSKI, A. W. ve LEE, C. Y., 1987. Fractionation and HPLC Determination of Grape Phenolics. *J. Agric. Food. Chem.* 35: 257-259.
- KACAR, B., 1972. Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri. II-Bitki Analizleri. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 453, Uygulama Kılavuzu No: 155. Ankara. 646 s.
- KIM, J. H., NONAKA, G. I., FUJIEDA, K. ve UEMOTO, S., 1989. Anthocyanidin Malonylglucosides in Flowers of *Hibiscus syriacus*. *Phytochem.* 28: 1503-1506.
- KIRKLAND, J. J., 1971. Modern Practice of Liquid Chromatography. Wiley-Interscience, a Division of John Wiley and Sons Inc., New York. 179 s.
- KRUSSMANN, G., 1981. The Complete Book of Roses. Timber Press, Portland, OR. 436 s.
- LINDLEY, J., 1979. Rosarium Monographia or A Botanical History of Roses. E. M. Coleman Publisher. Standfordville, New York. 155 s.
- LUKTON, A., CHICHESTER, C.O. ve MACKINNEY, G., 1966. The Breakdown of Strawberry Anthocyanin Pigment. *Food Tech.* 10: 427-432.
- MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. ve THOMAS, M. B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Verlag, New York. 354 s.
- MARKAKIS, P., 1982. Stability of Anthocyanins in Foods. In: "Anthocyanins as Food Colors". P.Markakis (Ed.), Academic Press, New York. 163-180.
- MARKHAM, K. R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. London, New York, Paris. 113 s.
- MARKHAM, K. R. ve GIVEN, D. R., 1988. The Major Flavonoids of an Antarctic byrum. *Phytochem.* 27: 2843-2845.
- MAROUSKY, F. J. ve CARLYLE, T. C., 1985. Postharvest Color Changes in Red Rose Petals. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 137-139.
- MAZZA, G., 1986. Anthocyanins and Other Phenolic Compounds of Saskatoon Berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *J. Food Sci.* 51: 260-1264.

- MAZZA, G. ve BROUILLARD, R., 1987. Recent Developments in the Stabilization of Anthocyanins in Food Products. *Food Chem.* 25: 207-225.
- MAZZA, G. ve BROUILLARD, R., 1990. The Mechanism of Co-pigmentation of Anthocyanins in Aqueous Solutions. *Phytochem.* 29: 1097-1102.
- MAZZA, G. ve VELİOĞLU, Y. S., 1990. Anthocyanins and Other Phenolic Compounds in Fruits of Red-Flesh Apples. *Food Chem.* (Baskıda).
- MORRIS, J. R., SISTRUNK, W. A., NELSON, G. S., SPAYD, S. E. ve CAWTHON, D. L., 1980. Quality of Mechanically Harvested Strawberries for Processing. *Station Bull. Agr. Exp. Sta. Oregon State Univ.* 645: 144-149.
- OKUR, M., 1989. Tübitak Araştırma Grubu Üyelerine Gülbirlik Hakkında Özel Not. Isparta. (Basılmamış).
- OLESZEK, W., LEE, C. Y., JAWORSKI, A. W. ve PRICE, K. R., 1988. Identification of Some Phenolic Compounds in Apples. *J. Agric. Food Chem.* 36: 430-432.
- OLESZEK, W., LEE, C. Y. ve PRICE, K. R., 1989. Apple Phenolics and Their Contribution to Enzymatic Browning Reactions. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* 58: 273-283.
- PILFERI, P. G. ve CULTRERA, R., 1974. Enzymatic Degradation of Anthocyanin: The Role of Sweet Cherry Poliphenol Oxidase. *J. Food Sci.* 39: 786-791.
- PORTER, L. J., HRSTICH, L. N. ve CHAN, B. G., 1986. The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin. *Phytochem.* 25: 223-230.
- POUGET, M. P., VENNAT, B., LEJEUNE, B. ve POURRAT, A., 1990. Identification of Anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. *Lebens.-Wiss. u.-Technol.* 23: 101-102.
- PUTMAN, L. J. ve BUTLER, L. G., 1989. Separation of High Molecular Sorghum Procyanidins by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 37: 943-946.
- REGNEL, C. J., 1976. İşlenmiş Sebze ve Meyvelerin Kalite Kontrolü ile İlgili Analitik Metodlar. Bursa Gıda Kontrol Eğitim ve Araştırma Enstitüsü Yayınları No: 2. Bursa. 156 s.

