

**ZEYNEP BUŞRA
ABDİİMAMOĞLU**

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS)

ARONYA İÇEREN GIDA TAKVİYELERİNDE BULUNAN
MAJÖR BİLEŞİKLERİN HPLC İLE EŞZAMANLI
ANALİZİ

ZEYNEP BÜŞRA ABDİİMAMOĞLU

DANIŞMAN
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ GAMZE ERGİN KIZILÇAY

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN



İTHAF



Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her anında bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden, son ana kadar desteğiyle yanımda olarak beni yüreklendiren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sevgili danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gamze ERGİN KIZILÇAY'a;

Çalışmam sırasında her konuda fikir ve yardımlarıyla destek olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Sıdika ERTÜRK TOKER, Prof. Dr. Armağan ÖNAL ve Doç. Dr. Pelin KÖSEOĞLU YILMAZ'a;

Ve hayatımın her anında yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aronya Bitkisi.....	3
2.1.1. Aronya Bitkisi Botanik Özellikleri	3
2.1.2. Aronya Kimyasal İçeriği.....	4
2.1.2.1. Siyanidin-3-galaktozit.....	4
2.1.2.2. Siyanidin-3-glukozit.....	5
2.1.2.3. Siyanidin-3-arabinozit.....	5
2.1.3. Aronya ve İnsan Sağlığına Etkileri	5
2.1.4. Biyoyararlanımı	6
2.1.5. Aronya Kullanım Alanları	6
2.1.6. Aronya Besin Değeri.....	7
2.1.7. Analiz Yöntemleri.....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Alet ve Diğer Gereçler.....	34
3.1.1. Kimyasal Maddeler	34
3.1.2. Aletler ve Diğer Gereçler	34
3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	35
3.2.1. Stok Standart Çözeltileri	35
3.2.1.1. Siyanidin-3-Arabinozit ve Siyanidin-3-Galaktozit Standart Çözeltileri	35
3.2.1.2. Siyanidin-3-Glukozit Standart Çözeltileri.....	36

3.2.2. % 0,1 HCl MeOH Ekstraksiyon Çözeltisi	36
3.2.3. Mobil Fazlar	36
3.2.4. Numunelerin Hazırlanması	36
3.2.4.1. Aronya Kurusu	36
3.2.4.2. Liyofilize Aronya	37
3.2.4.3. Aronya Suyu.....	37
3.2.4.4. Aronya Kurusu Etanol Özütü	37
3.3. Analitik Metodun Geliştirilmesi için HPLC ile Yapılan Çalışmalar	37
3.3.1. Kolon, Kolon Sıcaklığı, Akış Hızı, Mobil Faz Bileşimi, Dalga Boyları ve Hassasiyet Seçimi	37
3.3.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	37
3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	38
3.4.1. Seçicilik.....	38
3.4.2. Aralık ve Doğrusallık.....	38
3.4.3. Doğruluk	39
3.4.4. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	39
3.4.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	39
3.4.6. Stabilite	39
3.4.7. Sağlamlık	40
3.5. Aronya İçeren Gıda Takviyelerinde Siyanidin-3-arabinozit, Siyanidin-3-galaktozit ve Siyanidin-3-glukozit Bileşiklerinin HPLC ile Analizi	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Analitik Metodun Geliştirilmesi için HPLC ile Yapılan Çalışmalar	41
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	41
4.1.2. Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi.....	42
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	46
4.2.1. Seçicilik.....	46
4.2.2. Aralık ve Doğrusallık.....	48
4.2.3. Doğruluk	48
4.2.4. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)	50
4.2.5. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	50
4.2.6. Stabilite	50
4.2.7. Sağlamlık	51

4.3. Aronya İçeren Gıda Takviyelerinde Siyanidin-3-arabinozit, Siyanidin-3-galaktozit ve Siyanidin-3-glukozit Bileşiklerinin HPLC ile Analizi	52
5. TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	64



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4.1: Mobil faz gradient sistemi	41
Tablo 4.2: Siyanidin-3-galaktozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler	42
Tablo 4.3: Tablo 4.2'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	43
Tablo 4.4: Siyanidin-3-glukozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler	44
Tablo 4.5: Tablo 4.4'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	44
Tablo 4.6: Siyanidin-3-arabinozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler	45
Tablo 4.7: Tablo 4.6'daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler	46
Tablo 4.8: Aronya kurusu numunesinde yapılan doğruluk çalışması sonuçları	49
Tablo 4.9: Aronya suyu numunesinde yapılan doğruluk çalışması sonuçları	49
Tablo 4.10: Yöntemin tekrarlanabilirliği	50
Tablo 4.11: Standart çözeltiye ait stabilite sonuçları	51
Tablo 4.12: Akış hızı değişikliklerinin yöntem üzerine etkileri	51
Tablo 4.13: Kolon fırın sıcaklığı değişikliklerinin yöntem üzerine etkileri	52
Tablo 4.14: Aronya içeren gıda takviyelerinin analiz sonuçları	53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Siyanidin-3-galaktozitin kimyasal formülü.....	4
Şekil 2.2: Siyanidin-3-glukozitin kimyasal formülü.....	5
Şekil 2.3: Siyanidin-3-arabinozitin kimyasal formülü.....	5
Şekil 4.1: Siyanidin-3-galaktozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 2,5-12,5 µg/mL).....	43
Şekil 4.2: Siyanidin-3-glukozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 0,25-4,0 µg/mL).....	45
Şekil 4.3: Siyanidin-3-arabinozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 2,5-12,5 µg/mL).....	46
Şekil 4.4: Mobil faz çözeltisine ait kromatogram.....	47
Şekil 4.5: Siyanidin-3-galaktozit (7,5 µg/ml), siyanidin-3-glukozit (1,0 µg/ml) ve siyanidin-3-arabinozite (7,5 µg/ml) ait kromatogram	47
Şekil 4.6: Aronya Kurusu numunesine ait kromatogram	47
Şekil 4.7: Liyofilize Aronya numunesine ait kromatogram	48
Şekil 4.8: Aronya Suyu numunesine ait kromatogram	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

C_{maks}: Maksimum Plazma Konsantrasyonu

AUC_{0-t}: Sıfırdan “t” Zamana Kadar Olan Plazma Konsantrasyonu Zaman Eğrisi Altında Kalan Alan

AUC_{0-∞}: Sıfırdan Sonsuza Kadar Plazma Konsantrasyonu Zaman Eğrisi Altında Kalan Alan

T_{maks}: C_{maks}’a Ulaşma Zamanı

t_{1/2}: Eliminasyon Yarı Ömrü

LOD: Gözlenebilme Sınırı

LOQ: Tayin Sınırı

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

RME: Bağlı Ortalama Hata

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UHPLC: Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

MS: Kütle Spektrometrik

LC-MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografik

LC/ES-MS: Sıvı Kromatografisi/ Elektrosprey- Kütle Spektrometresi

ICP-OES: İndüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi

GC/MS: Gaz Kromatografisi/ Kütle Spektrometresi

SMB: Simüle Hareketli Yatak Kromatografisi

UV: Ultraviyole

DAD: Diyot Serili Dedektör

RI: Kırılma İndisi Dedektörü

ELSD: Buharlaştırıcı Işık Saçılma Dedektörü

QTOF: Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi

ESI: Elektrosprey iyonizasyon

ACN: Asetonitril

MeOH: Metanol

mg GAE/g KM = gram kuru ağırlık başına miligram gallik asit eşdeğeri

FRAP: Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi

DPPH: 1,1-Difenil-2-Pikril-Hidrazil

LAB: Laktik Asit Bakterisi

ORAC: Oksijen Radikal Absorbans Papasitesi

TEAC: Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite

ABTS: Antioksidan Aktivite Tayini

TFA: Trifloroasetik asit

NADES: Doğal Derin Ötektik Çözücü

UMAE-NADES: Ultrasonik-Mikrodalga Destekli Doğal Derin Ötektik Çözücü

HUVEC: İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri

ÖZET

Abdiimamoğlu ZB. (2024). Aronya İçeren Gıda Takviyelerinde Bulunan Majör Bileşiklerin HPLC ile Eşzamanlı Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Aronia melanocarpa meyvesi zengin antioksidan aktivitesi ve yüksek biyoaktif bileşik içeriğinden dolayı sağlıklı beslenmenin değerli bir bileşenidir. Son zamanlar aronyaya artan ilgi nedeniyle birçok gıda ürünü ve gıda takviyeleri ortaya çıkmıştır.

Bu tez çalışmasında, aronya içeriğindeki antosiyaninlerden siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-arabinozit ve siyanidin-3-glukozitin yan yana miktar tayinine imkan sağlayan bir sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiş ve ICH Q2 (R1) kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde üç etken maddenin yan yana analizi Phenomenex, Gemini C18, (5µm, 150 x 4,6mm) kolonda ve 30°C’de gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak %1 glasiyel asetik asit:ACN:fosforik asit (510:485:5) (h:h:h) ve %0,5 fosforik asit çözeltileri kullanılmış ve 0,8 mL/dk akış hızında gradient sistem uygulanmıştır. Siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-arabinozit 2,5-12,5 µg/mL; siyanidin-3-glukozit 0,25-4,0 µg/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal olarak bulunmuştur ($r>0,99$). Geliştirilen ve valide edilen yöntem aronya içeren numunelerin analizlerinde başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Siyanidin-3-galaktozit, Siyanidin-3-glukozit, Siyanidin-3-arabinozit, Aronya, HPLC

ABSTRACT

Abdiimamoğlu ZB. (2024). Simultaneous Analysis of Major Compounds in Aronia-Containing Food Supplements by HPLC. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry Master Thesis. İstanbul.

Aronia melanocarpa fruit is a valuable component of a healthy diet due to its rich antioxidant activity and high content of bioactive compounds. Recently, many food products and food supplements have emerged due to the increasing interest in aronia.

In this thesis, a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of the anthocyanins cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-arabinoside and cyanidin-3-glucoside in aronia was developed and validated according to ICH Q2 (R1) guidelines. In this HPLC system, the simultaneous analysis of the three active substances was performed on a Phenomenex, Gemini C18, (5µm, 150 x 4.6mm) column at 30°C. As mobile phase, 1% glacial acetic acid:ACN:phosphoric acid (510:485:5) (h:h:h) and 0.5% phosphoric acid solutions were used and a gradient system was applied at a flow rate of 0.8 mL/min. Cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-arabinoside were found linearly in the concentration ranges 2.5-12.5 µg/mL and cyanidin-3-glucoside 0.25-4.0 µg/mL ($r>0.99$). The developed and validated method was successfully applied to the analysis of samples containing aronia.

Key Words: Cyanidin-3-galactoside, Cyanidin-3-glucoside, Cyanidin-3-arabinoside, Aronia, HPLC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antosiyaninlerin ve bunları içeren ilgili doğal kaynakların tedavi edici faydası, endüstride antosiyaninler üzerinde standartlaştırılmış ürünler oluşturmaya yönelik ilginin artmasına neden olmuştur. Bu tür faydalı antosiyaninlerin sağlanması için en önemli adaylardan bazıları yaban mersini, mürver, aronya ve vişnedir [1].

Aronya; gülgiller (rosaceae) familyasından çalı türünde olan bir bitkidir. Bu bitkinin türüne bağlı olarak siyah, mor ve kırmızı tonlarında üzüksü meyveleri bulunmaktadır. Ülkemizde kuş kirazı adıyla da bilinen aronya İngilizce’de de ‘Chokeberry’ olarak tanımlanmıştır [2].

Anavatanı Kuzey Amerika’nın doğu bölgeleri olan bu bitkinin ülkemizdeki ilk çalışmaları 2012 yılında Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü’nde fidan üretimi ile başlamış ve deneme alanında plantasyon oluşturulmuştur [3]. Ülkemizde Kırklareli, Bursa, Manisa, Kırşehir, Giresun, Trabzon, Ankara, İstanbul, İzmir, Ordu, Antalya, Bolu, Sakarya, Çorum, Amasya, Tekirdağ, Samsun, Çanakkale, Yalova, Ordu olmak üzere 20 şehirde aronya bahçeleri kurulmuştur [3].

Genel olarak cinsin *Aronia melanocarpa* (L.) Elliot (siyah kuş kirazı, siyah aronya), *Aronia arbutifolia* (Michx.) Elliot (kırmızı kuş kirazı, kırmızı aronya) ve *Aronia prunifolia* (mor kuş kirazı, mor aronya) olmak üzere üç tür içerdiği kabul edilir [4-6].

Siyah aronya polifenoller açısından zengindir, esas olarak proantosiyaninler, antosiyaninler, fenolik asitler ve flavonoidler içerir [7]. Antosiyaninler toplam aronya fenollerinin yaklaşık %25’ini temsil eder ve siyanidin 3-glukozit, siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-ksilozit, siyanidin-3-arabinozit, pelargonidin-3-galaktozit ve pelargonidin-3-arabinozit içerir [8]. Siyanidinler, toplam aronya antosiyaninlerinin yaklaşık %99’unu oluşturur. %65,6’ı siyanidin-3-O-galaktozit, %28,3’ü siyanidin-3-O-arabinozit, %3,2’si siyanidin-3-O-ksilozit ve %2,9’u siyanidin-3-O-glukozittir [9].

Aronia melanocarpa meyvelerinden elde edilen ekstratler ve bileşikler, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, anti-aging, antimikrobiyal, antiviral, antidiyabetik, antiaterosklerotik, anti-adipojenik, lipit düşürücü, antimutajenik, hipotansif, hepatoprotektif, gastroprotektif, nöroprotektif ve kardiyoprotektif özellikte olduğu vurgulanmaktadır [6, 10].

İnsan sağlığına olan birçok etkisinin olması aronyaya olan ilgiyi arttırmış ve aronya içeren birçok ürün bulunmaktadır. Aronya meyvesini içeren meyve suyu, reçel, marmalet, aronya kurusu, liyofilize aronya, bitkisel kapsül, efervesan tablet, sirke gibi gıda ürünü ve gıda takviyeleri mevcuttur. Toplam aronya fenollerinin yaklaşık %25'ini antosiyaninler oluşturduğundan dolayı aronya içeriğinin major bileşiklerinden olan siyanidin-3-O-galaktozit, siyanidin-3-O-arabinozit ve siyanidin-3-O-glukozitin miktar tayini önem kazanmaktadır.

Bu tez çalışmasında, aronyanın major bileşiklerinden olan siyanidin-3-O-galaktozit, siyanidin-3-O-arabinozit ve siyanidin-3-O-glukozitin yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile diyot serili dedektör kullanılarak yan yana analizine imkan veren bir metod geliştirilmesi ve ICH Q2 (R1) “Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodolojisi” [11] kılavuzuna göre valide edilmesi planlanmıştır. Geliştirilen yöntem Kırklareli'nin Vize Köyü'nde yetiştirilen aronyo meyvesinin piyasada ticari olarak bulunan çeşitli ürünlerinin analizlerine uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Aronya Bitkisi

Aronya; familyası gülgiller (rosaceae), cins adı aronya olan çalı türünde bir bitkidir. Bu bitkinin türüne bağlı olarak siyah, mor ve kırmızı tonlarında üzüksü meyveleri bulunmaktadır. Ülkemizde kuş kirazı adıyla da bilinen aronya İngilizce’de de ‘Chokeberry’ olarak tanımlanmıştır [2].

Anavatanı Kuzey Amerika’nın doğu bölgeleri olan bu bitki ilk olarak Kızılderili bir kabile olan Potavatomiler (Patawatomy) tarafından yiyecek ve soğuk algınlığı tedavilerinde kullanılmıştır.

1900’lü yıllarda bitki Rusya, Polonya, Almanya, İsveç, Norveç ve Finlandiya gibi bazı Avrupa ülkelerine ve 1976’da Japonya’ya tanıtılmıştır [10, 12].

İlk çalışmalar 2012 yılında ülkemizde aronya yetiştiriciliği ile başlamıştır. Konu ile ilgili olarak fidan üretimi Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü’nde başlamış ve deneme alanında plantasyon oluşturulmuştur. İlk hasat şenliği Enstitü’de 2017 yılında düzenlenmiştir. Bu şenlikte birlikte meyvenin tanıtım ve yayım çalışmalarına başlanılmıştır [3].

2.1.1. Aronya Bitkisi Botanik Özellikleri

Aronya bitkisi çok yıllık ve çalı formunda bir üzüksü meyve türü olup kışın yaprağını dökmektedir. Yapraklar oval şekilli, sivri uçlu ve kenarları ince dişlidir. Yaprakların üst yüzeyi koyu yeşil renkli, alt yüzeyi ise açık yeşil renkte ve tüylüdür. Bitki boyu 2,0-2,5 metreye kadar ulaşabilmektedir. Oldukça uzun ömürlü bir türdür [3].

Genel olarak cinsin üç tür içerdiği kabul edilir: *Aronia melanocarpa* (L.) Elliot (siyah kuş kirazı, siyah aronya), *Aronia arbutifolia* (Michx.) Elliot (kırmızı kuş kirazı, kırmızı aronya) ve *Aronia prunifolia* (mor kuş kirazı, mor aronya). Üç tür arasındaki morfolojik ve fenolojik özelliklere dayanarak *Aronia prunifolia*’nın *Aronia arbutifolia* ve *Aronia melanocarpa* arasında türler arası bir melez olabileceğini düşündürmektedir. Bunlara ek olarak *Aronia* ile *Sorbus* cinsleri arasında *Aronia mitschurinii* isimli, iri meyveli dördüncü bir tür daha tanımlanmıştır [4-6].

En popüler çeşitler Nero ve Viking’dir, onları Aron, Hugin, Rubina ve Kurkumäcki izler. Norveç’te ‘Moskva’ çeşidi en yaygın olanıdır. Aronya, mayıs ayında beyaz çiçekler açarak yaz ortasından sonbaharın sonlarına kadar meyve verebilir. Bu

meyveler 6 ila 13 mm çapında, 0,5 ila 2,0 g ağırlığındadır ve 1 ila 5 tohum içerir. Meyve üretimi için kullanılan çeşitler *Aronia melanocarpa* türündendir (örneğin meyveler meyve suyu, reçel ve şarap üretiminde kullanılır) [2, 13].

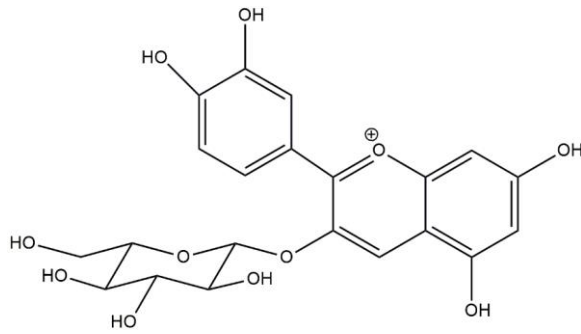
2.1.2. Aronya Kimyasal İçeriği

Siyah aronya polifenoller açısından zengindir, esas olarak proantosiyantinler, antosiyantinler, fenolik asitler ve flavonoidler içerir [7].

Antosiyantinler toplam aronya fenollerinin yaklaşık %25'ini temsil eder ve siyanidin 3-glukozit, siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-ksilozit, siyanidin-3-arabinozit, pelargonidin-3-galaktozit ve pelargonidin-3-arabinozit içerir [8].

Siyanidinler, toplam aronya antosiyantinlerinin yaklaşık %99'unu oluşturur. %65,6'I siyanidin-3-O-galaktozit, %28,3'ü siyanidin-3-O-arabinozit, %3,2'si siyanidin-3-O-ksilozit ve %2,9'u siyanidin-3-O-glukozittir [9]. Sahip olduğu bu bileşikler çok benzer yapılara sahiptir. Siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit aynı moleküler ağırlığa sahiptir, tek yapısal fark heksoz halkasındaki bir hidroksil grubunun (OH) konumudur, ayrıca siyanidin-3-arabinozit ve siyanidin-3-ksilozit benzer bir yapıya sahiptir, ancak pentozdaki bir OH grubunun konumunda farklılık gösterir, sonuç olarak siyanidin türevleri benzer bir polariteye sahiptir [14].

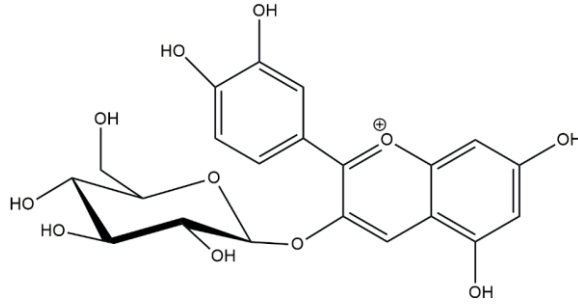
2.1.2.1. Siyanidin-3-galaktozit



Şekil 2.1: Siyanidin-3-galaktozitin kimyasal formülü

Kimyasal ismi (2S,3R,4S,5R,6R)-2-[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilyum-3-il]oksi-6-(hidroksimetil)oksan-3,4,5-triol; klorür olan siyanidin-3-galaktozit antosiyantinler grubuna ait bir bileşiktir (Şekil 2.1). Kapalı formülü $C_{21}H_{21}ClO_{11}$ ve molekül ağırlığı 484,8 g/mol olup koyu kırmızı renktedir [15].

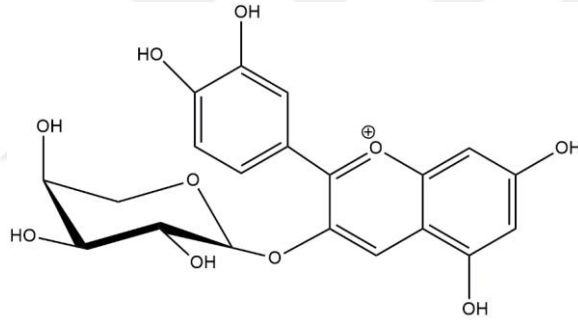
2.1.2.2. Siyanidin-3-glukozit



Şekil 2.2: Siyanidin-3-glukozitin kimyasal formülü

Kimyasal ismi 2-[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilyum-3-il]oksi-6-(hidroksimetil)oksan-3,4,5-triol; klorür olan siyanidin-3-galaktozit antosiyaninler grubuna ait bir bileşiktir (Şekil 2.2). Kapalı formülü $C_{21}H_{21}ClO_{11}$ ve molekül ağırlığı 484,8 g/mol olup koyu kırmızımsı renktedir [16].