- SAITO, N., OSAWA, Y. ve HAYASHI, K., 1971. Platyconin, a New Acylated Anthocyanin in Chinese Bell-Flower, *Platycodon grandiflorum*. *Phytochem.* 10: 445-446.
- SAITO, N., OSAWA, Y. ve HAYASHI, K., 1972. Isolation of a Blue-violet Pigment from the Flowers of *Platycodon grandiflorum*. *Bot. Mag. Tokyo*, 85: 105. *Chem. Abs.* 77, 149733.
- SCHOLEY, J., 1973. Suitability of Fruit for Jam Manufacture. *Food Manufacture.* 48: 19-20.
- SCHRAM, A. W., JONNISON, L. M. V. ve VLAMING, P., 1983. Identification of Anthocyanins and Intermediates of Anthocyanin Biosynthesis from *Petunia hybrida* Using High Performance Liquid Chromatography. *Z. Naturforsch.* 38c: 342-345.
- SCHWARTZ, S. J. ve von ELBE, J. H., 1982. High Performance Liquid Chromatography of Plant Pigments A-Review. *J. Liquid Chromat.* 5: 43-73.
- SEGAL, B. ve NEGUTZ, G., 1969. The Thermal Degradation of Keracyanin. *Die Nahrung* 13: 531.
- SEIKEL, M. K., 1964. Isolation and Identification of Phenolic Compounds in Biological Materials. In "Biochemistry of Phenolic Compounds. J.B. Harborne (Ed.). Academic Press. London and New York. 33-76.
- SIEGEL, A., MARKAKIS, P. ve BEDFORD, C. L., 1971. Stabilization of Anthocyanins in Frozen Tart Cherries by Blanching. *J. Food Sci.* 36: 904-906.
- SIEWEK, F. ve GALENSA, R., 1984. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of the Degree of Glycosidation of Flavonols by Use of an Ultra-violet Diode-array Detector. *J. Chromat.* 294: 385-389.
- SKREDE, G., 1980. Strawberry Varieties for Industrial Jam Production. *J. Sci. Food Agric.* 31: 670-676.
- SPAYD, S. E. ve MORRIS, J. R., 1981a. Influence of Immature Fruits on Strawberry Jam Quality and Storage Stability. *J. Food Sci.* 46: 414-418.
- SPAYD, S. E. ve MORRIS, J. R., 1981b. Use of Immature Fruits in Strawberry Jam. *Arkansas Farm Res.* 30: 14.
- STAFFORD, H. A., 1988. Proanthocyanidins and Lignin Connection. *Phytochem.* 27: 1-6.

- STRACK, D. ve WRAY, V., 1989. Anthocyanins. In" Methods in Plant Biochemistry, Vol 1: Plant Phenolics." J.B. Harborne (Vol. Ed.) Academic Press. New York. 324-356.
- STRACK, D., AKAVIA, N. ve REZNIK, H., 1980. High Performance Liquid Chromatographic Identification of Anthocyanins. Z. Naturforsch. 35 c: 533-538.
- SWAIN, T., 1976 a. Nature and Properties of Flavonoids. In:"Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol 1". T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press. London, New York, San Francisco. 425-463.
- SWAIN, T., 1976 b. Analytic Methods of Flavonoids. In:"Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol 2". T.W. Goodwin (Ed.), Academic Press. London, New York, San Francisco. 166-205.
- TAKEDA, K., HARBORNE, J. B. ve SELF, R., 1986a. Identification of Malonated Anthocyanins in the Liliaceae and Labiatae. Phytochem. 25: 2191-2192.
- TAKEDA, K., HARBORNE, J. B. ve SELF, R., 1986b. Identification and Distribution of Malonated Anthocyanins in Plants of the Compositae. Phytochem. 25: 1337-1342.
- TAKEDA, K., FISCHER, D. ve GRISEBACH, H., 1988. Anthocyanin Composition of *Sinapis alba*, Light Induction of Enzymes and Biosynthesis. Phytochem. 27: 1351-1353.
- TAKEDA, K., ENOKI, S., HARBORNE, J. B. ve EAGLES, J., 1989. Malonated Anthocyanins in Malvaceae: Malonylmalvin from *Malva sylvestris*. Phytochem. 28: 499-500.
- TAKEDA, K., YAMASHITA, T., TAKAHASHI, A. ve TIMBERLAKE, C. F., 1990. Stable Blue Complexes of Anthocyanin-Aluminium 3-p-coumaroyl-or 3-caffeoyl-quinic acid Involved in the Blueing of *Hydrangea* flower. Phytochem. 29: 1089-1091.
- TERAHARA, N. ve YAMAGUCHI, M., 1986. H-NMR Spectral Analysis of the Malylated Anthocyanins from *dianthus*. Phytochem. 25: 2906-2907.
- TERAHARA, N., YAMAGUCHI, M., TAKEDA, K., HARBORNE, J. B. ve SELF, R., 1986. Anthocyanins Acylated with Malic Acid in *Dianthus caryophyllus* and *D. deltoides*. Phytochem. 25: 1715-1717.