2.1.2.3. Siyanidin-3-arabinozit



Şekil 2.3: Siyanidin-3-arabinozitin kimyasal formülü

Kimyasal ismi (2S,3R,4S,5S)-2-[2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksikromenilyum-3-il]oksioksan-3,4,5-triol; klorür olan siyanidin-3-galaktozit antosiyaninler grubuna ait bir bileşiktir (Şekil 2.3). Kapalı formülü $C_{20}H_{19}ClO_{10}$ ve molekül ağırlığı 454,8 g/mol olup koyu kırmızı-siyah renktedir [17].

2.1.3. Aronya ve İnsan Sağlığına Etkileri

Son zamanlarda, antosiyaninlerin insanlar üzerindeki olası sağlık etkileri konusunda büyük bir ilgi artışı olmuştur. Antosiyaninler, günlük diyetlerde en yaygın tüketilen flavonoidlerden biri olan polifenolik bileşikler grubunu temsil eder. Bu bileşikler bitkilere karakteristik kırmızı, mor ve mavi renkleri verirler ve antosiyanin açısından zengin bitkiler arasında kırmızı üzüm, nar, aronya, yaban mersini, kırmızı/siyah frenk üzümü ve çilek gibi türler bulunur. Literatürde yaklaşık 700

antosiyenin sağlık yararları olan bileşikler olarak ve doğal renklendiriciler olarak rapor edilmiştir [18].

Artan sayıda bilimsel rapor, antosiyenin açısından zengin meyvelerin veya bunlardan elde edilen ekstrelerin, potansiyel antioksidan etkileri ile ilişkili olarak insanlar ve hayvanlar için çeşitli koruyucu etkiler sergilediğini göstermektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, antosiyenin tüketiminin kardiyovasküler hastalık, oksidatif stres ve diyabet riskini önlediğini öne sürmektedir [19].

Aronia melanocarpa meyvelerinden elde edilen ekstreler ve bileşikler, antioksidan, anti-inflamatuar, antikanser, anti-aging, antimikrobiyal, antiviral, antidiyabetik, antiaterosklerotik, anti-adipojenik, lipit düşürücü, antimutajenik, hipotansif, hepatoprotektif, gastroprotektif, nöroprotektif ve kardiyoprotektif özellikte olduğu vurgulanmaktadır [6, 10].

Görmenin iyileştirilmesinden, diyabetin önlenmesi, antidepresan, yorgunluğu önlemek gibi sağlık etkilerine de sahiptir ve melanin üretimini inhibe eder [7, 20]

2.1.4. Biyoyararlanımı

Antosiyenin içeren farklı meyve türlerini tüketen insanlarla yapılan klinik çalışmalar, bu fenolik pigmentlerin zayıf bir şekilde emildiğini göstermiştir. Plazmadaki antosiyenin konsantrasyonu 10 ila 50 nmol/L arasında değişmekte (50 mg aglikon eşdeğeri tedarikten sonra) ve maksimum konsantrasyona ulaşmak için ortalama süre plazma için 1,5 saat ve idrar için 2,5 saat olduğu bulunmuştur [21].

Aronya meyvelerinin sindirimi gerçekleşirken içediği antosiyeninlerden siyanidin-3-galaktozit hızlı bir şekilde metabolize olduğu ve peonidin-3-O-galaktozite dönüştüğu tespit edilmiştir. Biyoyararlanım sırasında, hızla gerçekleşen mikrobiyal katabizasyon ürünlerinin plazma ve idrarda antosiyeninlerin oranına göre yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir [6, 22].

2.1.5. Aronya Kullanım Alanları

Aronya meyvesi taze olarak tüketilebilse de genellikle ekşi ve acı tadı nedeniyle kurutulmuş meyve, meyve püresi, meyve suyu, reçel, çay, likör ve şarap gibi alternatif ürünlere işlenir. Ayrıca, yüksek antosiyenin içeriği nedeniyle fonksiyonel gıdalarda ve gıda takviyelerinde kullanılır. Aynı zamanda gıda ve farmasötik endüstride doğal bir renklendirici olarak da kullanılır [23].

2.1.6. Aronya Besin Değeri

Aronia melanocarpa meyvelerinin kimyasal bileşimi, yetiştirme alanı ve toprak özellikleri gibi çevresel ve iklimsel koşullara, yetiştirme tekniklerine, genetik özelliklere (kültivar, genotip ve çeşit), meyvelerin olgunluğuna, hidrasyon ve hasat yöntemlerine ve depolama koşullarına bağlı olarak değişir [10].

Aronya meyveleri yüksek biyolojik ve besinsel değere sahiptir. Vitamin B (B1, B2, B6, niyasin, pantotenik asit), vitamin C (13,0-270,0 mg/kg), β -karoten (7,7-16,7 mg/kg), önemli miktarda diyet lifi (yaklaşık 55,0 g/kg), mineraller (kül değeri olarak 4,4-5,8 g/kg), yaklaşık %16,0-18,0 karbonhidrat (glukoz, fruktoz, sorbitol) ve %1,0-1,5 organik asitler (malik, kinik, sitrik) olmak üzere aynı zamanda yüksek fenolik bileşik içerir [24]. Ayrıca, meyve bileşenleri arasında karbonhidratlar (sorbitol, fruktoz, glukoz ve sükroz), organik asitler (kinik, malik, sitrik, şikimik, oksalik ve süksinik asitler), amino asitler, proteinler, mineraller (K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Se ve Zn), vitaminler (askorbik asit, E, B ve K vitaminleri), aromatik bileşikler, lifler, yağ asitleri, karotenoidler ve uçucu yağlar tanımlanmıştır. Taze aronya meyvelerindeki toplam lipid içeriği için %0,09 ile %0,17 arasında değerler bildirilmiş olup, bunlar çoğunlukla gliseridler (ana yağ asidi olarak linoleik asit), ardından fosfolipidler ve steroller (başlıca β -sitosterol) olarak ifade edilmiştir [10].

2.1.7. Analiz Yöntemleri

Busmeleva ve arkadaşları [7] siyah aronya ekstraktının antioksidatif ve immünomodülatör özelliklerini değerlendirme amacıyla yaptıkları çalışmada *Aronia melanocarpa* meyvelerinin sütun kromatografisi yöntemini kullanarak antosiyaninleri ekstrakte etmişlerdir. %93,7'nin üzerinde saflığa sahip siyanidin-3-O-galaktozit elde etmişlerdir. HPLC ve spektrofotometri yöntemleriyle flavonoid içeriğini analiz etmişlerdir. Antosiyanin fraksiyonunun ana bileşeninin kuru ekstrakt kütlesinin %73,5'ini oluşturan siyanidin-3-O-galaktozit olduğunu bulmuşlardır. HPLC analizlerinde C18 (4,6 x 150 mm) ve Hiflex H (250 x 4,6 mm) kolonlarını kullanmışlardır. Mobil faz olarak gradient sistemde 1:0, 1:9 ve 9:1 oranlarında %0,1'lik formik asit ve asetronitril çözeltisi karışımını kullanarak flavonoidlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Akış hızını 1,0 mL/dak, enjeksiyon hacmini 10 μ L, analiz süresini 30 dakika ve kolon sıcaklığını 45°C olarak belirlemişlerdir. Ters faz hidrofilik HPLC kolonu ile; mobil faz olarak distile su içinde hacimce %30 asetronitril ve formik asit

içeren bir çözelti kullanarak antosiyaninlerin analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu analizin koşullarında 1 mL/dk akış hızı, 40°C ve 15 µL enjeksiyon hacmi kullanmışlardır. AAPH ve DPPH ile yapılan testlerin analizinin ardından, aronyada siyanidin-3-O-galaktozitin antioksidan kapasitesi açısından tek tek antosiyaninlerden çok daha iyi olduğunu bulmuşlardır. Aronya siyanidin-3-O-galaktozitin, siyanidin-3-O-glukozit ve siyanidin-3-O-galaktozitin standartlarından oluşan bir karışımın oral yoldan uygulanması sonucunda in vivo olarak fagositlerin fonksiyonel aktivitesi üzerinde immünomodülatör bir etki ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, antosiyaninlerin, özellikle siyanidin-3-O-galaktozit, aronya tüketildiğinde immünomodülatör etkiler göstererek önemli bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

Cujic ve arkadaşları [25] geleneksel bir teknik olan maserasyon yöntemi kullanarak kurutulmuş aronya meyvesinden polifenoller ekstre ederek ve çeşitli ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik ve antosiyanin içerikleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çeşitli çözücüler, partikül boyutu, katı-çözücü oranı ve ekstraksiyon süresi iki seviyeli faktöriyel tasarımda bağımsız değişkenler olarak incelemişlerdir. En uygun ekstraksiyon koşulları 0,75 mm boyutundaki meyvelerin %50 etanol ile maserasyonu, katı çözücü oranının 1:20 olduğunu tespit etmişlerdir. Seçilen koşullar altında, deneysel toplam fenolikler 27,8 mg GAE/g ve toplam antosiyaninler %0,27 olarak tahmin edilen değerlerle uyumlu olduğu sonucuna varmışlardır. Antosiyaninlerin kantitatif analizinde HPLC-DAD yöntemi ile ters faz Lichrospher RP-18 (Agilent) kolonunu (250 x 4 mm i.d., 5 µm) kullanmışlardır. Mobil faz, %10 formik asit ve asetonitril içermektedir. Örnekleri gradient sistemle, 1 mL/dak akış hızında ve 290, 350 ve 520 nm dalga boylarında analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda siyanidin-3-galaktozit 0,40-0,85 mg GAE/g KM; siyanidin-3-glukozit 0,07-0,14 mg GAE/g KM; siyanidin-3-arabinozid 0,14-0,32 mg GAE/g KM; kersetin-3- rutinozid 0,31-0,42 mg GAE/g KM; kersetin-3-galaktozid 0,17-0,27 mg GAE/g KM; kersetin-3-glukozit 0,10-0,15 mg GAE/g KM olarak hesaplamışlardır. Optimizasyonu iki deneysel yol kullanılarak sağlamışlardır. HPLC analizleri ise ekstraksiyon sürecinin optimizasyonu için uygun bir model olduğunu, maserasyonun aronya meyvesinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için etkili ve basit bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Bermudez-Soto ve arkadaşları [26] mide ve duodenumdaki bazı koşulları (pH, sıcaklık ve enzimler) simüle eden bir in vitro model kullanarak siyah aronyalardaki ana polifenollerin sindirimi araştırmışlardır. Çeşitli süreçlerden geçirilerek sindirilen

numuneler asitlendirilerek filtrelendirilmiş ve toplam çözünür geri kazanılmış fenoliklerin içeriğini belirlemek için HPLC-DAD/HPLC-MS-MS'de analiz etmişlerdir. Orijinal aronya suyunda belirlenen ve gastrik ve pankreatik in vitro sindirimden sonra geri kazanılan ana çözünür fenolik bileşiklerin her birinin kütle spektrometresi analizini yapmışlar ve bireysel miktarlarını belirlemişlerdir. Analiz sonrasında antosiyaninler için orijinal miktarları ve yüzde değişimleri sırasıyla siyanidin-3-galaktozit için 18,1 ve %39,2; siyanidin-3-glukozit için 2,08 ve %43,3; siyanidin-3-arabinozit 12,0 ve %44,9 inkübasyon karışımı başına toplam mg olarak bulmuşlardır. Sonuçta mide sindiriminin, antosiyaninler gibi ana fenolik bileşiklerin herhangi biri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını, bununla birlikte bu bileşiklerin pankreatik sindirim sırasında önemli ölçüde değiştiğini kaydetmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında polifenollerin ince bağırsaktaki hafif alkali koşullara karşı oldukça duyarlı olduğunu ve bu bileşiklerin büyük bir kısmının, farklı kimyasal özelliklere sahip diğer bilinmeyen ve/veya tespit edilemeyen yapısal formlara dönüştürülebildiği göstermişlerdir.

Graversen ve arkadaşları [27] siyah aronya suyunun heterojen gıdalarda lipid oksidasyonu üzerindeki etkisini daha ayrıntılı bir şekilde incelemek amacıyla benzer bir polifenol ve askorbik asit zengini olan frenk üzümü suyunu karşılaştırmışlardır. Çalışmada meyve suları üzerinde yapılmış, iki meyve suyunu (I) fosfatidil kolin içeren lipozomlarda lipid oksidasyonunu inhibe etme yetenekleri açısından; (II) lipid oksidasyonunu etkin bir şekilde inhibe eden evrensel lipofilik doğal antioksidan olan α -tokoferolü (E Vitamini) yeniden oluşturma yetenekleri açısından ve (III) heterojen gıdalarda lipid oksidasyonunu başlatan radikal oluşumunu demir katalizli su sistemindeki etkileri açısından karşılaştırmışlardır. E vitamini tayini, 1,0 mL/dk akışta mobil faz olarak metanol:su (94:6) ve (175 mm x 4,0 mm; 5 μ m) ODS kolon kullanarak yapmışlardır. Sonuç olarak, siyah aronya suyu, gıdalarda lipid oksidasyonunu etkili bir şekilde inhibe edebilen fenolik antioksidanlar içerdiği, başlangıçta oluşan radikallerin su fazında demir katalizli temizlenmesi, otooksidasyon sırasında radikallerin temizlenmesi ve gıda sistemlerinde önemli bir lipofilik antioksidan olan α -tokoferolün korunması veya yeniden oluşturulması gibi yollarla gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.

Taheri ve arkadaşları [28] siyah, mor ve kırmızı aronya (*Aronia melanocarpa*, *Aronia prunifolia* ve *Aronia arbutifolia*) ve 'Viking' (*Aronia mitschurinii*) meyvelerinden elde edilen polifenolleri karakterize etmişlerdir. Antosiyaninler ve antosiyanin olmayan flavonoidleri UHPLC-DAD-MS kullanılarak, proantosiyanidinleri

ise normal faz HPLC kullanılarak ölçmüşler. Analizleri 2,1mm x 50 mm; 1.7 μ m boyutlarında Kinetex PFP 100A kolonda gradient sistemde %5 formik asit:%30 metanol (suda) kullanarak 0,2 mL/dk akışta gerçekleştirmişlerdir. Kuru ağırlık bazında, antosiyaninler esas olarak siyanidin-3-galaktozit olup, siyandin-3-galaktozit eşdeğerleri olarak siyah aronyada en yüksek (3,4-14,8 mg/g) ve kırmızı aronyada en düşüktür (0,5-0,8 mg/g). Sonuç olarak, siyah, mor ve kırmızı aronya meyvelerinin renginin siyanidin antosiyaninlerinin bolluğundan kaynaklandığı, siyah ve mor aronya meyveleri, kırmızı çeşitlere göre 1,9–17 kat daha fazla siyanidin içerdiği, buna karşılık, aronya proantosiyandinleri ve flavonoidleri, meyve rengiyle ilişkili olmadığını tespit etmişlerdir.

Chen ve arkadaşları [9] siyah aronyadan preparatif HPLC ile siyanidin-3-O-galaktozit ve siyanidin-3-O-arabinoziti izole etmişlerdir. Bu iki antosiyanin monomerinin intravenöz uygulama sonrası farmakokinetiklerini araştırmak için bir hayvan deneyi gerçekleştirmişlerdir. Gradient sistemde yapılan HPLC analizinde mobil fazı %8,5 formik asit sulu çözeltisi (A) ve metanol (B) olarak kullanmışlardır. Mobil fazın akışını 1,0 ml/dk, 525 nm'de, 35°C'de C18 kolonda (5 μ m, 250mm x 4.6mm) ve enjeksiyon hacmi 10 μ l olarak çalışmışlardır. Standart çözeltileri %2'lik HCl içeren metanol çözeltisinde hazırlamışlardır. Siyanidin-3-O-galaktozit ve siyanidin-3-O-arabinozit için sırasıyla 0,1-40 μ g/mL ve 0,25-10 μ g/mL aralığında doğrusallık aralığını çalışmışlardır. Plazmada siyanidin-3-O-galaktozit ve siyanidin-3-O-arabinozit için LOD ve LLOQ sırasıyla 0,25 ve 0,1 μ g/mL; 0,1 ve 0,05 μ g/mL olarak tespit etmişlerdir. Yapılan farmokokinetik çalışma sonucunda C_{max} , T_{max} ve AUC_{son} değerlerini sırasıyla siyanidin-3-O-galaktozit için 19,00 μ g/mL, 0,02 h, 5,20 μ g*h/mL; siyanidin-3-O-arabinozit için 6,18 μ g/mL, 0,02 h, 1,29 μ g*h/mL olarak bulmuşlardır. Sonuçlar, farmakokinetik alanda siyanidin-3-O-galaktozitin, siyanidin-3-O-arabinozite göre tercih edilebilir ilaç hedeflenebilirliğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Dobros ve arkadaşları [29] aronya meyvelerinin antioksidan özelliklerinin coğrafi bölgeye göre ve olgunlaşma sırasındaki değişkenliğini tespit etmek amacıyla iki yıl boyunca üç yerden aronya meyveleri toplamış aronya meyvesi ekstraktlarının antioksidan özelliklerinden sorumlu olan bileşikleri kemometrik yöntemler kullanarak tanımlamışlardır. Antosiyanin ve klorojenik asit analizleri HPLC-DAD kullanılarak ve antioksidan kapasitesi FRAP ve DPPH yöntemleriyle değerlendirmişlerdir. HPLC analizlerinde C18 kolon (5 μ m, 4 x 250 mm) ve %4,5 formik asit:asetonitril mobil

fazını gradient sistemde kullanmışlardır. 520 nm’de ve 1 mL/dk akışta yapılan çalışmada siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-arabinoziti sırasıyla 26,8.dk ve 30,7.dk’da tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda, olgunlaşmamış yeşil aronya meyvelerinin aynı zamanda besin maddeleri ve antioksidanlar içerdiğini, antioksidan aktivite sergilediğini, temmuz ayı başına kadar hasat edilen meyvelerde klorojenik asit, toplam polifenol ve toplam flavonoid içerik düzeylerinin oldukça yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, meyve olgunlaştıkça antosiyanin miktarının arttığı ancak ilk büyüme aşamasındaki meyve en yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu bilgi ile istenilen özelliklere sahip aronya ekstraktlarının elde edilmesinde fayda sağladığını vurgulamışlardır.

Dulf ve arkadaşları [30] *Aspergillus niger* ve *Rhizopus oligosporus* (fungi) ile katı hal fermantasyonu (SSF) sırasında aronya posasındaki polifenoller, antioksidan aktiviteler ve lipit bileşimlerindeki değişiklikler üzerine çalışmalar yapmışlardır. Posalardan (1 g) fenolik bileşikler, ultrasonik banyoda 40°C’de 30 dakika boyunca ekstraksiyon karışımı (hidroklorik asit: metanol: su oranı 1:80:19) ile 20 mL kullanılarak ekstrakte etmişlerdir. Örnekleri, HPLC-DAD-MS ile analiz etmişlerdir. Fenoliklerin ayrışmalar için 25 °C’de C18 kolonu (4.6 × 150 mm, 5 µm) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Analizi gradient sistemde %0,1 asetik asit:asetonitril ve %0.1 asetik asit içinde asetonitril mobil fazını kullanarak 0,5 ml/dak akışta gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda aronya posasını fenolik antioksidanlarla zenginleştirdiği, ölçülebilen toplam fenolik miktarlarının her iki fermantasyon işlemi sırasında 1,7 kattan fazla arttığı, toplam flavonoid içeriğinde de benzer bir eğilim gözlemlenmiştir. Ayrıca, daha uzun bir fermantasyon süresinin, toplam antosiyaninlerin daha fazla kaybına yol açtığını da tespit etmişlerdir. Fenolik bileşiklerin HPLC-MS analizi, flavonollerin ve sinamik asitlerin miktarlarının arttığını, glikosile edilmiş antosiyaninlerin konsantrasyonlarının ise önemli ölçüde azaldığını göstermiştir.

Gonza’Lez-Molina ve arkadaşları [31] limon suyunu, biyolojik aktif bileşenler açısından zengin yeni içecekler tasarlamak amacıyla iki farklı oranda (%2,5 ve %5, v/v) aronya konsantresi ile zenginleştirmişlerdir. İçeceklerin fitokimyasal bileşimi (antosiyaninler, flavanonlar, flavonlar, flavonoller ve hidroksisinnamik asitler) ve stabilitesini HPLC-DAD ile, ayrıca renk değişiklikleri ve in vitro antioksidan aktivite (DPPH• testi) ile analiz etmişlerdir. Lichrocart RP-18 ters faz kolonu (250 × 4 mm, 5

μm) kullanılarak, mobil faz olarak %5 formik asit ve metanol gradient sistemde 1 mL/dk akış hızında analizleri gerçekleştirmişlerdir. 280, 360 ve 520 nm'de yapılan analizlerde farklı fenolik bileşikler, analitik standartlarla kromatografik karşılaştırma ile karakterize etmişlerdir. Flavanonlar hesperidin (280 nm), flavonlar diosmin (360 nm), fenolik asitler klorojenik asit (360 nm), rutin gibi kuersetin türevleri (360 nm) ve antosiyaninlerden siyanidin 3-glukozitin (520 nm) miktar tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlarda, 60 günlük depolamanın ardından antosiyanin bozunmasının %90'ın üzerinde olmasına rağmen, yeni içeceklerin çekici kırmızı rengini koruduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, yeni karışımların in vitro antioksidan aktivitesi, %5 aronya konsantresi eklendiğinde saf limon suyuna kıyasla 2 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Böylece, sadece %5 aronya konsantresi eklenmesi, limon suyunun antioksidan özelliklerini etkili bir şekilde artırabilir ve belirli organoleptik özellikleri iyileştirerek sağlık için gıda pazarında ilgi çekici bir içecek olarak sunulabilir olduğu sonucuna varmışlardır.

Kavela ve arkadaşları [32] liyofilize edilmiş aronya posasından antosiyanin ve toplam fenolik ekstraksiyonu için yeşil çözücülerin (hepsi %1 sitrik asit veya %1 formik asit ile asitlendirilmiş %50 etanol, %50 gliserol ve %100 distile su) etkinliğini değerlendirmişlerdir. HPLC analizlerini C18 kolon ($150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) ve %0,5 formik asit ile %0,5 asetonitril içerisinde formik asit gradient mobil faz sistemini 0,5 mL/dk akışta gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara göre, %50 etanol + %1 sitrik asit, hem spektrometrik hem de HPLC ölçümlerinde ($1783 \pm 153 \text{ mg CGE/100 g KM}$ ve $879.5 \text{ mg/100 g KM}$) 50°C 'de 60 dakika boyunca önemli ölçüde daha yüksek toplam antosiyanin içeriği olduğunu tespit etmişlerdir. Sitrik asidin, formik aside kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır. En yüksek toplam fenolik içerik değerleri, %50 gliserol + %1 formik asit ile 50°C 'de 60 dakika boyunca ($12,309 \pm 759 \text{ mg GAE/100 g KM}$) elde edilmiştir. Bu çalışma, önemli miktarda polifenolün, potansiyel olarak doğal bir gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceğini ve aronya posasından %50 etanol + %1 sitrik asit veya %50 gliserol ile 50°C 'de 60 dakika boyunca verimli bir şekilde ekstrakte edilebileceğini kanıtlamışlardır.

Jakesevic ve arkadaşları [33] yaban mersini ve aronya meyvelerinin tek başına ve *Lactobacillus plantarum* HEAL19 LAB suşu ile birlikte bir I/R modelinde farelerdeki antioksidatif etkileri üzerine çalışmışlardır. Erkek BALB/cJ farelerin, deneysel diyetlerle 10 gün boyunca beslendiğini belirtmişlerdir. Diyetlerin, standart

yem ile takviye edilen yaban mersini (*Vaccinium myrtillus*) veya aronya (*Aronia × prunifolia*) tozunu tek başına veya LAB suşu *Lactobacillus plantarum* HEAL19 ile birlikte içerdiğini vurgulamışlardır. Farelerin kolon ve çekumdan elde edilen antosiyaninlerini, 6°C'de soğutulmuş bir otomatik örnekleyiciye sahip HPLC-DAD-ESI-MSn sistemi kullanarak analiz etmişlerdir. Bileşikleri, Thermo Hypersil-Keystone (Bellefonte, PA) tarafından sağlanan Betasil C18 kolonunda (250 mm × 2.1 mm i.d., 5 µm) ve C18 ön kolonunda (4.0 mm × 2.1 mm; 5 µm) analiz etmişlerdir. Bileşikleri, formik asit/su (5/95, v/v) ve formik asit/asetonitril (5/95, v/v) çözeltilerini içeren mobil fazlarla gradient olarak ayırmışlardır. Kolon sıcaklığını 40°C'de ve akış hızını 0.25 mL/dk olarak ayarlamışlardır. Antosiyaninleri, 520 nm'de siyanidin-3-glukozid harici standardı kullanılarak 0.6-16.1 µg/mL konsantrasyon aralığında analiz etmişlerdir ve örneklerdeki antosiyanin konsantrasyonunu µg/g çekum veya kolon içeriği olarak ifade etmişlerdir. Sonuç olarak yaban mersini tek başına ve *L. plantarum* HEAL19 ile birlikte, aronyadan daha iyi bir lipid peroksidasyon koruması sağladığı ve bu diyet takviyeleri oksidatif stresi önlemek veya baskılamak için kullanılabileceği kanısına varmışlardır.

Szumny ve arkadaşları [34] yaptıkları çalışmada polifenol grubundan (özellikle antosiyaninler) ve iridoidlerden oluşan bileşenleri aynı anda içeren bir preparatın göz organı üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ekstrede bulunan antosiyaninleri (siyanidin-3-O-galaktozit, delphinidin-3-O-arabinozit, siyanidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-rutinozit, siyanidin-3-O-arabinozit) ve iridoidleri (loganin, sverosid, loganik asit) HPLC-MS ile tanımlamışlardır. Bileşenlerin kantitatif analizini, C18 kolonda (75 × 4.6 mm, 5 µm) yapmışlardır. Mobil faz 1 mL/dk akışta %4,5 formik asit ve asetonitril çözeltilerini gradient sistemde kullanmışlardır. Iridoidleri 245 nm'de, fenolik asitleri 320 nm'de, flavonoller 360 nm'de ve antosiyaninleri 520 nm'de tespit etmişlerdir. Sonuçları incelediklerinde hazırlanan bileşiminin ağız yoluyla uygulamasının ilk 6 haftada görme keskinliğini değiştirmediğini tespit etmişlerdir. Ancak, çalışmanın sonraki döngüsünde, %92,3 oranında hastada yakın görme keskinliğinde bir iyileşme gözlemlendiğini vurgulamışlardır. Bu, presbiyopik hastalarda yakın görmeyi düzeltme potansiyelini gösterebileceği sonucuna varmışlardır. Öte yandan, Schirmer testinde, 6. hafta başında %80 hastada konjunktival nemlenmede bir iyileşme gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Tian ve arkadaşları [35] on üç farklı bitki türünün meyvelerinin ve yapraklarının fenolik bileşikleri sulu etanol ile ekstrakte ederek ve UPLC-DAD-ESI-MS, HPLC-DAD

ve NMR ile analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik ayırım için C18 kolon (150 × 4,60 mm; 3,6 µm) kullanılmıştır ve örnek ise 10,0 µL enjekte edilmiştir. Mobil fazın akışı 1,0 mL/dk gradient olarak, 5,0% (v/v) formik asit ve asetonyitril karışımıdır. Antosiyaninler için 36°C kolon sıcaklığı ve 520 nm, fenolik bileşikler için kolon sıcaklığı 36°C ve oda sıcaklığı ile 280 nm, 320 nm ve 360 nm dalga boylarında analizleri gerçekleştirmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda toplam fenolik içeriği yapraklarda meyvelere göre sürekli olarak daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tomic ve arkadaşları [36] genç erkek sıçanlarda bir ay boyunca sınırsız aronya meyve suyu ve/veya polifenol içermeyen meyve suyu tüketiminin davranışsal etkilerini araştırmışlardır. Aronya meyve suyunu başlangıçta spektrofotometrik analizler ve HPLC-DAD ile fenolik bileşenler açısından değerlendirmişlerdir. Bireysel fenolik bileşenlerin tanımlanması ve kantifikasyonu, ters faz Zorbax SB-C18 (Agilent) analitik kolonu (250 mm × 4,6 mm; 5,0 µm) kullanılarak yapılan kromatografik analizle gerçekleştirmişlerdir. Antosiyanin analizi için gradient sistemde %10 formik asit ve asetonyitril kullanmışlardır. Dedektör dalga boyları 290, 350 ve 520 nm olarak ayarlanmış ve akış hızı 1 ml/dakika olarak belirlenmiştir. Siyanidin-3-O-glukozit ve siyanidin-3-O-arabinozitin içeriklerini kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlemişlerdir, siyanidin-3-O-galaktoziti ve siyanidin-3-O-ksiloziti ise siyanidin-3-O-arabinozit eşdeğerleri cinsinden ölçmüşlerdir. Aronya meyve suyunda yapılan analiz sonucunda siyanidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-arabinozit, siyanidin-3-O-galaktozit ve siyanidin-3-O-ksiloziti sırasıyla 21, 101, 301 ve 13 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Tüketim sonunda sıçanlara yapılan çeşitli testler sonucunda hiperaktivite gösterdiğini, anksiyete benzeri davranışlarda belirgin bir azalma sergilediğini, testlerinde depresyon benzeri davranışlarda bir hafifleme gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Şavikin ve arkadaşları [37] kuru aronya, yaban mersini ve siyah frenk üzümü meyve çaylarının en yaygın yöntemlerle (dekoksyon ve infüzyon) hazırlanmış fenolik bileşim analizleri ve sitotoksik aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. LC/DAD/MS yöntemi ile 17 antosiyanin, 11 flavonoid ve 4 hidroksisinamik asit türevi tanımlamışlardır. Araştırılan çayların kantitatif analizini HPLC ile yapmışlar ve meyve çaylarında başlıca fenolik bileşiklerden klorojenik asitler, kuersetin glikozitleri ve antosiyanin glikozitlerinin analizini gerçekleştirmişlerdir. Kuru meyvelerin ekstraksiyonunda %70 etanol kullanmışlardır. Antosiyanin analizini HPLC-DAD ile, ters fazlı Lichrospher RP-18 (Agilent) analitik kolon (250 × 4,0 mm; 5,0 µm) kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Mobil faz gradient sistemde asetonitril ve %10 formik asit ile enjeksiyon hacmi 10 µL, elüsyon hızı 1 mL/dk olarak uygulamışlardır. Dedeksiyon dalga boylarını 290, 350 ve 520 nm olarak ayarlamış ve bileşiklerin spektrumlarını 200 ile 650 nm arasında kaydetmişlerdir. Meyve çaylarını, rahim ağzı kanseri, melanom, kolon kanseri ve kronik miyeloid lösemi hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite açısından araştırmışlardır ve aronya dekoksasyonunu tüm hücre hatlarına karşı en etkili olan hazırlama şekli olarak tespit etmişlerdir.

Šnebergrová ve arkadaşları [24] aronyanın (*Aronia melanocarpa*) karakteristik bileşenlerinin değişkenliği, aronya ürünlerinin kimyasal bileşimi ve kalitesinin değerlendirilmesi gibi mevcut verileri tamamlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bir dizi aronya meyveai için çözünür katı madde 19,9 °Brix, titre edilebilir asitlik 9,8 g malik asit/kg, formol sayısı 11,9 ml 0.1M NaOH/100 g, kül miktarı 6,7 g/kg, fosfor 0.34 g/kg, potasyum 2. 90 g/kg, kalsiyum 0,27 g/kg, magnezyum 0,16 g/kg, sukroz 0,10 g/kg, glukoz 47,1 g/kg, fruktoz 37,8 g/kg, sorbitol 66,1 g/kg, malik asit 9,6 g/kg, sitrik asit 1,0 g/kg, kinik asit 5,0 g/kg, izositrik asit 0,02 g/kg olarak ortalama değerlerini elde etmişlerdir. Bu çalışmalarda toplam antosiyanin içeriği pH diferansiyel yöntemi ile antosiyanin profilini ise ters faz HPLC yöntemi ile incelemişlerdir. HPLC-DAD yönteminde kolon sıcaklığını 30°C olarak ayarlamış, mobil faz olarak 0,02 mol/L potasyum fosfat tampon ve fosforik asit (pH 2,5) kullanmışlardır. Aronyada yapılan analiz sonucunda siyanidin-3-O-galaktozit, siyanidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-arabinozit ve siyanidin-3-O-ksilozitin alıkonma zamanlarını sırasıyla 8,8; 10,3; 11,7 ve 16,4 dakika olarak tespit etmişlerdir. Aronya ürünlerinin besin değerinin, meyve içeriğiyle yakından ilişkili olduğunu ve en yüksek toplam polifenol ve toplam antosiyanin içeriğinin, daha yüksek meyve içeriğine sahip örneklerde bulunduğunu tespit etmişlerdir. Örneklerdeki toplam polifenol konsantrasyonunu 2550 ile 12.000 mg galik asit eşdeğeri/kg arasında değiştiğini, antosiyanin içeriğinin ise 104 ile 651 mg siyanidin-3-glukozit/kg arasında olduğunu bulmuşlardır.

Rodríguez-Werner ve arkadaşları [2] aronya meyvelerinden suya geçişte fenolik kompozisyondaki değişiklikleri HPLC-PDA ve HPLC-ESI-MSn analizleri ile araştırmış ve ticari olarak mevcut aronya ürünlerinin kimlik doğrulama fingerprint profillerini oluşturmuşlardır. Ayrıca, aronya ürünlerinin radikal temizleme aktivitesi TEAC (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite) testini kullanılarak belirlemişlerdir. Aronya meyve

suyunda ve dondurularak kurutulmuş aronyada HPLC-DAD ile yaptıkları analizde C18 kolon ($250 \times 4,6$ mm i.d., $3,0 \mu\text{m}$) kullanmış olup mobil faz olarak su:asetonitril:formik asit ile gradient system uygulamışlardır. Antosiyaninlerden siyanidin-3-O-glukoziti $22-176$ mg/L arasında hesaplamışlardır. Polimerik prosiyanidinlerde yapılan analizde ise C18 kolon ($250 \times 4,6$ mm; $5,0 \mu\text{m}$) kullanmış olup mobil faz olarak su:diklormetan:asetik asit:metanol ile gradient system uygulamışlardır. Aronya posası, meyve suyu üretiminin değerli bir yan ürünü olarak en yüksek fenolik içeriğe ve en yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Oszmianski ve Lachowicz [38] yaptıkları çalışmada aronya meyvesinden kurutulmuş meyve ve meyve suları üretimini değerlendirmişlerdir. Aronya meyvesinden elde edilen kuru tozlar ve meyve sularıyla hazırlanan örnekleri %2.0 formik asit ile asidik hale getirmiş, 50 mL metanol ile ekstrakte edip, yüksek performanslı sıvı kromatografisi buharlaştırıcı ışık saçılma dedektörü (HPLC-ELSD) ile şeker içerikleri açısından analiz etmişlerdir. Daha sonra antioksidan kapasitesini FRAP ve ABTS testleri ile analiz etmişlerdir. Polifenoller, LC-PDA-ESI-MS/MS ile HPLC ile tanımlamış ve kantitatif analizleri UPLC-MS/MS (Q/TOF dedektörü ve PDA dedektörü kullanılarak) ile yapmışlardır. Siyah aronya özlerinin polifenol (antosiyeninler, flavan-3-oller, flavonoller, flavanon ve fenolik asitler) tanımlaması ve nicel analizi, HPLC-PDA-QTOF kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Polifenollerin tek tek ayrılması için 30°C 'de C18 kolonu ($2,1 \times 100$ mm; $1,7 \mu\text{m}$) kullanmışlardır. Örnekler ($10 \mu\text{L}$) enjeksiyon yapmış ve ayrılmayı $0,45$ mL/dk akış hızında lineer gradyanlar ve izokratik akış oranları ile 15 dakika içinde tamamlamışlardır. Mobil faz olarak gradient sistemde %2,0 formik asit ve asetonitril kullanmışlardır. Kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için delphinidin 3-O-galaktozit, peonidin 3-O-glukozit, siyanidin 3-O-galaktozit ve malvidin 3-O-glukozit standartları ile 520 nm'de çalışmışlardır. $0.05-5$ mg/mL ($R^2 = 0.9999$) konsantrasyon aralığında çalışmışlardır. Aronya ürünlerinde toplam 27 polifenolik bileşik tanımlamış, bunlar arasında 7 antosiyanin, 11 flavonol, 5 fenolik asit, 3 flavan-3-ol ve 1 flavanon bulmuşlardır. Aronya meyvesinden ilk kez üç antosiyanin türevini rapor etmişlerdir. Kurutulmuş meyve posasında ve ezilmiş meyvelerden elde edilen meyve suyunda biyoaktif bileşiklerin daha yüksek aktivitesi olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, posayı, aronya meyvelerine kıyasla kuru toz üretimi için daha iyi bir malzeme olarak bulmuşlardır.

Chandra ve arkadaşları [1] bitkisel takviye endüstrisinde kullanılan botanik hammaddelerdeki tek tek ve toplam antosiyaninlerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için HPLC-PDA ve LC/ES-MS ile bir yöntem oluşturmuş ve valide etmişlerdir. Çalışmada Balaton tart kiraz tozunu, mürver tozunu, aronya tozunu, yabanmersini özütünü ve taze çekirdeksiz Balaton tart kirazını %2'lik HCl/metanol ile ekstrakte edilerek hazırlamışlardır. Her iki yöntem ile gerçekleştirdikleri analizde kolon olarak HP ODS hipersil, (125 x 4,0 mm; 5 µm) kullanmışlardır. HPLC-PDA ve LC/ES-MS yöntemlerinde sırasıyla %0,5 fosforik asit ile su/asetonitril/glasiyel asetik asit/fosforik asit; %1 TFA ve su/asetonitril/glasiyel asetik asit/TFA mobil faz karışımlarını gradient sistemde uygulamışlardır. Her iki yöntemde de akış hızını 0,8 mL/dak, kolon sıcaklığını 30 °C ve enjeksiyon hacmini 10 µL olarak kullanmışlardır. Antosiyaninleri, LC/ES-MS kullanılarak tanımlamışlardır. Bulunan yöntemin basit ve doğrudan numune hazırlama prosedürüne sahip olduğunun bir avantaj olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yöntemin bir şablon olarak kullanılabilir ve rutin kalite kontrol prosedürleri için çeşitli antosiyanin içeren hammaddelerde benzer miktar tayini için uygulanabilir olduğunu vurgulamışlardır. Böylece etkili ve etikete uygun besin takviyeleri üretmek için kullanılan botanik hammaddelerin analitik testlerinde tutarlılık sağlayacağını belirtmişlerdir.

WatreLOT ve arkadaşları [39] soğuğa dayanıklı üzüm suyundaki polifenolik içeriği, aronya suyuyla karşılaştırmak için yüksek güçlü sonikasyonu araştırmışlardır. Aronya ve 'Marquette' üzüm meyvelerine %50 etanol veya %13 asitleştirilmiş etanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve geleneksel bir ekstraksiyon tekniğiyle karşılaştırılmıştır. Demir-reaktif fenolik bileşikler, tanen içeriği ve rengi ekstraksiyonlar sırasında UV-spektrofotometrisi kullanarak ve antosiyanin içeriğini HPLC-DAD kullanılarak analiz etmişlerdir. Burada mobil fazlar, 50 mM NH₄H₂PO₄ pH 2.6 (mobil faz A), asetonitril %20 mobil faz A (mobil faz B) ve 0.2 M orto-fosforik asit pH 1.5 (mobil faz C) içeriyordu. Kolon sıcaklığı 40°C ve akış hızı gradient sistemde 0,5 mL/dk olarak çalışmışlardır. Antosiyaninler 520 nm'de tanımlanmış ve miktarlarını belirlemişlerdir. Numunelerdeki antosiyaninler doğrudan enjeksiyonla (20 µL) karakterize edilmiş ve ters faz kolonlu (250 × 4.0 mm; 5µm) ile analiz edildi. Sonuçta 1:2 katı-çözücü oranında, aronyada ultrason destekli ekstraksiyon kullanılarak renk yoğunluğu, fenolikler ve tanen içeriğinin iyileştirildiği ancak, 'Marquette' meyvelerinin tanen içeriği her iki teknik ve çözücüyle aynı kaldığı görülmüştür.

Stanoeva ve arkadaşları [40], antosiyaninler, flavonoller ve hidrokşisinamik asit türevleri gruplarına ait fenolik bileşiklerin *Aronia melanocarpa* meyvesinden ekstraksiyonu için otuz iki farklı çözücü karışımını (metanol ve asit [asetik, formik ve hidroklorik]; metanol, su ve asit; ve saf metanol) test etmişlerdir. HPLC/DAD/ESI-MSn kullanılarak ekstraktlarda on üç bileşik tespit edilmiş ve miktarları belirlenmiştir. Her bir bileşiğin ve grubun verimi, ekstraksiyon çözücü bileşimi açısından değerlendirilmiştir. Spektrofotometrik analiz de toplam antosiyaninler, ekstraktların %70/30/1 (v/v/v) etanol/su/HCl içeren bir çözücü ile seyreltilmesiyle belirlenmiş ve 540 nm'de absorbans ölçülmüştür. LC/DAD/ESI-MSn analizinde kromatografik ayırımlar, C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Su-formik asit (2%, v/v) (A) ve metanolden (B) oluşan mobil faz 0,4 mL/dk akışta gradient sistemli uygulanmıştır. Sistemde örnekler 10 µL olarak enjekte edilmiştir. Kromatogramlar 190 ila 600 nm aralığında toplanmış ve antosiyaninler için 520 nm'de kaydedilmiştir. HCl içeren ekstraksiyon karışımları, toplam fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi açısından asetik veya formik asit içerenlerden daha üstün bulunmuş, bu durum özellikle antosiyaninler için belirgin olduğunu tespit etmişlerdir.

Torovic ve arkadaşları [41], yaban mersini ve siyah aronya ticari sularının kimyasal bileşimi, besin değeri ve potansiyel sağlık riski üzerine, HPLC-UV (antosiyeninler ve antosiyanin olmayan fenolikler; patulin; hidroksimetilfurfural), AAS (mineraller) ve ICP-MS (eser elementler) analiz çalışmalarında bulunmuşlardır. Yaptıkları çalışmalar sonucunda delfinidin (yaban mersininde) ve siyanidin glikozitleri (yaban mersininde ve aronyada) en bol bulunan antosiyaninler olduğu, klorojenik asit antosiyanin olmayan polifenoller arasında baskın olarak gözlendiği, mineral bileşimin ise yüksek K ve düşük Na içeriğini ortaya koymuşlardır. Günde 200 mL yaban mersini/siyah aronya suyu 63,5/27,0 mg'a kadar antosiyanin; 147,2/314,0 mg polifenol içerdiği keşfedilmiş ve araştırılan toksik maddelerden hiçbirisiyle ilişkili bir sağlık riski gözlemlenmemişlerdir.

Wang ve arkadaşları [7], siyah aronyanın ana kimyasal bileşenlerinin ekstraksiyonu, saflaştırılması ve belirlenmesi, biyoaktivitelerini ve sağlık alanındaki uygulamaları üzerine çalışmaları incelemiş ve karşılaştırmışlardır. Amaçları siyah aronyanın daha fazla kullanımı ve geliştirilmesi için kapsamlı bir referans kaynak sunmaktır. Çalışma, siyah aronyanın ekstraksiyonun da standart bir yöntemin olmadığı, bileşenlerin içeriğini belirlemek için farklı yöntemler kullanıldığını göstermişlerdir.