- TERAHARA, N., SHIOJI, T., TOKI, K., SAITO, N. ve HONDA, T., 1989. Malonylated Anthocyanins in *Verbena* Flowers. *Phytochem.* 28: 1507-1508.
- TERAHARA, N., SAITO, N., HONDA, T., TOKI, K. ve OSAJIMA, Y., 1990. Acylated Anthocyanins of *Clitoria ternatea* and their Acyl Moieties. *Phytochem.* 29: 949-953.
- TIMBERLAKE, C. F., 1981. Anthocyanins in Fruits and Vegetables. In: "Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables". J. Friend ve M. J. C. Rhodes (Ed.), Academic Press. London, New York, Toronto, 221-247.
- TIMBERLAKE, C. F. ve BRIDLE, P., 1982. Distribution of Anthocyanins in Food Plants. In: "Anthocyanins as Food Colors". P. Markakis (Ed.), Academic Press, New York. 126-162.
- TORRES, A. M., LASTOVICKA, T. M. ve REZAAIYAN, R., 1987. Total Phenolics and High-Performance Liquid Chromatography of Phenolic Acids of Avocado. *J. Agric. Food Chem.* 35: 921-925.
- TORTOPOĞLU, M. İ., ADA, Ş., ve KARAKOYUNLU, F., 1986. En Uygun Gül Mayası Üretim Yönteminin Araştırılması. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Isparta Gıda Kont. Araş. Ens. (Basılmamış proje sonuç raporu).
- VAN BUREN, J. P., BERTINO, J. J. ve ROBINSON, W. B., 1968. The Stability Wine Anthocyanins on Exposure to Heat and Light. *Am. J. Enol. Vitic.* 19: 147-154.
- WALD, B., GALENSA, R., HERRMANN, K., GROTHJAHN, L. ve WRAY, V., 1986. Quercetin 3-O-[6''-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)- $\beta$ -galactoside] from Blackberries. *Phytochem.* 25: 2904-2905.
- WONG, E., 1976. Biosynthesis of Flavonoids. In: "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol 1". T. W. Goodwin (Ed.), Academic Press. London, New York, San Francisco. 464-521.
- WROLSTAD, R. E., 1976. Color and Pigment Analysis in Fruit Products. Bull. No: 624. Oregon Agr. Exp. Sta. Corvallis, OR. 17 s.
- WULF, L. W. ve NAGEL, C. V., 1976. Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids by High-Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromat.* 116: 271-279.

WULF, L. W. ve NAGEL, C. V., 1978. High Pressure Liquid Chromatographic Separation of Anthocyanins of *Vitis vinifera*. Am. J. Enol. Vitic. 29: 42-49

YOSHITAMA, K., 1978. Blue and Purple Anthocyanins Isolated from the Flowers of *Tredescantia reflexa*. Bot. Mag. Tokyo 91: 1023-1025. Chem Abs. 90, 3133.

YOSHITAMA, K., 1981. Caffeic Acid 4-Glucoside as the Acyl Moiety of the *Senecio cruentus* Anthocyanin. Phytochem. 20: 186-187.

YOSHITAMA, K. ve ABE, K., 1977. Chromatographic and Spectral Characterization of 3'-glycosylation in Anthocyanidins. Phytochem. 16: 591-592.