HPLC, LC-MS ve GC-MS, siyah aronyadaki çok bileşenin belirlenmesi ve üzerinde derinlemesine araştırma için temel oluşturabilen hassas ve etkili kromatografik teknik olduğunu belirtmişlerdir. Siyah aronyadaki birçok biyoaktif bileşenlerin anti-inflamatuar, antioksidan, anti-aging, anti-kanser, anti-tümör, hipoglisemik, antibakteriyel ve hepatoprotektif işlevlerle olduğu ve bu yönüyle sağlık alanlarında, fonksiyonel gıdaların ve yeni ilaçların geliştirilmesinde doğal hammadde olarak da kullanılabileceğine değinmişlerdir.

Wathon ve arkadaşları [42] *Aronia melanocarpa* atık kabuklarından batch yöntemi kullanılarak antosiyaninlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasını geliştirmek, optimize etmek ve yeni bir entegre ekstraksiyon-adsorpsiyon yöntemi ile elde edilen verimi ve kaliteyi karşılaştırmak amacıyla bu çalışmayı yapmışlardır. Araştırılan yöntemler, ekstraksiyon ve adsorpsiyon olmak üzere iki ana işlemten oluşmaktadır. Batch yönteminde ekstraksiyon ve adsorpsiyon ayrı ayrı gerçekleştirilirken, önerilen yeni yöntem entegre bir ekstraksiyon-adsorpsiyon yaklaşımı sunmaktadır. UV-VIS analizi 1 cm kuvars hücreleri kullanılarak 200-800 nm arasında gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi bir Eclipse XDB C18, 5µm partikül boyutlu, 150x2,1 mm iç çaplı kolon ile 25 °C'de gerçekleştirildi. %0,5 TFA ve asetonitril olmak üzere iki çözücü kullanıldı. Gradient sistemde akış hızı 1,0 ml/dk' da çalışmışlardır ve pikler 520 nm'de tespit edildi. Sonuç olarak, yeni entegre yöntem, batch yöntemine kıyasla daha iyi antosiyanin verimleri ve saflığı sağladığı ve ayrıca, süreci basitleştirerek zamandan ve enerjiden tasarruf sağladığı görülmüştür.

Wen ve arkadaşları [43], simüle hareketli yatak (SMB) kromatografisi ile siyah aronyadan antosiyaninleri izole etmek ve saflaştırmak ve SMB ile saflaştırılmış antosiyaninlerin sıçanlarda Aβ kaynaklı hafıza hasarına karşı nöroprotektif etkisini araştırmayı amaçlamışlardır. Çalışmada SMB işleminin parametreleri incelenmiş ve optimize edilmiş, antosiyanin özleri HPLC ve UPLC-QTOF-MS ile tanımlanmış ve antioksidan yetenekleri değerlendirilmiştir. SMB saflaştırması yoluyla antosiyaninler %85'e kadar saflaştırılmış; siyanidin 3-O-galaktozit ve siyanidin 3-O-arabinozit, UPLC-QTOF-MS ile ana antosiyaninler olarak tanımlanmıştır. SMB saflaştırılmış antosiyaninler, ham antosiyanin özütüne göre daha yüksek DPPH ve ABTS serbest radikal temizleme yetenekleri gösterdiğini görmüşlerdir. Dahası, SMB saflaştırılmış antosiyanin tedavisi alan sıçanlarla çeşitli testler yapılmış ve sonuçlar, antosiyaninlerin

antioksidan ve nöroprotektif ajanlar olarak hizmet edebileceğini ve Alzheimer hastalığının tedavisinde potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Siyah aronya meyvelerinin ekstraksiyonu %1 asetik asit ile 1:8 (w/v) oranında %65 etanol ile yapılmıştır. Antosiyanin özü tozları %10 asetik asit ve %1 fosforik asit içeren suda çözüldü. Daha sonra, tüm numuneler 4°C'de 12.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvılar HPLC-PDA ve UPLC-QTOF-MS analizleri için kullanıldı. Analitik kolon Intertsil ODS-SP C18 (4,6 × 250 mm, 5 µm) kolonuydu. Mobil faz A, suda %10 asetik asit ve %1 fosforik asitti ve mobil faz B, %100 asetonitrildi. Analiz 1,0 mL/dakika akış hızında gradient sistemde gerçekleştirildi. Örnekler 20 µL olarak sisteme enjekte edildi ve kolon sıcaklığını 25°C olarak belirlemişlerdir. Analiz dalga boyları SMB sürecini izlemek için 278 nm ve antosiyaninleri ölçmek için 520 nm idi. UV-VIS spektrumları 220 ila 800 nm arasında tarandı. Antosiyanin içerikleri, spektrumları karşılaştırılarak belirlendi ve daha sonra UPLC-QTOF-MS ile doğrulandı. Ana saflaştırılmış antosiyaninler (siyanidin 3-O-galaktozid ve siyanidin 3-O-arabinozid) güçlü bir antioksidan yeteneğe sahipti ve Aβ kaynaklı nörotoksisite sıçanları arasında öğrenme ve hafıza bozukluğunu iyileştirdi. Bu sonuçlar bir araya getirildiğinde, simüle hareketli yatak kromatografisinin siyah aronyadan yüksek biyoaktif antosiyaninleri ayırmak için uygulanabilir ve etkili bir strateji olabileceğini göstermektedir.

Öztürk ve arkadaşları [44] Türkiye'de yetiştirilen iki siyah aronya çeşidi 'Viking' ve 'Nero'dan elde edilen fenolik bileşikleri, HPLC-DAD-ESI-MSn ile analiz etmişlerdir. Bu analizde kromatografik koşullar olarak kolon fırını sıcaklığını 35 °C ve C18 kolonu (250 × 4,6 mm; 5 µm) kullanmışlardır. Mobil faz 1 ml/dk akışta metanol/formik asit (95:5, v/v):su/formik asit (95:5, v/v) ve gradient olarak çalışmışlardır. Analiz 68 dk, hacmi de 5 µL olarak belirlemişlerdir. Metanol (95):formik asit (5) (v/v) kullanılarak yapılan üç ardışık ekstraksiyonla siyah aronyadan 1 dk içinde antosiyanin ve birçok yan maddeleri kapsamlı bir şekilde ekstrakte etmişlerdir. Her iki çeşitte toplam dört siyanidin glikoziti tespit etmiş ve toplam antosiyaninler (425-438 mg/100 g taze ağırlık) aralığında belirlemişlerdir. Bunun yanında, aronyadaki fenoliklerin analizi üzerine UHPLC-DAD yöntemi geliştirmiş valide etmişlerdir.

Razboršek ve arkadaşları [45] kurutulmuş aronya meyvelerindeki belirli fenolik bileşiklerin ayrılmasında kullanılan klasik ekstraksiyon çözücülerini yerine yeşil bir alternatif olarak doğal derin ötektik çözücüler (NADES'ler) araştırmışlar ve dört tip

NADES sentezlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçları ekstraksiyon ortamı olarak %80 metanol ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırmışlardır. Sonuçta tek tek fenolik bileşikler için ekstraksiyon geri kazanımları fenolik bileşiğin yapısına büyük ölçüde bağlı olup, relatif ortalama değerler %70 ile %97 arasında bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, tek bir kromatografik çalışmada farklı alt sınıflara ait 21 fenolik bileşiğin eş zamanlı tanımlanması ve kantitatif tayini HPLC-DAD yönteminin optimizasyonu ve validasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Tirla ve arkadaşları [46] sporcularda yoğun fiziksel aktivitenin sonucu oluşan stresi en aza indirmeyi ve fizyolojik adaptasyonları desteklemeyi amaçlayan, Aronia melanocarpa ve arı poleninden elde edilen çoklu biyoaktif bileşiklere dayanan yeni ve karmaşık bir nutrasötik takviye geliştirmişlerdir. Aronya ve arı poleni kombinasyonlarına dayanarak oluşturulan yaklaşık bileşim, yağ asidi profili, bireysel polifenollerin tanımlanması ve miktar tayini, hammaddelerin ve farklı formülasyonların antioksidan kapasitesi spektrofotometrik yöntemler, GS-MS ve HPLC-DAD-MS-(ESI+) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şaşmaz ve arkadaşları [23] yaptıkları çalışmada, Türkiye'nin dört farklı ilinden elde edilen aronya meyve ve yapraklarının (Nero ve Viking türleri) fenolik profili, şeker bileşimi ve antioksidan kapasiteleri incelemişlerdir. Meyvelerde fenolik asit ve türevleri, flavonoller, antosiyaninler ve flavonoller olmak üzere toplam 21 fenolik madde, yapraklarda ise fenolik asit ve türevleri, flavonoller ve flavonoller olmak üzere toplam 19 fenolik madde belirlemişlerdir. Ekstraksiyon işlemi için %80 MeOH çözeltisi, fenolik bileşiklerin analizi LC-DAD-ESI-MS/MS kullanmışlardır. HPLC sistemi ODS kolonu (4,6 × 250 mm), çözücü A: su/formik asit (99:1; h/h) ve çözücü B: asetonitril/çözücü A (60:40; h/h) şeklinde iki çözücülü bir mobil fazdan oluşmaktaydı. Pikler kolon sıcaklığı 25°C'de, 0,5 mL/dakika akış hızı kullanılarak, DAD ile tayin edildi. Bursa ilinden elde edilen örneklerde fenolik bileşiklerin toplam miktarı hem meyvelerde hem de yapraklarda en yüksek bulunmuştur. Cis 5-O-p-kumaroilkinik asit ve sekoksiloganin ilk kez hem meyvelerde hem de yapraklarda ölçülmüştür. Sonuçta, farklı coğrafi konumların meyve ve yaprakların fenolik maddelerini, şeker içeriklerini ve antioksidan aktivitelerini önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur.

Lin ve arkadaşları [47] *Aronia melanocarpa*'dan antosiyaninlerin ekstraksiyonu için zaman kazandıran, verimli ve çevre dostu bir ultrasonik-mikrodalga destekli doğal derin ötektik çözücü (UMAE-NADES) ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve ekstraksiyon çözücüsü olarak kolin klorür-gliserol seçmişlerdir. Antosiyaninlerin ekstraksiyon hızı, geleneksel etanol yöntemi, doğal derin ötektik çözücü ekstraksiyon yöntemi ve ultrasonik mikrodalga destekli etanol yöntemi kullanılarak elde edilenlerden daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. Siyanidin-3-O-galaktozit, siyanidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-arabinozit, siyanidin-3-O-ksilozit, siyanidin-3,5-O-diheksosid ve dimerini içeren altı antosiyanin siyanidin-heksosid tanımlanmış ve HPLC-MS kullanılarak 448,873 mg/g saflıkta ekstrakte etmişlerdir. Sonuç olarak UMAE-NADES kullanılarak ekstrakte edilen bileşikler, diğer üç yöntemle ekstrakte edilenlerden daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu UMAE-NADES, biyoaktif maddelerin çıkarılmasında önemli bir verimlilik gösterdiğini görmüşlerdir.

Stanoeva ve arkadaşları [48] antosiyanin belirteçlerini belirlemek ve bunları yaban mersini, aronya ve nar içeren ticari meyve sularının sahte olup olmadığını tespitinde kullanmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 18 ticari meyve suyunun kalitatif ve kantitatif analizini HPLC/DAD/MSn cihazında C18 kolonda (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) mobil faz 0,04 mL/dk akışta su-formik asit (2%, v/v) ve asetonditriden oluşan ve örnek hacmi 50 µL olduğu gradient sistemde yapmışlardır. Tüm piklerden gelen spektral veriler 190 ile 600 nm aralığında toplanmıştır. MS verileri pozitif iyonizasyon modunda elde edilmiştir. Tam tarama, m/z 100–1200 kütle aralığını kapsamıştır. Antosiyaninlerin ayrımı ve miktar tayini HPLC/DAD kullanılmıştır. Kromatogramlardaki çeşitli bileşiklerin tanımlanması, bunların alıkonma zamanlarının ve UV spektrumlarının gerçek bileşikler ve literatür verileriyle karşılaştırılmasına dayanıyordu. Polifenolik bileşiklerin konjuge formları, elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrik tespiti ile daha da karakterize edilmiştir. Miktar tayini, 520 nm'de standartların beş noktalı kalibrasyon eğrileri ($R^2 \geq 0.999$) kullanılarak doğrudan HPLC/DAD ile gerçekleştirilmiştir. Delfinidin 3,5-diglikozid, siyanidin-3,5-diglikozid ve pelargonidin 3,5-diglikozidin nar için, siyanidin-3-galaktozitin aronya için ve malvidin ve delfinidin türevlerinin içeriğinin yaban mersinini likapa meyvelerinden ayırt etmek için belirteç olarak kullanılabileceği bulunmuştur. Antosiyanin içeriğine ilişkin kantitatif veriler, meyve içeriğini tahmin etmek için kullanılan tek tek ve toplam

antosiyenin içeriklerinin aralıklarını belirlemek için kullanılmıştır. Belirlenen belirteçlere dayanarak, çalışmada 15 meyve suyu örneğinin ilan edilen meyveleri içerdiği için gerçek olduğu ortaya konmuştur, ancak bunların altısının ilan edilen meyve içeriğinden beklenenden daha düşük toplam antosiyenin içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Farklı meyveler içeren meyve sularında antosiyenin kökenini ayırt etmek ve tüm mevcut meyvelerle ilişkilendirmek zor olsa da, toplam antosiyenin içeriği yine de meyve içeriğini tahmin etmek ve dolayısıyla kalite kontrol için kullanılabilir.

Zengin ve arkadaşları [49] kara dut, aronya ve mürver, potansiyel antioksidan özelliklere sahip bileşikler olan fitokimyasalların birincil antosiyaninlerini LC-MS/MS kullanılarak tanımlanmıştır. Liyofilize edilmiş ve toz haline getirilmiş meyve numuneleri metanol:su:hidroklorik asit (70:29,9:0,1, v/v/v) ile ekstre edildi. Analizler RP-C18 Inertsil ODS-4 (2,1x50 mm; 3 µm) kolonda ve 0,3 mL/dk akış hızında gerçekleşmiştir. Mobil faz olarak, metanol ve %2 asetik asitten oluşmuştur. Kolon sıcaklığı 40oC'dir. Tek tek fenolik bileşikler, tokoferoller ve amigdalin HPLC-DAD ile ölçülmüştür. Element içerikleri, ICP-OES ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, değerlendirilen meyve ve yapraklarda birincil ve ikincil bileşiklerin önemli varlığını ortaya koymaktadır ve meyve türlerine ve genotiplerine bağlı olarak önemli farklılıklar göstermektedir. En bol bulunan bileşikler fenolik asitler ve flavonoidlerdir. Analizler, klorojenik asit, rutin ve siyanidin türevlerinin tüm meyve türlerinde baskın fenolik bileşikler olduğunu, fenolik asitler ve flavonoidlerin ise yaprak örneklerinde belirgin olduğunu gösterdi. En yüksek klorojenik asit karadut yapraklarında belirlendi (2403,23 ila 3542,53 mg/100 g arasında). Genel olarak, fenolik bileşiklerin konsantrasyonu bitkinin meyvelerinden ziyade yapraklarda daha yüksekti. En yüksek amigdalin konsantrasyonu karadut meyvelerinde tespit edildi ve 102,12 ila 272,46 mg/100 g arasındaydı. Kalsiyum ve potasyum hem meyvelerde hem de yapraklarda baskın elementlerdi. Bu çalışma, bu türlerin meyve ve yaprak örneklerinin polifenol bileşikleri açısından zengin olduğunu ve genotipler arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir. Genel olarak, sonuçlar meyve ve yaprak örneklerinin birçok değerli kimyasal bileşik içerdiğini desteklemektedir. Klorojenik asit, rutin ve siyanidin-3-O-glukozit ve siyanidin-3-O-galaktozitin sırasıyla başlıca fenolik asit, flavonol ve antosiyenin olduğu doğrulanmıştır. Hem meyveler hem de yapraklar yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşiklere sahipti. Ayrıca meyveler yüksek konsantrasyonlarda antosiyenin içerir. Elde

edilen sonuçlar literatüre benzerdir ancak genotiplere, ekstraksiyon yöntemine ve çözücülere bağlı olarak farklılıklar vardır.

Zhu ve arkadaşları [50] *Aronia melanocarpa*'da bulunan antosiyaninleri tanımlamak için UV-VIS, HPLC-DAD ve LC-EIS/MS yöntemlerini kullanarak çalışma yapmışlardır. HPLC-DAD analizinde, 30°C'de C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm) kolonu, mobil faz 1 mL/dk akışta gradient sistemde %2,5 asetik asit ve asetonitril kullanmışlardır. Kromatografik koşullarda dalga boyu 520 nm ve örnekler 5 µL enjekte edilmişlerdir. Dört önemli antosiyanini siyanidin-3-galaktozit (%68,68), siyanidin-3-arabinozit (%25,62), siyanidin-3-glukozit (%5,28) ve siyanidin-3-ksilozit (%0,42) olarak tanımlamışlardır. İçeriği en yüksek olan üç antosiyanin antioksidan aktivitesi toplam antosiyaninlerle incelendi. Antioksidan kapasitesi siyanidin-3-galaktozit > toplam antosiyanin > siyanidin-3-arabinozit > siyanidin-3-glukozit şeklindedir. Dört antosiyanin örneğinin aktivitesi askorbik asitten daha büyük olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada açıklanan metodoloji antosiyaninlerin tanımlanması için etkili bir araç sağlayacaktır. Sonuçlar aronyadan elde edilen antosiyaninlerin etkili antioksidan aktivite gösterdiğini göstermektedir. Her bir deneyin sonuçlarının *Aronia melanocarpa*'dan elde edilen antosiyaninlerin antioksidan yeteneği siyanidin-3-galaktozit > toplam antosiyanin > siyanidin-3-arabinozit > siyanidin-3-glukozit > askorbik asit şeklinde olduğunu belirtmişlerdir.

Özdemir ve Özkan [6], aronya meyvelerinin kimyasal bileşimi, biyolojik aktiviteleri, fitokimyasal çalışmaları ve konuyla ilgili güncel araştırmalardan oluşan bir derleme yapmışlardır. Bu derlemenin aronya bitkisinin gıda veya çeşitli ürünler şeklinde kullanımı için kaynak olmasını amaçlamışlardır. Çalışmada aronyanın biyoaktiviteden sorumlu başlıca molekülleri ve miktarları hakkında bilgiler verilmiştir. Ayrıca güçlü antioksidan aktivitesi nedeniyle birçok kronik ve dejeneratif hastalık üzerinde tedavi edici etkisi olduğuna, ayrıca antiinflamatuar, antidiyabetik, antimutajenik ve kardiyoprotektif aktivite gösterdiğinden bahsetmişlerdir.

Zielinska ve arkadaşları [51] aronya meyvelerinin gelişimi ve olgunlaşması sırasında klorojenik asitlerin ve antosiyaninlerin içeriğindeki değişiklikleri belirlenmesi üzerine çalışmışlardır. Meyve ekstraktların kimyasal bileşimini NMR spektroskopisi ve HPLC-DAD ile belirlemişlerdir. HPLC yöntemi klorojenik asitlerin ve antosiyaninlerin

eş zamanlı olarak tespit edilmesini sağlar. Kromatografik ayırmalar 35°C'de C18 kolonda (250 mm × 4,6 mm; 5 µm) gerçekleştirildi. Otomatik örnekleyicinin sıcaklığı 10°C'ye ayarlandı. Analiz için %4,5 formik asit ve asetonitrilden oluşan bir mobil faz gradient sistemi kullanıldı. Antosiyaninlerin kromatogramları 520 nm'de ve klorojenik asitlerin kromatogramları 330 nm'de kaydedildi. Sonuçlar, klorojenik asitlerin ve antosiyaninlerin içeriğinin olgunlaşma sırasında değiştiğini ve hasat zamanına ve yetiştirme bölgesine bağlı olduğunu gösterdi.

Zielinska ve arkadaşları [52], aronya yapraklarından elde edilen ekstraktların şeker ve fenolik analizlerini spektroskopik (NMR) ve kromatografik (HPLC-DAD/RI, GC-MS) yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC'ler) üzerinde yapılan in vitro çalışmada ekstraktların anti-inflamatuar aktivitesini araştırmak amacıyla deneyler gerçekleştirmişlerdir. Yaprakların bitkisel çaylarda kullanılma potansiyeli nedeniyle çözücü olarak su seçilmiştir. Yaprak özlerinin nitel ve nicel analizleri HPLC-DAD kullanılarak gerçekleştirildi. Klorojenik asitlerin ve antosiyaninlerin profilleri, eş zamanlı olarak C18 kolonu (250 mm x 4,0 mm; 5 µm) kullanılarak karakterize edildi. Analiz için %4,5 formik asit ve asetonitrilden oluşan bir mobil faz gradient sistemi kullanıldı. Antosiyanin kromatogramları 520 nm'de siyanidin-3-O-galaktozit için alıkonma zamanı 26,8 dk'dır. *Aronia melanocarpa* yaprakları zengin bir sorbitol kaynağı gibi görünmektedir ve bu nedenle infüzyon (bitki çayı) veya özütü, özellikle diyabet hastaları için diyetin değerli bir bileşeni olabilir. Yeşil ve kırmızı yaprak özleri, endotel hücreleri üzerinde oldukça güçlü bir anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Bu muhtemelen klorojenik asitlerin ve antosiyaninlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, hem yeşil yaprak özütü hem de kırmızı yaprak özütü, kurutulmuş/liyofilize edilmiş aronya meyveleri veya meyve tozları ile birlikte işlevsel çaylarda potansiyel olarak kullanılabilir.

Kim ve arkadaşları [53] yaptıkları çalışmalarla *Aronia melanocarpa*'nın Wistar sıçanlarında testosteron propiyonat (TP) kaynaklı benign prostat hiperplazisi (iyi huylu prostat büyümesi) üzerindeki yararlı etkilerini araştırmışlardır. *Aronia melanocarpa*'nın kurutulmuş meyveleri, dört özüt (T1~T4) elde etmek için farklı özüt koşulları altında (sıcaklık, 30°C veya 100°C; özüt çözücüsü, %60 veya %100 etanol) hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu kullanılarak çıkarıldı. Dört *Aronia melanocarpa* özütünden, %100 etanol/düşük sıcaklık (30 °C) koşulu altında ekstrakte edilen T1, sıçanlarda TP

kaynaklı prostat hiperplazisi üzerinde en büyük inhibitör aktiviteyi gösterdi. Özütteki biyoaktif bileşenler LC/MS ve HPLC analizleri kullanılarak belirlendi. LC/MS analizinde, ana antosiyanin ve fenoliklerin seviyeleri T1'de diğer özütlerle kıyasla önemli ölçüde daha yüksekti. Aroyia ekstraktındaki antosiyanin ve polifenollerin bağlı miktarları çoklu reaksiyon izleme (MRM) ile belirlendi. Kromatografik ayırma için, 5 µL aronya ekstraktı, mobil faz olarak A (%0,1 H₂O) ve B (%0,1 metanol) kullanılarak gradient sistemle 0,35 mL/dakika akış hızında doğrudan bir Synergi Fusion kolonuna (2,6 µm, 2,1 × 50 mm) enjekte edilerek gerçekleştirildi. Kantitatif çalışma T1'deki siyanidin-3-glikoz ve siyanidin-3-ksiloz içeriklerinin diğer özütlerle kıyasla 1,27~1,67 ve 1,10~1,26 kat daha yüksek olduğunu gösterdi. Bulgular, biyoaktif bileşen olarak antosiyaninler içeren *Aronia Melanocarpa* özütünün testosteron kaynaklı prostat hiperplazisinin gelişimini hafiflettiğini ve bu özütün prostat büyümesi ve iyi huylu prostat büyümesi tedavisinde terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Kim ve arkadaşları [54] Kore'de yetiştirilen aronya, yaban mersini, Kore ahududu, böğürtlen, dut ve kırmızı ahududu meyveleri toplam fenol içeriği (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC), toplam antosiyanin ve askorbik asit içeriği açısından değerlendirildi. Tüm meyveler, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil serbest radikal temizleme aktivitesi, 2,2'-azino-bis(3 etilbenzotiazolin)-6 sülfonik asit serbest radikal temizleme aktivitesi ve ferrik indirgeyici antioksidan gücü olarak belirlenen antioksidan aktiviteleri açısından denendi. Aronyadaki bireysel fenolik bileşikler ayrıca yüksek performanslı sıvı kromatografisi/ kuadropol uçuş zamanlı kütle spektrometresi kullanılarak tanımlandı. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu %70 metanol ile yapıldı. Fenolik asitlerin ve flavonoidlerin analizini C18 kolonlu (4,6 mm×250 mm ID, 5 µm), HPLC-DAD sistemi kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Ayırma, gradient sistemde hareketli faz, %0,1 formik asit içeren %10 asetonitril (çözücü A) ve %0,1 formik asit içeren %90 asetonitrilden (çözücü B) oluşuyordu. Akış hızı 1,0 mL/dak, enjeksiyon hacmi 20 µL ve tespit dalga boyu 280 nm olarak belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda aronya ve Kore ahududuları en yüksek TPC, TFC ve toplam antosiyanin değerlerini gösterirken, kırmızı ahududu en yüksek askorbik asit içeriğine sahip olduğu ve antioksidan değeri en yüksek olan meyvenin aronya olduğu sonucuna varmışlardır. Ek olarak, bireysel fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi HPLC ve HPLC/Q-TOF MS kullanılarak gerçekleştirildi.

Kusznierewicz ve arkadaşları [55] yaygın olarak kullanılan tarama reaktifleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,20-azinobis-(3 etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) veya FCR (Folin–Ciocalteu'nun fenol reaktifi) ile tespit edilen antioksidanların ayrılması ve çevrimiçi tayini için HPLC ile birleştirilmiş ticari olarak temin edilebilen bir kolon sonrası türevlendirme cihazı ile çalışmışlardır. HPLC–DAD sistemi, C18 kolonu (4,6 mm 150 mm, 5 µm) mobil faz %4,8 (h/h) sulu formik asit (çözücü A) ve metanolden (çözücü B) oluşmaktadır. Gradient sistemli akış hızı 0,7 mL/dak, enjeksiyon hacmini ise 2 µl olarak belirlemişlerdir. Optimizasyon sonucunda, analitik prosedürün temel parametreleri belirlenmiştir. Türevlendirme reaktiflerinin konsantrasyonları DPPH ve ABTS için sırasıyla metanolde 1,5 mmol/L ve 2,1 mmol/L ve suda %40 (h/h) FCR çözeltisi; reaktör sıcaklıkları ABTS ve FCR için 130°C ve DPPH durumunda 50°C olarak belirlemişlerdir. Bu prosedürleri doğrulamak amacıyla, kolon sonrası türevlendirme (çevrimiçi) ve tipik parti kolorimetrik yöntemlerle (çevrimdışı) elde edilen standart antioksidanlar için Trolox eşdeğer antioksidan kapasiteleri (TEAC'ler) karşılaştırıldı; ilgili ölçümlerin güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bulmuşlardır (sırasıyla DPPH, ABTS ve FCR için Pearson korelasyon katsayısı: 0,973; 0,922; 0,853). Standart antioksidanlar ve gerçek meyve örneği-aronya özütü için elde edilen sonuçlar, önerilen sistemin antioksidanların çevrimiçi tespitine uygulanabilirliğini doğrulamaktadır. Mevcut rutin yöntemlere kıyasla en büyük avantajı, hem kromatografik profilleri hem de antioksidanların (bilinmeyenler dahil) ilgili parmak izlerini sağlaması ve antioksidan potansiyelin-toplam ve tek tek bileşikler ile kantitatif belirlenmesidir.

Rousseau [56] HPLC kullanarak aronyada bulunan antosiyaninleri tanımlamak ve ölçmek için bir çalışma prosedürü oluşturmayı amaçlamıştır. Çalışmada aronya meyvelerinin ekstraksiyonu sitrik asitle asitleştirilmiş metanol kullanılarak yapılmıştır. Bu örnekler daha sonra siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-ksilozit ve pelargondin-3-glukozit olmak üzere dört analitik standartla karşılaştırılmıştır. HPLC sisteminde mobil faz olarak asetronitril ve %0,1 trifloroasetik asitten oluşan 1,0 mL/dk akış hızlı gradient sistem kullanmıştır. Enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Analizler UV dedektör ile 520 nm'de yapılmıştır. Araştırma sonucunda toplam antosiyanin konsantrasyonlarının kullanılan analiz yöntemine (HPLC veya kolorimetrik) göre değiştiğini ve HPLC'nin toplam antosiyanin içeriğinin en yüksek değerlerini gösterdiği, aronya meyvelerinin

ekstraksiyonunda asitleştirilmiş metanolün, daha yüksek verimli bir çözücü olduğu bulunmuştur.

Meng ve arkadaşları [57] yaptıkları çalışmada, *Aronia melanocarpa* bitkisinin antosiyanin bileşimini analiz etmek, yüksek saflıktaki antosiyaninlerini izole etmek, bu antosiyaninlerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek ve bunların gıdalarda kullanım potansiyelini araştırmayı amaçlamışlardır. Antosiyaninler, kromatografi ile birleştirilmiş iyon değişim reçinesi kullanılarak saflaştırılmış ve HPLC-MS kullanılarak tanımlanmıştır. Daha sonra, antosiyaninlerin antioksidan aktivitelerini farklı kit yöntemleri kullanılarak belirlemiş ve saflaştırılmış antosiyaninlerin potansiyel uygulamasını domuz yağında test etmişlerdir. Antosiyaninler absorban reçine kullanılarak saflaştırıldıktan sonra, siyanidin-hekzosidin dimeri olan siyanidin-3,5-diheksosid, siyanidin-3-O-(galaktozit, glukozit, arabinozit, ksilozit) ve delfinidin-3-O-rutinozit de dahil olmak üzere toplam 7 farklı antosiyanin HPLC-MS kullanılarak tanımlanmış, siyanidin-3,5-diheksozit ve siyanidin-heksozitin bir dimeri ilk kez *Aronia melanocarpa*'da bulunmuştur. Ayrıca, absorban reçine ve yarı-preparatif ters faz HPLC kullanılarak saflaştırılan antosiyaninlerden HPLC kullanılarak siyanidin-3-O-(galaktozit, glukozit, arabinozit, ksilozit) tanımlanmıştır. Sonuçlar antioksidan testlerinin, antosiyaninlerin antioksidan kapasitesinin, antosiyaninlerin saflığının artırılmasıyla önemli ölçüde iyileştirilebileceğini ve saflaştırılmış antosiyaninlerin domuz yağı için iyi bir antioksidan olduğunu göstermiştir.

Milutinović ve arkadaşları [58] antosiyaninler ve flavonoidlerin kantifikasyonunu HPLC cihazı kullanarak spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirmişlerdir. Aronya preparatlarının ve ana antosiyanin bileşiği olan siyanidin-3-O-galaktozitin, kendiliğinden oluşan, asetilkolin ve KCl ile uyarılan ileum düz kas kasılması üzerindeki etkisi ile histamin, CaCl_2 ve BaCl_2 ile uyarılan kasılmalar ve nitrik oksit sentaz inhibitörü (L-NAME) varlığındaki kasılmalar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Kurutulmuş meyveler %50 etanol ile ekstrakte edilmiş ,ekstrakt ve meyve suyundaki aktif bileşiklerin analizi için, DAD dedektörlü, RP-18 analitik kolonlu (250×4 mm, 5 μm) bir HPLC cihazı ters faz olarak kullanılmıştır. İncelenen tüm preparatlarda en bol bulunan bileşikler antosiyaninler, özellikle siyanidin heterozitleri olduğu görülmüş, polifenol ve antosiyaninlerin en yüksek içeriği aronya atık özütünde bulmuşlardır. Aronya preparatlarının arasında etanolik özütün en yüksek flavonoid konsantrasyonuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Aronya preparatlarının ve

siyanidin-3-O-galaktozitin, konsantrasyona bağılı bir şekilde sıçan ileumunu kendiliğinden ve indüklenen kasılmalarla önemli ölçüde gevşettiğini bulmuşlardır. Çalışmanın, aronya preparatlarının izole sıçan ileumunda kasılmaları gevşetebildiğini belirtmişlerdir.

Minkiewicz ve arkadaşları [59] UV spektroskopisi ile birlikte ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak, siyah aronyadaki başlıca antosiyaninler olan siyanidin 3-O- β -D-galaktopiranosid ve siyanidin 3-O- α -L-arabinopiranosid'in tanımlanması için bir yöntem önermektedir. Meyve örnekleri metanol ve HCl içeren bir çözelti ile katı faz ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Kromatografik analiz, PDA dedektörlü, 250 $\times$ 4,6 mm boyutunda Hi-Pore RP 318 kolonlu bir HPLC sisteminde gerçekleştirilmiştir. Antosiyanin özütünün standart ve liyofilizat örnekleri metanolde çözülmüş, enjeksiyon hacmi 5 ila 20 μ l arasında değiştirilmiştir. Çözücüler A ve B, sırasıyla 100:900:1 (h/h/h) ve 900:100:0,7 (h/h/h) oranında asetonitril, su ve trifloroasetik asitten oluşmaktaydı. Ayrımlar, 30°C'de 0,8 ml/dak akış hızında gradient olarak gerçekleştirildi. Standart spektrumlar ile siyah aronya özütünün ana bileşenlerinin spektrumları arasındaki benzerlik endekslerini hesaplamışlardır. Hesaplamaları sıfırıncı derece spektrumlar ve birinci-beşinci türevler için yapmışlardır. UV spektrumlarının ikinci ve üçüncü türevleri, siyah aronyadan elde edilen majör antosiyaninler gibi benzer yapıya sahip bileşiklerin tanımlanması için kullanılabileceği görülmüştür. Spektrumların üçüncü türevlerinin, antosiyanin standartlarının spektrumlarının türevlerine benzerliğinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle üçüncü türevin UV spektroskopisi antosiyaninleri tanımlamak için bir araç olarak önerilebileceğini belirtmişlerdir.

Niesen ve arkadaşları [60] lipid metabolizmasını etkileyen bileşikleri belirlemek için siyah aronya, kıızılcık ve nar ekstraktlarının fraksiyonlamalarını gerçekleştirmişlerdir. Ekstraktlar, adsorban reçine ile meyve suyu konsantrelerinden hazırlandı ve bir kopigment ve bir antosiyanin fraksiyonuna ayrıldı, ardından hekzan çöktürmesi yoluyla bir polimer ve monomerik fraksiyona fraksiyonlandı. Kıızılcık ve nar kopigment fraksiyonlarının daha fazla fraksiyonlanması için yüksek performanslı karşı akım kromatografisi (HPCCC) kullanıldı. Her fraksiyondaki bileşikler HPLC-ESI-MS/MS ile tanımlanmış ve kantitatif tayini analizleri UHPLC-DAD ile gerçekleştirmişlerdir. Her (alt) fraksiyonu fosfodiesteraz 3B (PDE) aktivitesi, lipid birikimi ve 3T3-L1 hücrelerinde lipoliz olmak üzere üç in vitro deneyde test etmişlerdir.

Sonuçlar çeşitli fraksiyonların ve alt fraksiyonların lipit birikimini ve PDE aktivitesini inhibe edebileceğini ve lipolizi, özellikle kopigmentleri artırabileceğini gösterdi. Genel olarak sonuçların, polifenol açısından zengin (alt) fraksiyonların lipit metabolizması üzerinde bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Ostberg-Potthoff ve arkadaşları [61] aronya, nar ve kırmızı üzüm özütlerinde glikoz metabolizmasını etkileyen bileşikler için aktivite rehberli fraksiyonlama yapmışlardır. Üç özüt, antosiyaninleri diğer renksiz fenolik bileşiklerden (kopigmentler) ayırmak için membran kromatografisi yoluyla fraksiyonlara ayrılmış, polimerleri izole etmek için heksan ile çöktürme gerçekleştirmişlerdir. Aronya, nar ve kırmızı üzümün antosiyanin ve kopigment fraksiyonları ayrıca yüksek performanslı karşı akım kromatografisi (HPCCC) ile fraksiyonlara ayrılmış ve alt fraksiyonları HPLC-PDA-MS/MS analizleri ile karakterize etmişlerdir. Antosiyaninler ve kopigmentler, su/asetonitril/formik asit (95/3/2; h/h/h) (çözücü A) ve su/asetonitril/formik asit (48/50/2; h/h/h) (çözücü B) kullanılarak gradient sistemde 200 µL/dk akış hızında bir C18 (150 × 2,0 mm, 3µ) kolonunda ayrıldı. ESI kaynağı, nebulizatör olarak azot (50 psi) ve kurutma gazı (10 L/dk, 365°C) kullanılarak pozitif modda (antosiyaninler), negatif modda (kopigmentler) ve alternatif modda (+/- 3000 V) çalıştırıldı. Örnek özütleri 2 mL çözücü A'da çözölmüş ve her bir örneğin 5 µL'lik alikotları HPLC-PDA-ESI-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Alt fraksiyonların her birini α-amilaz ve α-glukozidaz aktivitesinin inhibisyonuyla incelemişlerdir. PDA ile analizde ayırım, bir 5 µ; 150 × 2,1 mm kolonu üzerinde gerçekleştirildi. Analizler, %5 formik asitli çözücü A ve çözücü B asetonitril kullanılarak 200 ve 400 µL/dk akış hızlarında gradient sistemle gerçekleştirildi. Antosiyaninler dalga boyu 520 nm'de ve kopigmentler dalga boyu 280 ve 320 nm'de tespit edildi. Bu taramanın temelinde, iki enzimin birkaç güçlü inhibitörü tanımlanabildi; bunlar arasında flavonoidler (örn. kuersetin), ellagitanninler (örn. pedunkülagin) ve antosiyaninler (örn. delfinidin-3-glukozid ve petunidin-3-glukozid) yer alıyordu. α-glukozidaz deneyinde, meyve özlerinin incelenen tüm fraksiyonlarının ve alt fraksiyonlarının pozitif kontrol akarboz'dan daha aktif olduğunu bulmuşlardır.

Imai ve arkadaşları [62] yaptığı çalışmada aronya suyunda α-glukozidaz inhibitörlerini bulmayı amaçlamışlardır. Aronya (*Aronia melanocarpa*), siyanidin-3,5-diglukozid de dahil olmak üzere birçok polifenol içerir ve bu polifenoller tip 2 diyabet ve obezite gibi yaşam tarzıyla ilişkili hastalıklar üzerinde yararlı etkilere sahiptir. Tip 2 diyabet ve obezite modeli KKA^y farelerinde, aronya suyuyla desteklenmiş içme

suyunun, siyanidin-3,5-diglukozid tarafından dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) aktivitesinin inhibisyonu yoluyla kısmen kan glikoz seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Aronya suyundaki polifenollerini önce ters fazlı bir kolonda flaş kromatografisi kullanılarak ayırmışlardır. İnhibitör aktiviteye sahip fraksiyonu, ters fazlı HPLC kullanılarak tekrar ayırmışlardır. Fraksiyonların LC-MS/MS analizi, bunların sırasıyla 3-kafeoilkinik asit (3-CQA) ve 4-kafeoilkinik asit (4-CQA) içerdiğini gösterdi. Her iki CQA'nın da DPP IV aktivitesini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Sonuçlar, aronya suyundaki kafeoilkinik asitlerin, meyve suyu tarafından tip 2 diyabetin iyileştirilmesinde önemli olduğunu göstermiştir.

Esatbeyoglu ve arkadaşları [63] *Aronia melanocarpa*'dan polifenollerin fraksiyonlanması ve izolasyonu için iki farklı kromatografik teknik kullanmışlardır. Bir yandan, *Aronia melanocarpa* posası'ndan antosiyaninler, fenolik asitler, kersetin-glikozitler ve favanonlar gibi polifenollerin fraksiyonlanması için yüksek hızlı karşı akım kromatografisi ve düşük hızlı döner karşı akım kromatografisi kullanmışlardır. Öte yandan, *Aronia melanocarpa* özütlerinin posası ve suyundan bir antosiyanin ve bir yardımcı pigment fraksiyonunda ön ayrıştırılması, polimerik prosiyanidinlerin etanol ile çöktürülmesiyle uzaklaştırılmasının ardından membran kromatografisi ile gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra, antosiyaninlerin ve yardımcı pigmentlerin ayrılması ve izolasyonu preparatif karşı akım kromatografisi ile yapmışlardır. İzole edilen bileşiklerin saflık kontrolünü ve tanımlanmasını HPLC-PDA, HPLC-ESI-MSⁿ ve ¹H- ve ¹³C- NMR spektroskopisi ile yapmışlardır. Çeşitli bileşikleri, örneğin klorojenik asitler, izoramnetin-, apigenin-, luteolin- ve taksifolin- türevleri, ilk kez *Aronia melanocarpa* için tanımlamışlardır.

Ćujić ve arkadaşları [64] kurutulmuş aronya özütünün kronik tüketiminin potansiyel faydalı etkilerini in vivo çalışmada değerlendirmişlerdir. Çalışma, kendiliğinden hipertansif sıçanlarda hemodinamik parametreler, lipid profili ve oksidatif strese odaklanmaktadır. Ekstrakt, en yaygın ekstraksiyon tekniği olan maserasyon kullanılarak kurutulmuş aronya meyvelerinden hazırlanmıştır. Öğütülmüş ve elenmiş meyveler, katı-çözücü oranı 1:20 olup etanol-su karışımında (%50) hazırlanmıştır. Kurutulmuş aronya özütünü HPLC-DAD yöntemi ile karakterize etmişlerdir ve tek tek antosiyaninleri, fenolik asitleri ve flavonoidleri belilemişlerdir. Antosiyaninlerin, flavonoidlerin ve fenolik asitlerin miktar tayini için kurutulmuş aronya özütünü, HPLC-DAD sistemi ile, ters fazlı RP-18 analitik kolonunda (250 × 4 mm, 5 µm) analiz

etmişlerdir. Antosiyaninleri %10 formik asit suda ve asetonitrilden oluşan mobil faz sistemi ile ayırmışlardır. Akış 1 ml/dk olan gradient sistemde dalga boyları 290, 350 ve 520 nm de çalışmışlardır. Miktar tayini, antosiyanin standartları siyanidin-3-O-galaktozit, siyanidin-3-O-glukozit ve siyanidin-3-O-arabinozitin kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapıldı. Polifenollerin, özellikle antosiyaninler açısından zengin olan kurutulmuş aronya özütünün dört haftalık uygulaması, muhtemelen önemli ölçüde artan diürez yoluyla ($P < 0,05$) kontrol grubuna kıyasla sistolik ($P < 0,05$), nabız basıncını ($P < 0,05$) önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Tedavi edilen grupta ayrıca plazma ve eritrosit TBARS'ında önemli bir azalma olduğunu bulmuşlardır. Kurutulmuş aronya özütü tüketimi, plazma FRAP'ı azaltarak lipid peroksidasyonunu azalttığını bulmuşlardır ($P < 0,01$). Tedavi edilen grupta süperoksit dismutaz aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu tespit etmişlerdir ($P < 0,01$). Bu sonuçların kurutulmuş aronya özütünün kardiyovasküler sağlık üzerinde yararlı etkiler gösterebileceğini ve arteriyel hipertansiyonda besin takviyesi olarak kullanılma potansiyeli olduğunu düşündüğünü vurgulamışlardır. Antosiyaninlerin, özellikle siyanidin türevlerinin ve klorojenik asitin en bol bulunan bileşikler olduğunu, ancak prosiyanidinlerin ve diğer biyoaktif polifenoliklerin de kurutulmuş aronya özütünde olduğunu belirtmişlerdir. Sistolik ve nabız basıncındaki azalmalarını, kurutulmuş aronya özütünün kandaki antioksidan etkileriyle ilişkilendirmişlerdir. Diürez kurutulmuş aronya özütü tarafından artırıldı ve sistolik kan basıncını düşürmenin ek bir mekanizması olabileceğini belirtmişlerdir. Kurutulmuş aronya özütünün, hipertansiyonu iyileştirmek için yararlı bir adjuvan tedavi veya fonksiyonel gıda olabileceğini vurgulamışlardır.

Corković ve arkadaşları [65] disakkarit ilavesinin aronya hidrojenlerinin polifenol bileşimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Hidrojelleri, aronya suyundan ve %2 karboksimetilselülozdan (CMC) %30, %40 veya %50 disakkarit (sükroz veya trehaloz) ilavesiyle hazırlamışlardır. Örnekleri disakkarit ilaveli hidrojeller (DART)-TOF/MS kullanılarak analiz etmişlerdir. Hazırlanan örnekleri, spektrofotometrik yöntemler kullanılarak toplam polifenoller, monomerik antosiyaninler ve antioksidan aktivite (FRAP, CUPRAC, DPPH, ABTS analizleri) açısından değerlendirmişlerdir. Tek tek polifenoller HPLC-DAD analizi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Ekstraktlarda ve aronya suyunda tek tek polifenollerin değerlendirilmesi için HPLC sistemi kullanmışlardır. Sistem C18 kolon ($4,6 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$) ile ortofosforik asit

(%0,1) ve metanoldan (%100) oluşan mobil fazdır. Enjeksiyon hacmi 5 μ L ve akış hızı 1 mL/dk gradient şeklindedir. Tanımlama, özütlerdeki piklerin alıkonma süreleri ve UV-VIS spektrumları karşılaştırılarak yapıldı. Tanımlamayı doğrulamak için özütlerle standartlar eklendi. Sonuçlar, %2 CMC hidrojellerine disakkaritlerin eklenmesinin toplam polifenollerde bir azalmaya neden olduğunu göstermiş ve bulgular, polifenollerin uygun şekilde tutulmasını sağlamak için uygun formülasyonun önemi doğrulamıştır.

Cho ve arkadaşları [66] yaptıkları çalışmada dondurularak kurutulmuş etanol özütlerinin (FEE'ler) ve saflaştırılmış aronya biyoaktif fraksiyonlarının (ABF'ler) başlıca bileşenlerinin içeriklerini karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Bu amaçlar için, %50 etanol ile hazırlanan dondurularak kurutulmuş etanol ekstraktlarını (FEE'ler) ve elde edilen %50 etanol ekstrelerini Diaion HP-20 reçineleri ile saflaştırılan aronya biyoaktif fraksiyonları (ABF'ler) karşılaştırmışlardır. Başlıca bileşenleri, ultraviyole-görünür spektrofotometre kullanılarak belirlerken, tek tek bileşikleri HPLC ile ölçmüşlerdir. Ayrı ayrı bileşiklerin miktar tayinini, %0,5 formik asit ve asetronitril içindeki %0,5 formik asit mobil fazlarına sahip bir Hector-M C18 kolonu (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) ile HPLC kullanılarak, gradient akış altında gerçekleştirmişlerdir. Sistemde 520 nm'de dalga boyunda 1 mL/dakika akış hızı ve 30°C kolon sıcaklığı kullanmışlardır. Her numune için enjeksiyon hacmi 10 μ L idi. Sonuç olarak, FEE'lerde toplam antosiyanin, proantosiyanidin ve flavonoid içerikleri sırasıyla %1,55, %7,95 ve %0,42 ve ABF'lerde sırasıyla %17,7, %38,0 ve %4,05 olarak tespit etmişlerdir. ABF örneklerindeki her kimyasal grubun toplam içeriği FEE örneklerinden 4,9 ila 11,4 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak, FEE örneklerinde tek tek şekerleri ve organik asitleri, %9,20 malik asit, %2,70 kinik asit, %18,1 fruktoz, %16,3 glikoz ve %25,4 sorbitolün belirlenmiş bileşimleriyle ölçmüşlerdir. Bu bileşikleri ABF örneklerinde tespit edememişlerdir. Ayrıca, ABF ve FEE örneklerinin biyoaktivitelerini, antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi kullanılarak değerlendirilerek karşılaştırmışlardır. ABF örneklerinin, FEE örneklerinden daha iyi antioksidan etkiler gösterdiğini belirtmişlerdir. İşlenmiş ABF örneklerinin toplu olarak, siyah aronya meyvelerinin biyoaktivitesini artırarak, bunların yeni fonksiyonel gıdalar olarak etkili bir şekilde uygulanmasını sağladığını bulmuşlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2023-2024 yılları arasında yapılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Alet ve Diğer Gereçler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, alet ve gereçler aşağıda görülmektedir.

3.1.1. Kimyasal Maddeler

1. Siyanidin-3-arabinozit standardı (PhytoLab 89614-10 mg)
2. Siyanidin-3-galaktozit standardı (PhytoLab 89463-10 mg)
3. Siyanidin-3-glukozit standardı (PhytoLab 89616-10 mg)
4. Fosforik asit (Analitik saflıkta %85, Interlab)
5. Glasiyel asetik asit (Analitik saflıkta %100, Interlab)
6. Asetonitril (HPLC saflıkta, 100030 Merck)
7. HCl (Analitik saflıkta %37, 100317 Merck)
8. Metanol (HPLC saflıkta, 106007 Merck)
9. Ultra saf su (HPLC saflıkta, Elga)

3.1.2. Aletler ve Diğer Gereçler

1. HPLC Cihazı (Shimadzu LC 20A, LC Solution yazılımlı)
DGU-20A5 Vakumlu gaz giderici
LC 20 AT Pompa
SIL-20AC Otomatik numune örnekleyici
Analitik kolon: Phenomenex, Gemini C18, (5µm, 150 x 4,6 mm I.D.)
CTO-10A Kolon fırını
SPD-M20A Diyod Sıralı Dedektör
2. Ultra saf su cihazı (Elga Purelab Option Q, DV 25)

3. Karıştırıcı (Velp Scientifica)
4. Terazî (Denver, TB 215D)
5. pH metre (Mettler Toledo)
6. Ultrasonik banyo (Ultrasonic LC 30H)
7. Otomatik pipetler (Eppendorf 5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000µL ve 0,5-5000µL)
8. Yuvarlak tabanlı cam tüpler
9. Huniler
10. Cam damlalıklar
11. Beherler (50 ve 100 ml)
12. Balonjojeler (2, 5, 10, 25, 50, 100 ve 1000 mL)
13. Cam vial, septum, kapak
14. Enjektör (5 mL)
15. Enjektör ucu filtreler (PTFE 0,45 µm)
16. Adi süzgeç kağıtları

3.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1. Stok Standart Çözeltileri

Siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit standartlarından 1'er mg analitik terazide tartıldı. Bu tartımlar 10 ml balon jojelerde metanolla çözdürülerek hacmine tamamlandı. 100 µg/ml derişimde üç adet stok standart çözeltisi elde edildi.

3.2.1.1. Siyanidin-3-Arabinozit ve Siyanidin-3-Galaktozit Standart Çözeltileri

2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml lik doğrusallık çözeltileri stok standart çözeltiden sırasıyla 250 µL, 500 µL, 750 µL, 1000 µL ve 1250 µL alınarak hazırlandı. Alınan hacimler 10'ar ml balon jöjelere boşaltıldıktan sonra mobil faz ile hacmine tamamlandı.

3.2.1.2. Siyanidin-3-Glukozit Standart Çözeltileri

0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 4,0 µg/ml lik doğrusallık çözeltileri stok standart çözeltiden sırasıyla 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL ve 400 µL alınarak hazırlandı. Alınan hacimler 10'ar ml balon jöjelere boşaltıldıktan sonra mobil faz ile hacmine tamamlandı.

3.2.2. % 0,1 HCl MeOH Ekstraksiyon Çözeltisi

1 ml hidroklorik asit, 1000 ml balon jöjeye alınarak hacmi metanol ile tamamlanıp karıştırıldı.

3.2.3. Mobil Fazlar

MF-A: %1 Glasiyel Asetik Asit : ACN : Fosforik Asit (510:485:5) (h:h:h)

10 ml glasiyel asetik asit 1000 ml balon jöjeye alınarak distile su ile hacmine tamamlandı. Elde edilen % 1'lik glasiyel asetik asit çözeltisinin 510 ml'si, 485 ml asetonitril ve 5 ml fosforik asit asitle karıştırılarak degaze edildi. Çözelti pH'ı 1,996 olarak ölçüldü.

MF-B: % 0,5 Fosforik Asit Çözeltisi

5 ml fosforik asit 1000 ml balon jöjeye alınarak distile su ile hacmine tamamlandı. Karıştırılıp degaze edildi. Çözeltinin pH'ı 1.778 olarak ölçüldü.

Seyreltme Çözeltisi: Seyreltmelerde kullanılan mobil faz çözeltisi MF-A:MF-B (50:50, h:h) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.4. Numunelerin Hazırlanması

Analizde kullanılan numuneler Aronya Gıda ve Sağlık A.Ş firması tarafından bilimsel araştırmaya destek olarak sağlanmıştır.

3.2.4.1. Aronya Kuru

20,0 g tartılmış aronya kuru ilk olarak bir havanda ezilerek parçalandı. Numuneler 100 ml'lik balon jöjenin içerisine aktarıldı. Ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. 0,45 µm enjeksiyon ucu PTFE filtre ile süzüldü. Bu süzümden alınan 1ml numune çözeltisi 5 ml balon jöjeye aktararak hacmine mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile tamamlandı.

3.2.4.2. Liyofilize Aronya

20,0 g tartılmış liyofilize aronya ilk olarak bir havanda ezilerek parçalandı. Numuneler 100 ml'lik balon jojenin içerisine aktarıldı. Ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. 0,45 µm enjeksiyon ucu PTFE filtre ile süzüldü. Bu süzümden alınan 100 µl numune çözeltisi 10 ml balon jojeye aktarılarak hacmine mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile tamamlandı.

3.2.4.3. Aronya Suyu

1 ml aronya suyu 10 ml balon jojeye alındı. Hacmine %0,1 HCl MeOH çözeltisi ile tamamlandı. Bu çözelti vortekslenip 5 dk ultrasonik banyoda bekletildi. 0,45 µm enjeksiyon ucu PTFE filtrede süzüldü ve süzüntüden 1 ml alınıp 2 ml balon jojede hacmine mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile tamamlandı.

3.2.4.4. Aronya Kurusu Etanol Özütü

1,0 g toz numune 5 ml balon jojeye alınıp üzerine bir miktar % 0,1 HCl MeOH çözeltisi eklendi. 10 dk ultrasonik banyoda tutulduktan sonra hacmine tamamlandı. 0,45 µm enjeksiyon ucu PTFE filtereden süzüldü. Bu süzümden 1 ml alınıp 2 ml balon jojeye konulup üzeri mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile tamamlandı.

3.3. Analitik Metodun Geliştirilmesi için HPLC ile Yapılan Çalışmalar

3.3.1. Kolon, Kolon Sıcaklığı, Akış Hızı, Mobil Faz Bileşimi, Dalga Boyları ve Hassasiyet Seçimi

İncelenen çalışmalar sonucunda analitik metodun geliştirilmesi için yapılan HPLC çalışmalarında C₈; CN; C₁₈ ve 2,7;4;5 µm partikül çaplı kolonlarla birlikte formik asit-asetonitril; formik asit-metanol; asetik asit-asetonitril-fosforik asit; asetik asit-asetonitril mobil faz sistemleri farklı oranlarda gradient ve izokratik olarak uygulanarak, farklı akış hızlarında, farklı kolon sıcaklıklarında ve farklı dalga boylarında denemeler yapıldı. Elde edilen optimum kromatografik koşulların sonuçları Bölüm 4.1.1'de görülmektedir.

3.3.2. Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit için hazırlanan stok çözeltilerin her birinden Bölüm 3.2.1.1 ve Bölüm 3.2.1.2'de yazıldığı gibi 10 mL'lik balon jojeye alındı ve mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile

hacmine tamamlandı. Elde edilen standard çözeltiler girdap karıştırıcı ile 1 dakika karıştırıldı ve vaillere konuldu.

HPLC sistemine 20 µL enjekte edilerek 520 nm’de dalga boyunda elde edilen piklerin alanları ölçüldü.

Hazırlanan standartların her biri 6 kez çalışıldı ve elde edilen pik alanlarından her bir etken madde için ölçü eğrisi hazırlandı. Ölçü eğrilerine ait regresyon sonuçları Bölüm 4.1.2’de görülmektedir.

3.4. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

Analitik metodun geliştirildikten sonra yöntemin validasyonu ICH Q2 (R1) [11] “Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodolojisi” kılavuzuna göre yapıldı.

3.4.1. Seçicilik

Yöntemin seçicilik parametresinin çalışmasında, standard çözelti, hazırlanan örnek çözeltiler ve mobil faz çözeltisi HPLC’de aynı koşullarda analiz edilerek herhangi bir girişim olup olmadığı incelendi. Elde edilen kromatogramlar Bölüm 4.2.1.’de görülmektedir.

Kabul kriteri:

Siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit pikleri arasındaki rezolüsyon en 1,5 olmalıdır.

Siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit alıkonma zamanlarında mobil faz ve çözücünden gelen herhangi bir pik olmamalıdır.

3.4.2. Aralık ve Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık aralığı parametresi için geliştirilen analitik metodun kabul edilebilir doğrusallık, tekrarnabilirlik ve hassasiyetle sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığında çalışılmasıdır. Bu doğrultuda siyanidin-3-arabinozit ve siyanidin-3-galaktozit için 2,5-12,5 µg/ml; siyanidin-3-glukozit için 0,25-4,0 µg/ml doğrusallık aralığında çalışıldı.

Doğrusallık aralığı çalışması için her 3 etken maddenin aynı balon jodede birlikte hazırlandığı 5 farklı konsantrasyonda Bölüm 3.3.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her bir etken madde için ölçü eğrisi grafikleri çizildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.2’de görülmektedir.

Kabul kriteri: Ölçü eğrisi grafiğinden bulunan korelasyon katsayısı (r) 0,99'dan küçük olmamalıdır.

3.4.3. Doğruluk

Yöntemin doğruluk parametresinin çalışmasında, aronya kurusu ve aronya suyu numunelerine standart katma yöntemi uygulandı. Aronya kurusu ve aronya suyu numuneleri Bölüm 3.2.4.1 ve 3.2.4.4'te yazıldığı gibi hazırlandı. Doğruluk çalışması için üç farklı konsantrasyonda çalışıldı. Hazırlanan aronya kurusu ve aronya suyu numunelerinden konsantrasyonları bilinen miktarda alındı ve üzerine siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit üç farklı konsantrasyonlarda eklendi, hacmine mobil fazdan oluşan seyreltme çözeltisi ile tamamlandı. Elde edilen pik alanları her biri için hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde hesaplandı. Hesaplanan geri kazanım verileri Bölüm 4.2.3'te görülmektedir.

3.4.4. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Yöntemin tekrarlanabilirliği parametresinin çalışmasında, aynı ve farklı günlerde siyanidin-3-arabinozit ve siyanidin-3-galaktozit için 2,5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 12,5 µg/ml; siyanidin-3-glukozit için 0,25 µg/ml, 1 µg/ml ve 4 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Elde edilen pik alanları her biri için hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde hesaplandı. Kesinlik sonuçlarında hesaplanan %RSD, ortalama ve SD değerleri Bölüm 4.2.4'te görülmektedir.

3.4.5. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Yöntemin LOQ ve LOD parametrelerinin çalışmasında, elde edilen ölçü eğrisi denklemlerinden faydalanarak aşağıdaki formüllere göre her bir etken maddenin LOQ ve LOD değerleri hesaplanmıştır. Formülde bulunan m değeri ölçü eğrisinin eğimini, σ değeri ise ölçü eğrisinin y kesişiminin standart sapmasını ifade etmektedir. Hesaplanan LOQ ve LOD değerleri Bölüm 4.2.5.'te görülmektedir.

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{m} \qquad LOD = \frac{3 \sigma}{m}$$

3.4.6. Stabilité

Yöntemin stabilité parametresinin çalışmasında, hazırlanan standart çözelti HPLC cihazının oto örnekleyici bölümünde 15°C'de ışıksız bir ortamda 24 saat

boyunca bekletildi ve analizler tekrarlanarak sonuçlar raporlanmıştır. Stabilité sonuçlarına ait veriler Bölüm 4.2.6.'da görölmektedir.

Kabul kriteri: Elde edilen pikler için başlangıçta elde edilen pik alanları sonuçları ile 24. saat sonundaki pik alanı sonuçları değışmemelidir. Hesaplanan % değeri % 99,0-%101,0 arasında olmalıdır.

3.4.7. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık parametresinin çalışmasında, mobil fazın akış hızı değışiminin ve kolon fırını sıcaklığının değışiminin analize olan etkisi incelenmiştir. Burada 0,8 ml/dk olarak belirlenen akış hızı 0,6 ml/dk ve 1,0 ml/dk şeklinde değıştirildiğinde elde edilen sonuçlar raporlanmıştır. Kolon sıcaklığı ise 30°C'den 28°C ve 32°C derecelere çekilerek sisteme olan etkisi incelenmiştir. Sağlamlık sonuçlarına ait veriler Bölüm 4.2.7.'de görölmektedir.

Kabul kriteri: Sağlamlık çalışması kapsamında metotta yapılan ufak değışikliklerden elde edilen sonuçlarda her üç etken maddeye ait kromatogramlarda rezolüsyon en az 1,5; teorik plaka sayısı 2000'den fazla ve kuyruklanma faktörü 2,0'den az olmalıdır.

3.5. Aronya İçeren Gıda Takviyelerinde Siyanidin-3-arabinozit, Siyanidin-3-galaktozit ve Siyanidin-3-glukozit Bileşiklerinin HPLC ile Analizi

Aronya içeren gıda takviyelerinden aronya kurusu, liyofilize aronya, aronya suyu ve aronya kurusu etanol özütü toz örnek Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı gibi hazırlandı. Geliştirilen ve validasyonu tamamlanan HPLC-DAD yöntemi ile analiz edildi. Her bir örnekten 3'er enjeksiyon yapıldı. Aronya içeren numunelerdeki siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit için elde edilen pik alanları her biri için hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde hesaplandı. Elde edilen miktar tayini sonuçları Bölüm 4.3'te görölmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Analitik Metodun Geliştirilmesi için HPLC ile Yapılan Çalışmalar

Aronya içeriğindeki siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit bileşenlerinin HPLC-DAD ile analizini gerçekleştirmek için kromatografik koşullar belirlendi. Kolon, kolon sıcaklığı, mobil faz bileşenleri ve sistemi, dalga boyu seçimi, akış hızı gibi belirlenen optimum koşullar ve bu koşullarda yapılan analizlerden elde edilen sonuçlara bu bölümde yer görülmektedir.

4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Kromatografik koşulların belirlenmesi için Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı gibi yapılan denemelerin sonucunda siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit piklerinin en iyi şekilde rezolüsyonu 30°C’de C₁₈ kolonda (150 mm x 4,6 mm; 5 µm); %1 glasiyel asetik asit:ACN:fosforik asit (510:485:5) (h:h:h) ve %0,5 fosforik asit (B) 0,8 mL/dk akışta olan mobil faz sisteminin gradient uygulanması (Tablo 4.1) ile elde edilmiştir. Diyot serili dedektörde her üç etken madde için de dalga boyu 520 nm olarak belirlenmiştir. Kromatografik koşulları belirlenen bu yöntemde siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozitin retensiyon zamanları sırasıyla 8,9; 9,5 ve 10,2 dakika olarak bulunmuştur.

Tablo 4.1: Mobil faz gradient sistemi

Zaman (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0,01	22	78
2,00	22	78
5,00	25	75
12,00	50	50
13,00	22	78
15,00	22	78

4.1.2. Ölçü Eğrilerinin Regresyon Analizi

Siyanidin-3-arabinozit, siyanidin-3-galaktozit ve siyanidin-3-glukozit için sırasıyla 2,5-12,5 µg/mL; 2,5-12,5 µg/mL ve 0,25-4,0 µg/mL doğrusallık aralıklarında 5 farklı konsantrasyonda Bölüm 3.3.2’de bahsedildiği gibi çalışıldı. Elde edilen pik alanlarından siyanidin-3-galaktozit (Şekil 4.1), siyanidin-3-glukozit (Şekil 4.2) ve siyanidin-3-arabinozit (Şekil 4.3) için ayrı ayrı ölçü eğrisi hazırlandı.

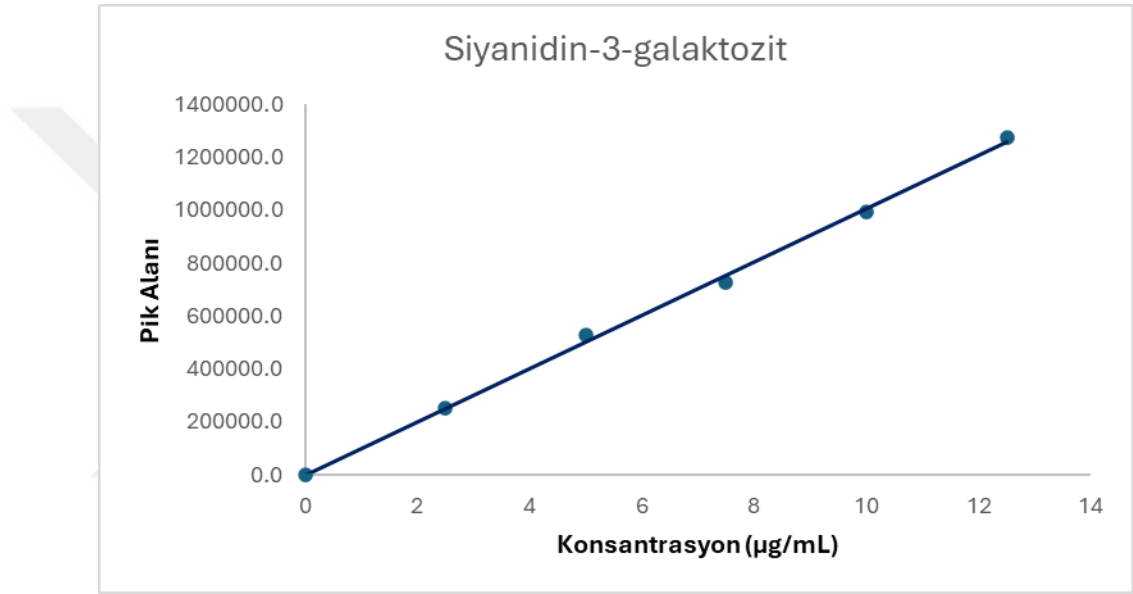
Tablo 4.2; 4.4 ve 4.6’da sırasıyla siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için elde edilen pik alanları ve ortalamaları (A), standart sapma ve relatif standart sapma değerleri görülmektedir. Yine aynı sırayla Tablo 4.3; 4.5 ve 4.7’de doğru denkleminde elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) görülmektedir.

Tablo 4.2: Siyanidin-3-galaktozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler

C (µg/mL) Pik Alanı	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
1	249910	526896	728826	997977	1141171
2	249728	527639	730438	991903	1158834
3	249856	529296	729646	993682	1117628
4	250150	527171	730108	992811	1158350
5	250494	528484	728444	995280	1111013
6	251480	528831	729614	997229	1147598
Ortalama	250270	528053	729513	994814	1139099
SD	651,7	961,7	755,3	2442,2	20427,6
RSD (%)	0,260	0,182	0,104	0,245	1,793
Ortalama alan oran ($\bar{A}$) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A = 92921C + 26202$ ($r = 0,9934$)					

Tablo 4.3: Tablo 4.2'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	93166	93983	91657	93973	91307	93440	92921
Kesim noktası	25179	22365	30496	22431	31616	25124	26202
r	0,9937	0,9957	0,9909	0,9956	0,9900	0,9942	0,9934

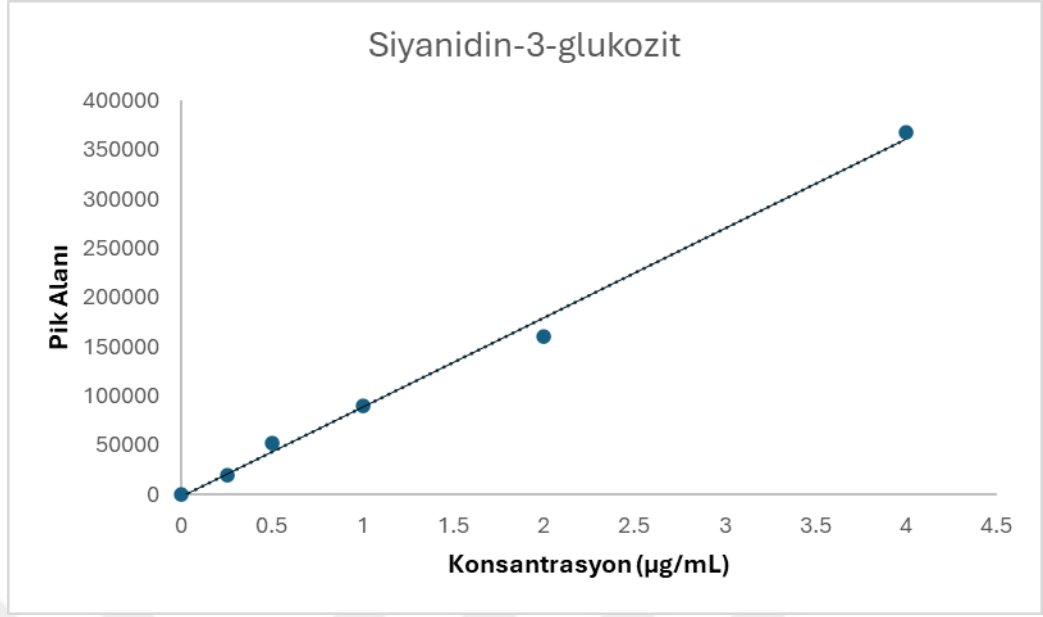
**Şekil 4.1: Siyanidin-3-galaktozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 2,5-12,5 µg/mL)**

Tablo 4.4: Siyanidin-3-glukozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler

C (µg/mL) Pik Alanı	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
1	19665	52211	89972	160878	368125
2	19450	52280	90307	160706	367814
3	19524	54251	90623	160989	369470
4	19937	51810	91236	161194	368216
5	19503	52562	89968	160367	366971
6	20022	52668	90950	160185	367925
Ortalama	19684	52630	90509	160720	368087
SD	241,5	849,0	521,1	382,9	809,6
RSD (%)	1,227	1,613	0,576	0,238	0,220
Ortalama alan oran ($\bar{A}$) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A = 90441C - 1549$ ($r = 0,9947$)					

Tablo 4.5: Tablo 4.4'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	90505	90427	90688	90517	90187	90324	90441
Kesim noktası	1761.1	1708.1	1329.2	1519.6	1596.9	1376.8	1549
r	0,9948	0,9948	0,9942	0,995	0,9947	0,9945	0,9947



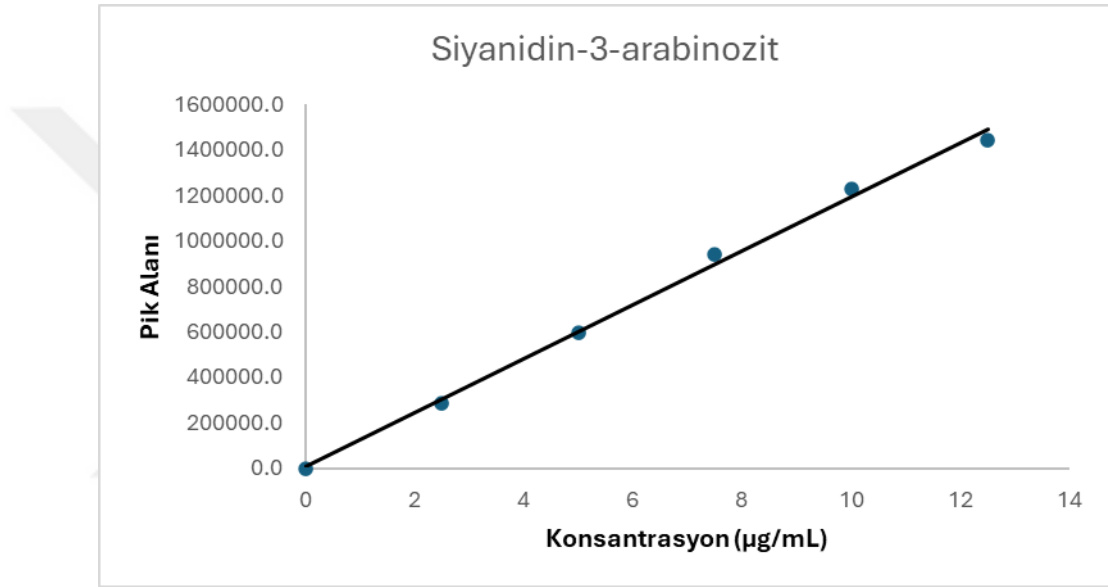
Şekil 4.2: Siyanidin-3-glukozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 0,25-4,0 µg/mL)

Tablo 4.6: Siyanidin-3-arabinozit için hesaplanan ölçü eğrisine ait veriler

C (µg/mL) Pik Alanı	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5
1	284747	596103	942175	1227805	1442713
2	284931	595874	943316	1225833	1443260
3	284743	596780	943615	1226560	1444445
4	285677	596141	944406	1227183	1442576
5	285502	596656	943153	1226368	1442818
6	285808	596967	944134	1227312	1443593
Ortalama	285235	596420	943467	1226844	1443234
SD	483,2	438,4	792,4	719,3	703,4
RSD (%)	0,169	0,074	0,084	0,059	0,049
Ortalama alan oran ($\bar{A}$) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi: $A = 118720C + 7197$ ($r = 0,9962$)					

Tablo 4.7: Tablo 4.6'daki ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

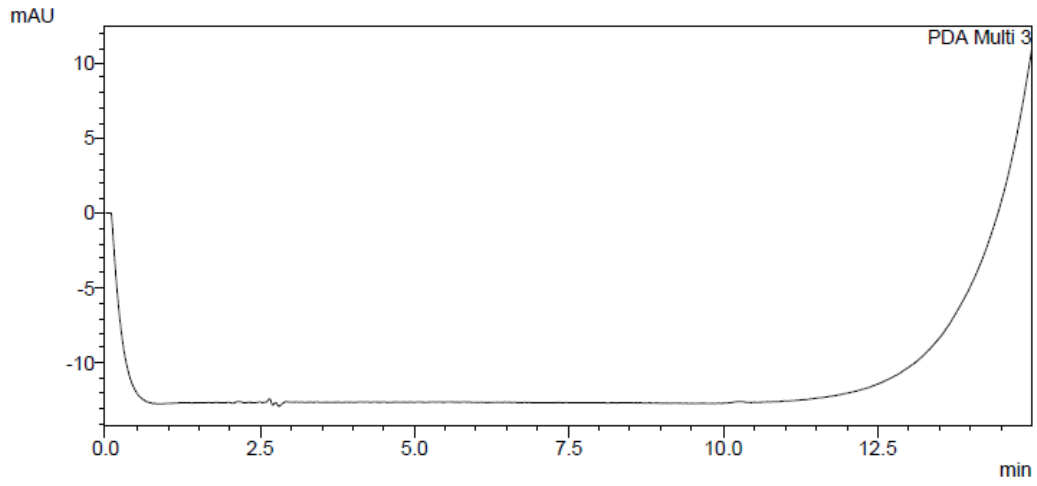
	1	2	3	4	5	6	Ortalama
Eğim	118729	118702	118794	118693	118665	118739	118720
Kesim noktası	6865.9	6979.9	6892.1	7497.4	7426.8	7518.2	7197
r	0,9962	0,9962	0,9963	0,9961	0,9962	0,9962	0,9962

**Şekil 4.3: Siyanidin-3-arabinozit için hesaplanan ölçü eğrisi (Konsantrasyon aralığı : 2,5-12,5 µg/mL)**

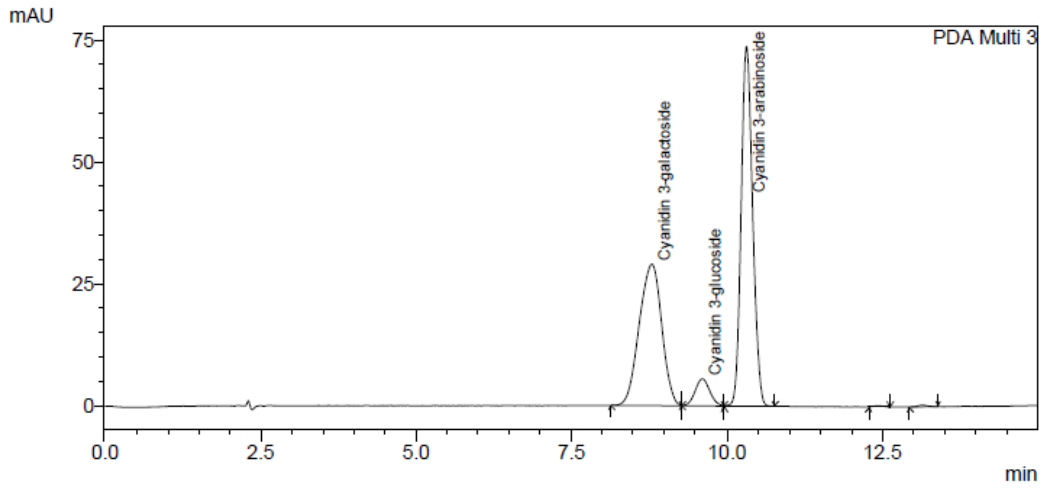
4.2. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.1. Seçicilik

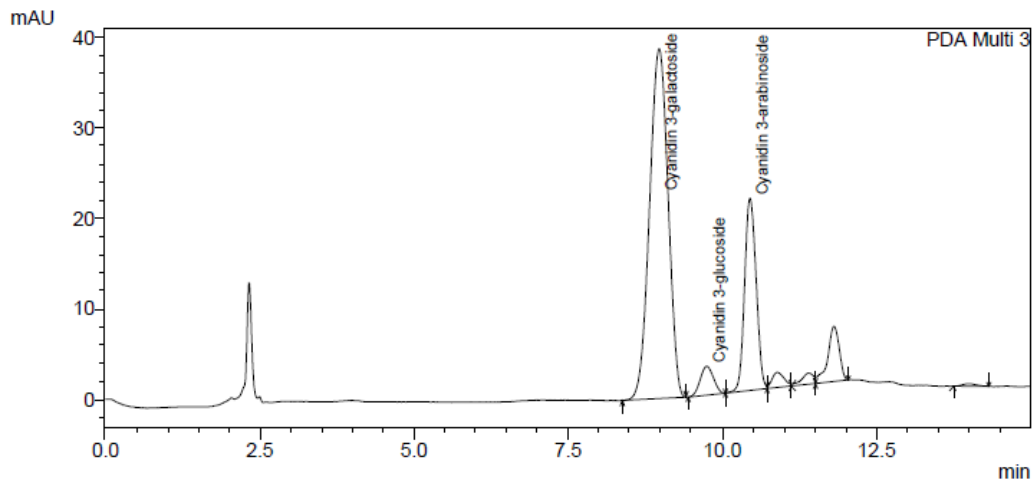
Yöntemin seçicilik parametresinin çalışmasında, HPLC yöntemi ile yapılan analizler sonucunda siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit piklerinin retensiyon zamanlarında mobil faz çözeltisinden ve numunelerden kaynaklanan kirliliklerden herhangi bir girişim olmadığı tespit edildi. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit piklerinin arasındaki rezolüsyon sırasıyla 1,6 ve 1,8 olarak hesaplandı. Analize ait kromatogramlar Şekil 4.4 ile Şekil 4.8 arasında görülmektedir.



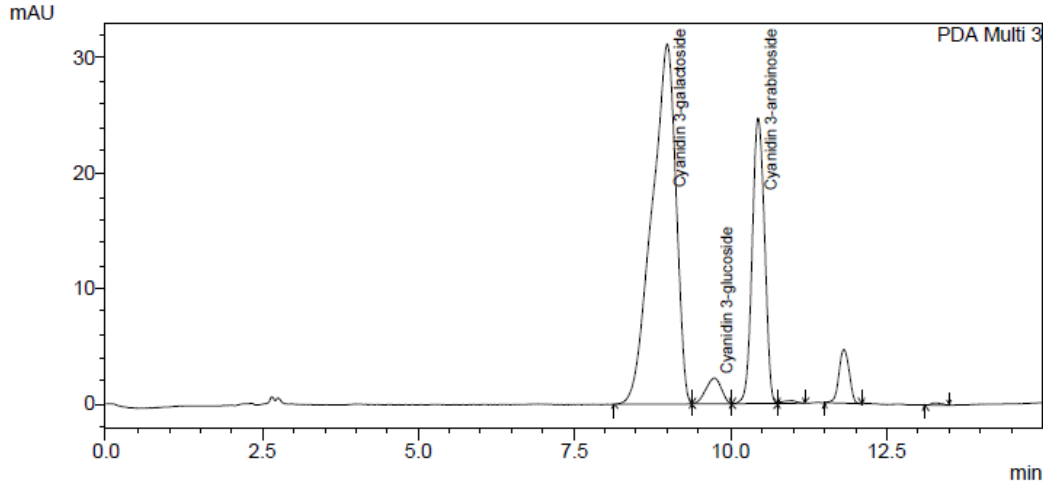
Şekil 4.4: Mobil faz çözeltisine ait kromatogram



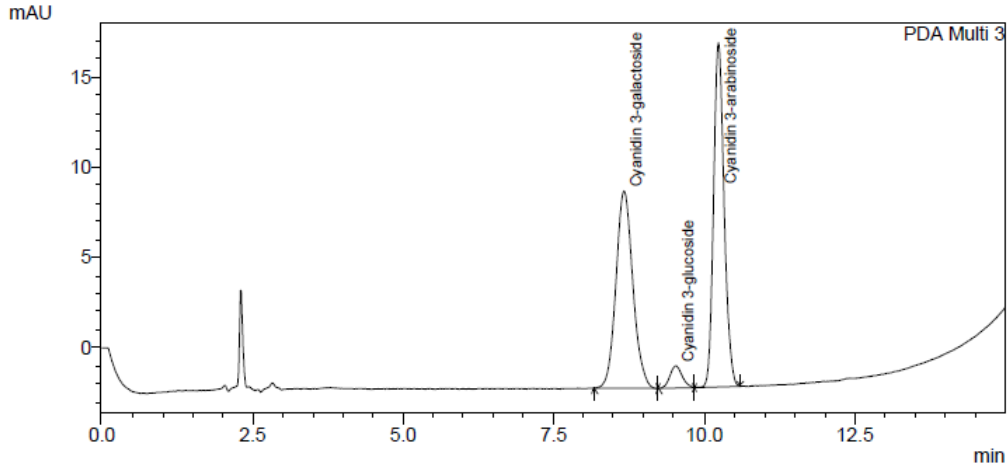
Şekil 4.5: Siyanidin-3-galaktozit (7,5 µg/ml), siyanidin-3-glukozit (1,0 µg/ml) ve siyanidin-3-arabinozite (7,5 µg/ml) ait kromatogram



Şekil 4.6: Aronya Kuruşu numunesine ait kromatogram



Şekil 4.7: Liyofilize Aronya numunesine ait kromatogram



Şekil 4.8: Aronya Suyu numunesine ait kromatogram

4.2.2. Aralık ve Doğrusallık

Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için sırasıyla 2,5-12,5 µg/ml; 0,25-4,0 µg/ml ve 2,5-12,5 µg/ml doğrusallık aralıkları olarak belirlendi. Bu aralıklarda 5 farklı noktada yapılan çalışmalarda doğrusallık grafikleri ve elde edilen diğer parametrelerin sonuçları Bölüm 4.1.2’de görülmektedir.

4.2.3. Doğruluk

Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için aronya kurusu ve aronya suyunda standart katma yöntemi ile yapılan doğruluk çalışmasına ait veriler Tablo 4.8 ve 4.9’da görülmektedir.

Geri kazanım yüzdeleri hesaplamak için $(C_t - C_u) \times 100 / C_a$ formülü kullanıldı. C_t , analiz sonucu bulunan siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit veya

siyanidin-3-arabinozit konsantrasyonunu; Cu, analiz edilen numuneden alınan analitin konsantrasyonunu; Ca ise ilave edilen standart çözeltinin konsantrasyonunu ifade eder.

Tablo 4.8: Aronya kurusu numunesinde yapılan doğruluk çalışması sonuçları

	Alınan Konsantrasyon ^a (µg/mL)	İlave edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon ^b (µg/mL) (Ortalama± SD ^c)	Geri Kazanım (%)	RSD ^d (%)
Siyanidin-3 galaktozit	8,0	1,0	8,91±0,01	91,41	0,11
		2,0	9,96±0,02	98,21	0,19
		3,0	10,70±0,05	90,12	0,49
				Ortalama: 93,25	
Siyanidin-3-glukozit	0,5	0,5	1,00±0,01	100,76	0,59
		1,5	1,88±0,01	92,00	0,42
		2,0	2,37±0,03	93,70	1,27
				Ortalama: 95,48	
Siyanidin-3-arabinozit	2,0	2,0	4,01±0,02	100,26	0,55
		5,0	7,03±0,08	100,59	1,09
		7,0	8,95±0,05	99,32	0,51
				Ortalama: 100,06	

^aAronya Kuru Numunesi, ^bn=3, ^cStandart sapma, ^dBağıl standart sapma

Tablo 4.9: Aronya suyu numunesinde yapılan doğruluk çalışması sonuçları

	Alınan Konsantrasyon ^a (µg/mL)	İlave edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon ^b (µg/mL) (Ortalama± SD ^c)	Geri Kazanım (%)	RSD ^d (%)
Siyanidin-3 galaktozit	4,6	1,0	5,56±0,02	96,42	0,40
		2,0	6,54±0,04	96,87	0,68
		3,0	7,61±0,08	100,30	1,05
				Ortalama: 97,86	
Siyanidin-3-glukozit	0,25	0,5	0,76±0,01	101,67	0,98
		1,5	1,73±0,005	98,80	0,29
		2,0	2,26±0,03	100,38	1,22
				Ortalama: 100,28	
Siyanidin-3-arabinozit	1,3	2,0	3,32±0,06	100,81	1,89
		5,0	6,44±0,03	102,85	0,51
		7,0	8,24±0,06	99,07	0,73
				Ortalama: 100,91	

^aAronya Suyu Numunesi, ^bn=3, ^cStandart sapma, ^dBağıl standart sapma

4.2.4. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik)

Siyanidin-3-arabinozit ve siyanidin-3-galaktozit için 2,5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 12,5 µg/ml; siyanidin-3-glukozit için 0,25 µg/ml, 1 µg/ml ve 4 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda Bölüm 3.3.2’de bahsedildiği gibi çalışıldı.

Farklı günlerde ve aynı gün içerisinde her bir etken madde için üç farklı konsantrasyonda yapılan analizlerde elde edilen sonuçlar hesaplandı ve Tablo 4.10’da görülmektedir.

Tablo 4.10: Yöntemin tekrarlanabilirliği

	Gün içi (n=6)			Günler arası (n=6)		
	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL) (Ortalama± SD ^a)	RSD ^b (%)	Alınan Konsantrasyon (µg/mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg/mL) (Ortalama± SD ^a)	RSD ^b (%)
Siyanidin-3 galaktozit	2,5	2,44±0,01	0,43	2,5	2,47±0,00 ₇	0,27
	7,5	7,59±0,01	0,10	7,5	7,57±0,00 ₅	0,07
	12,5	12,37±0,20	1,63	12,5	12,39±0,09	0,76
Siyanidin-3-glukozit	0,25	0,23±0,00 ₄	1,65	0,25	0,24±0,00 ₂	0,85
	1,0	1,03±0,00 ₃	0,25	1,0	1,02±0,00 ₂	0,19
	4,0	4,16±0,02	0,46	4,0	4,15±0,02	0,41
Siyanidin-3-arabinozit	2,5	2,38±0,00 ₃	0,11	2,5	2,41±0,00 ₃	0,12
	7,5	7,90±0,00 ₄	0,06	7,5	7,89±0,00 ₅	0,06
	12,5	12,12±0,01	0,1	12,5	12,12±0,01	0,06

^aStandart sapma, ^bBağıl standart sapma

4.2.5. Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Bölüm 3.4.5’te bahsedilen formüllere göre yöntemin LOQ ve LOD değerleri hesaplandı. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için sırasıyla LOQ değerleri 0,43 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,03 µg/ml; LOD değerleri 0,13 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,01 µg/ml olarak bulundu.

4.2.6. Stabilite

Yöntemin stabilite çalışması Bölüm 3.4.6’da bahsedildiği çalışıldı. Hazırlanan standart çözeltinin HPLC cihazının oto örnekleyici bölümünde 15°C’de ışısız bir ortamda 24 saat boyunca dayanıklı kaldığı bulunmuştur. Stabiliteye ait sonuçlar Tablo 4.11’de görülmektedir.

Tablo 4.11: Standart çözeltiye ait stabilite sonuçları

	Zaman (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) (Ortalama $\pm$ SD)	RSD (%)	Değişim (%)
Siyanidin-3- galaktozit	0	7,58 $\pm$ 0,01	0,11	100,00
	24	7,59 $\pm$ 0,01	0,08	100,07
Siyanidin-3- glukozit	0	1,02 $\pm$ 0,01	0,74	100,00
	24	1,02 $\pm$ 0,01	0,74	99,76
Siyanidin-3- arabinozit	0	7,90 $\pm$ 0,00 ₄	0,06	100,00
	24	7,89 $\pm$ 0,01	0,09	99,92

4.2.7. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlık parametresinin çalışmasında, mobil fazın akış hızı değişiminin ve kolon fırını sıcaklığının değişiminin analize olan etkisi incelenmiş ve veriler Tablo 4.12 ve 4.13'te görülmektedir.

Tablo 4.12: Akış hızı değişikliklerinin yöntem üzerine etkileri

Akış Hızı (ml/dak)	Parametre (Ortalama $\pm$ SD)	Siyanidin-3- galaktozit	Siyanidin-3- glukozit	Siyanidin-3- arabinozit
0,6	Alıkonma Zamanı	10,6 $\pm$ 0,01	11,26 $\pm$ 0,00 ₃	11,93 $\pm$ 0,00 ₂
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	43902 $\pm$ 895	88382 $\pm$ 114	136044 $\pm$ 942
	Kuyruklanma Faktörü	1,02 $\pm$ 0,00 ₂	1,10 $\pm$ 0,00 ₄	1,16 $\pm$ 0,00 ₃
	Rezölüsyon	-	1,460 $\pm$ 0,479	1,843 $\pm$ 0,362
0,8	Alıkonma Zamanı	8,65 $\pm$ 0,00 ₃	9,50 $\pm$ 0,00 ₃	10,22 $\pm$ 0,00 ₃
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	15199 $\pm$ 116	45597 $\pm$ 444	91200 $\pm$ 631
	Kuyruklanma Faktörü	0,96 $\pm$ 0,00 ₂	1,11 $\pm$ 0,00 ₁	1,19 $\pm$ 0,00 ₂
	Rezölüsyon	-	1,61 $\pm$ 0,00 ₃	1,77 $\pm$ 0,00 ₅
1,0	Alıkonma Zamanı	7,24 $\pm$ 0,00 ₃	8,28 $\pm$ 0,00 ₂	9,07 $\pm$ 0,00 ₂
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	11685 $\pm$ 106	25076 $\pm$ 405	63344 $\pm$ 478
	Kuyruklanma Faktörü	1,05 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,00 ₂
	Rezölüsyon	-	1,686 $\pm$ 0,217	1,745 $\pm$ 0,727

Tablo 4.13: Kolon fırın sıcaklığı değişikliklerinin yöntem üzerine etkileri

Kolon Fırını sıcaklığı (°C)	Parametre (Ortalama± SD)	Siyanidin-3-galaktozit	Siyanidin-3-glukozit	Siyanidin-3-arabinozit
28,0	Alıkonma Zamanı	8,71±0,00 ₃	9,55±0,00 ₁	10,26±0,00 ₃
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	16488±311	48073±1312	91581±676
	Kuyruklanma Faktörü	0,97±0,01	1,11±0,00 ₂	1,19±0,00 ₄
	Rezölüsyon	-	1,467±0,862	1,774±1,213
30,0	Alıkonma Zamanı	8,65±0,00 ₃	9,50±0,00 ₃	10,22±0,00 ₃
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	15199±116	45597±444	91200±631
	Kuyruklanma Faktörü	0,96±0,00 ₂	1,11±0,00 ₁	1,19±0,00 ₂
	Rezölüsyon	-	1,61±0,00 ₃	1,77±0,00 ₅
32,0	Alıkonma Zamanı	8,49±0,01	9,40±0,01	10,14±0,00 ₅
	Teorik Plaka Sayısı/Metre	13464±150	39265±346	81729±589
	Kuyruklanma Faktörü	1,01±0,00 ₃	1,12±0,01	1,21±0,00 ₃
	Rezölüsyon	-	1,467±0,377	1,719±0,284

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde geliştirilen metodun; her üç etken madde için kolon sıcaklığı ve akış hızı değişikliklerinde teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü parametreleri açısından dayanıklı olup, rezölüsyon parametresi açısından hassas olduğu yorumu yapılabilir.

4.3. Aronya İçeren Gıda Takviyelerinde Siyanidin-3-arabinozit, Siyanidin-3-galaktozit ve Siyanidin-3-glukozit Bileşiklerinin HPLC ile Analizi

Aronya içeren gıda takviyelerinden aronya kurusu, liyofilize aronya, aronya suyu ve aronya kurusu etanol özütü toz örnek validasyonu tamamlanan HPLC-DAD yöntemi ile 520 nm’de analiz edildi. Elde edilen miktar tayini sonuçları Tablo 4.14’te görülmektedir.

Tablo 4.14: Aronya içeren gıda takviyelerinin analiz sonuçları

Örnekler	Siyanidin-3- galaktozit	Siyanidin-3- glukozit	Siyanidin-3- arabinozit
Aronya Kuru (mg/100 g) (Ortalama± SD)	20,95±0,01	1,38±0,01	5,72±0,04
Liyofilize Aronya (mg/100 g) (Ortalama± SD)	434,97±0,01	22,11±0,00 ₂	140,26±0,00 ₂
Aronya Suyu (mg/250 mL) (Ortalama± SD)	11,77±0,01	0,67±0,01	3,30±0,01
Aronya Kuru Etanol Özütü (mg/100 g) (Ortalama± SD)	2,10±0,02	1,35±0,01	2,62±0,02

5. TARTIŞMA

Aronia melanocarpa meyvesi zengin antioksidan aktivitesi ve yüksek biyoaktif bileşik içeriğinden dolayı sağlıklı beslenmenin değerli bir bileşenidir. Son zamanlar aronyaya artan ilgi nedeniyle birçok gıda ürünü ve gıda takviyeleri ortaya çıkmıştır.

Siyah aronya polifenoller açısından zengindir, esas olarak proantosiyeninler, antosiyeninler, fenolik asitler ve flavonoidler içerir [7]. Antosiyeninler toplam aronya fenollerinin yaklaşık %25'ini temsil eder ve siyanidin 3-glukozit, siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-ksilozit, siyanidin-3-arabinozit, pelargonidin-3-galaktozit ve pelargonidin-3-arabinozit içerir [8]. Siyanidinler, toplam aronya antosiyeninlerinin yaklaşık %99'unu oluşturur. %65,6'ı siyanidin-3-O-galaktozit, %28,3'ü siyanidin-3-O-arabinozit, %3,2'si siyanidin-3-O-ksilozit ve %2,9'u siyanidin-3-O-glukozittir [9].

Bu tez çalışmasında, aronya içeriğindeki antosiyeninlerden siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-arabinozitin yan yana miktar tayinine imkan sağlayan bir sıvı kromatografisi metodu geliştirilmiş ve ICH Q2 (R1) kılavuzuna göre valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde üç etken maddenin yan yana analizi Phenomenex, Gemini C18, (5µm, 150 x 4,6mm) kolonda, 0,8 mL/dk akış hızında, 30°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak %1 glasiyel asetik asit:ACN:fosforik asit (510:485:5) (h:h:h) ve %0,5 fosforik asit çözeltileri kullanılmış ve gradient sistem uygulanmıştır. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit sırasıyla 2,5-12,5 µg/mL; 0,25-4,0 µg/mL ve 2,5-12,5 µg/mL konsantrasyon aralıklarında doğrusal olarak bulunmuştur ($r>0,99$). Aronyo kurusu ve aronya suyuna standart katma yaparak doğruluk çalışması yapılmıştır. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için sırasıyla aronya kurusunda yapılan ortalama geri kazanım yüzdeleri %93,25; %95,48 ve %100,06; aronya suyunda ise %97,86; %100,28 ve %100,91 olarak bulunmuştur. Yöntemin tekrarlanabilirliğinde yapılan çalışmada siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için sırasıyla %RSD değerleri %0,10-1,63; %0,19-1,65 ve %0,06-0,12 arasında bulunmuştur. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit için sırasıyla LOQ değerleri 0,43 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,03 µg/ml; LOD değerleri 0,13 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,01 µg/ml olarak bulundu. Yapılan stabilite

alışmasında standart çözeltinin oto rnekleyicide 24 saat boyunca dayanıklı olduğu tespit edildi.

Geliştirilen ve valide edilen yöntem Türkiye'nin Kırklareli'nin Vize Köyü'nde yetiştirilen aronya meyvesinden elde edilen numunelerin analizlerinde başarıyla uygulanmıştır. Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozit sırasıyla aronya içeren gıda takviyelerinden aronya kurusunda $20,95 \pm 0,01$ mg/100 g, $1,38 \pm 0,01$ mg/100 g, $5,72 \pm 0,04$ mg/100 g; liyofilize aronyada $434,97 \pm 0,01$ mg/100 g, $22,11 \pm 0,00_2$ mg/100 g, $140,26 \pm 0,00_2$ mg/100 g; aronya suyunda $11,77 \pm 0,01$ mg/250 mL, $0,67 \pm 0,01$ mg/250 mL, $3,30 \pm 0,01$ mg/250 mL ve aronya kurusu etanol özütü toz örnekte $2,10 \pm 0,02$ mg/100 g, $1,35 \pm 0,01$ mg/100 g, $2,62 \pm 0,02$ mg/100 g olarak hesaplanmıştır.

Siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozitin yan yana analizi için geliştirilen yöntem, literatürde daha önce yayınlanan HPLC yöntemleri ile analiz süresi yönünden karşılaştırıldığında daha kısa sürede yapılması açısından avantajlıdır [1, 29, 30, 32, 38]. Örnek hazırlama yönünden karşılaştırıldığında da ekstraksiyon işlemi diğer yöntemlere göre daha basit ve hızlı olması nedeniyle geliştirilen yöntem daha avantajlıdır [1, 29, 30, 32, 38].

Bu çalışmada, aronya içeren gıda ürünlerinde ve gıda takviyelerinde siyanidin-3-galaktozit, siyanidin-3-glukozit ve siyanidin-3-arabinozitin yan yana analizi için basit, hızlı, hassas, tekrarnabilirliği ve doğruluğu yüksek bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem aronya içeren ürünlerdeki analizlerde rahatlıkla uygulanabilecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

1. Chandra A, Jatinder R, Li Y. Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC–MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 3515-3521.
2. Rodríguez-Werner M, Winterhalter P, Esatbeyoglu T. Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and an Approach for Authentication of *Aronia Melanocarpa* Berries, Juice, and Pomace. *Journal of Food Science*. 2019;84: 1791-98.
3. Yurtkulu, V., Çoban, E., Türktemel, E., Şimşek, M. Aronya Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi. T.C.Tarım ve Orman Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü.2022.<https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/YATIRIMCI%20REHBER%C4%B0/ARONYA%20F%C4%B0Z%C4%B0B%C4%B0L%C4%B0TE%20RAPORU.pdf>
4. Obae, SG, Brand MH, Connolly BA, Beasley RR, Lance SL. Microsatellite Markers for *Aronia Melanocarpa* (Black Chokeberry) and Their Transferability to Other *Aronia* Species. *HortScience*. 2017;52: 20-23.
5. Szopa A, Starzec A, Ekiert H. The Importance of Monochromatic Lights in the Production of Phenolic Acids and Flavonoids in Shoot Cultures of *Aronia Melanocarpa*, *Aronia Arbutifolia* and *Aronia* × *Prunifolia*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2018;179: 91-97.
6. Özdemir K, Eroğlu Özkan E. *Aronia* Sp. Meyvelerinin Kimyasal Bileşimi ve Biyolojik Aktiviteleri, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2020;44(3): 557-570.
7. Wang L, Wang R, Dong J, Wang Y, Huang X, Chen C. Research on the Extraction, Purification and Determination of Chemical Components, Biological Activities, and Applications in Diet of Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*). *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2023;51: 100301.
8. Bushmeleva K, Vyshtakalyuk V, Terenzhev D, Belov T, Nikitin E, Zobov V. Antioxidative and Immunomodulating Properties of *Aronia Melanocarpa* Extract Rich in Anthocyanins. *Plants*. 2022; 11, 3333
9. Chen Y, Zhao J, Li H-H, Qian W, Zhou B-Y, Yang C-Q. Pharmacokinetics of Cyanidin-3- O -Galactoside and Cyanidin-3- O -Arabinoside after Intravenous

- Administration in Rats. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2024; **26**: 714-725.
10. Piras A, Porcedda S, Smeriglio A, Trombetta D, Nieddu M, Piras F, Sogos V, Rosa A. Chemical Composition, Nutritional, and Biological Properties of Extracts Obtained with Different Techniques from Aronia Melanocarpa Berries. *Molecules*. 2024;29: 2577.
 11. ICH Q2 (R1). Analitik Prosedürlerin Validasyonu: Metin ve Metodolojisi. 2005. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (Erişim Tarihi: Temmuz,2024).
 12. Kim N-H, Jegal J, Kim YN, Heo J-D, Rho J-R, Yang MH, Jeong EJ. The Effects of Aronia Melanocarpa Extract on Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats, and Quantitative Analysis of Major Constituents Depending on Extract Conditions. *Nutrients*. 2020;12: 1575.
 13. Wangensteen H, Braunlich M, Nikolic V, Malterud KE, Slimestad R, Barsett H. Anthocyanins, proanthocyanidins and total phenolics in four cultivars of aronia: Antioxidant and enzyme inhibitory effects. *Journal of Functional Foods*. 2014; 7: 746-752.
 14. Esatbeyoglu T, Rodríguez-Werner M, Winterhalter P. Fractionation and Isolation of Polyphenols from Aronia Melanocarpa by Countercurrent and Membrane Chromatography. *European Food Research and Technology*. 2017;243: 1261-1275.
 15. PubChem;Siyanidin-3-galaktozit
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-galactoside>
(25.07.2024 tarihinde erişilmiştir)
 16. PubChem;Siyanidin-3-glukozit
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-glucoside>
(25.07.2024 tarihinde erişilmiştir)
 17. PubChem;Siyanidin-3-arabinozit
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyanidin-3-arabinoside>
(25.07.2024 tarihinde erişilmiştir)
 18. Stanoeva JP, Damjanovski V, Cichna-Markl M, Stefova M. Anthocyanin Fingerprinting as an Authentication Testing Tool for Blueberry, Aronia, and

- Pomegranate Juices. *European Food Research and Technology*. 2024;250: 751-62.
19. Veberic R, Slatnar A, Bizjak J, Stampar F, Mikulic-Petkovsek M. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*. 2015; 60: 509-517.
 20. Wiczowski W, Romaszko E, Piskula MK. Bioavailability of Cyanidin Glycosides from Natural Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice with Dietary-Relevant Dose of Anthocyanins in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58: 12130-12136.
 21. Tomás-Barberán FA, Gil-Izquierdo A, Moreno DA. Bioavailability and metabolism of phenolic compounds and glucosinolates. Designing Functional Foods Measuring and Controlling Food Structure Breakdown and Nutrient Absorption Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Chapter 8. 2009: 194-229.
 22. Xie L, Lee SG, Vance TM, Wang Y, Kim B, Lee JY, Chun OK, Bolling BW. Bioavailability of anthocyanins and colonic polyphenol metabolites following consumption of aronia berry extract. *Food Chemistry*. 2016; 211: 860–868.
 23. Şaşmaz HK, Kilic-Buyukkurt Ö, Selli S, Bouaziz M, Kelebek H. Antioxidant Capacity, Sugar Content, and Tandem HPLC–DAD–ESI/MS Profiling of Phenolic Compounds from Aronia Melanocarpa Fruits and Leaves (Nero and Viking Cultivars). *ACS Omega*. 2024;9: 14963-14976.
 24. Šnebergrová J, Čížková H, Neradová E, Kapci B, Rajchl A, Voldřich M. Variability of Characteristic Components of Aronia. *Czech Journal of Food Sciences*. 2014;32: 25-30.
 25. Čujić N, Savikin K, Miloradovic Z, Ivanov M, Vajic U-J, Karanovic D, Grujic-Milanovic J, Jovovic D, Mihailovic-Stanojevic N. Characterization of Dried Chokeberry Fruit Extract and Its Chronic Effects on Blood Pressure and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Functional Foods*. 2018;44: 330-39.
 26. Bermudez-Soto, M-J, Tomas-Barberan F-A, Garcia-Conesa M-T. Stability of Polyphenols in Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Subjected to in Vitro Gastric and Pancreatic Digestion. *Food Chemistry*. 2007; **102**: 865-874.

27. Graversen, HB, Becker EM, Skibsted LH, Andersen ML. Antioxidant Synergism between Fruit Juice and α -Tocopherol. A Comparison between High Phenolic Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) and High Ascorbic Blackcurrant (*Ribes Nigrum*). *European Food Research and Technology*. 2008; 226:737-743.
28. Taheri R, Connolly BA, Brand MH, Bolling BW. Underutilized Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*, *Aronia Arbutifolia*, *Aronia Prunifolia*) Accessions Are Rich Sources of Anthocyanins, Flavonoids, Hydroxycinnamic Acids, and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61: 8581-8588.
29. Dobros N, Zielińska A, Siudem P, Zawada K D, Paradowska K. Profile of Bioactive Components and Antioxidant Activity of *Aronia Melanocarpa* Fruits at Various Stages of Their Growth, Using Chemometric Methods. *Antioxidants*. 2024; 13: 462.
30. Dulf FV, Vodnar DC, Dulf E-H, Diaconeasa Z, Socaciu C. Liberation and Recovery of Phenolic Antioxidants and Lipids in Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*) Pomace by Solid-State Bioprocessing Using *Aspergillus Niger* and *Rhizopus Oligosporus* Strains. *LWT - Food Science Technology*. 2018; 87: 241-249.
31. González-Molina E, Moreno DA, García-Viguera C. Aronia-Enriched Lemon Juice: A New Highly Antioxidant Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 11327-11333.
32. Kavela ETA, Szalóki-Dorkó L, Máté M. The Efficiency of Selected Green Solvents and Parameters for Polyphenol Extraction from Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* (Michx)) Pomace. *Foods*. 2023;12: 3639.
33. Jakesevic M, Aaby K, Borge G-I A, Jeppsson B, Ahn S, Molin G. Antioxidative Protection of Dietary Bilberry, Chokeberry and *Lactobacillus Plantarum* HEAL19 in Mice Subjected to Intestinal Oxidative Stress by Ischemia-Reperfusion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11: 8.
34. Szumny D, Kucharska AZ, Czajor K, Bernacka K, Ziółkowska S, Krzyżanowska-Berkowska P, Magdalan J, Misiuk-Hojło M, Sozański T, Szeląg A. Extract from *Aronia Melanocarpa*, *Lonicera Caerulea*, and *Vaccinium*

- Myrtillus Improves near Visual Acuity in People with Presbyopia. *Nutrients*. 2024;16: 926.
35. Tian Y, Liimatainen J, Alanne A-L, Lindstedt A, Liu P, Sinkkonen J, Kallio H, Yang B. Phenolic Compounds Extracted by Acidic Aqueous Ethanol from Berries and Leaves of Different Berry Plants. *Food Chemistry*. 2017;220:266-281.
 36. Tomić M, Ignjatović D, Tovilović-Kovačević G, Krstić-Milošević D, Ranković S, Popović T, Glibetić M. Reduction of Anxiety-like and Depression-like Behaviors in Rats after One Month of Drinking Aronia Melanocarpa Berry Juice. *Food & Function*. 2016;7: 3111-3120.
 37. Šavikin, Katarina, Gordana Zdunić, Teodora Janković, Dejan Gođevac, Tatjana Stanojković, ve Dejan Pljevljakušić. Berry Fruit Teas: Phenolic Composition and Cytotoxic Activity. *Food Research International*. 2014;62:677-83.
 38. Oszmiański J, Lachowicz S. Effect of the Production of Dried Fruits and Juice from Chokeberry (Aronia Melanocarpa L.) on the Content and Antioxidative Activity of Bioactive Compounds. *Molecules*. 2016;21:1098.
 39. Watrelot AA, Bouska L. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Aronia and grapes. *Food Chemistry*. 2022; 386: 132703.
 40. Stanoeva JP, Balshikevska E, Stefova M, Tusevski O, Simic SG. Comparison of the Effect of Acids in Solvent Mixtures for Extraction of Phenolic Compounds From *Aronia Melanocarpa*. *Natural Product Communications*. 2020;15(7):1-10.
 41. Torović L, Sazdanić D, Atanacković Krstonošić M, Mikulić M, Beara I, Cvejić J. Compositional Characteristics, Health Benefit and Risk of Commercial Bilberry and Black Chokeberry Juices. *Food Bioscience*. 2023;51: 102301.
 42. Wathon MH, Beaumont N, Benohoud M, Blackburn RS, Rayner CM. Extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* skin waste as a sustainable source of natural colorants. *Coloration Technology*. 2019: 135: 5-16.
 43. Wen H, Cui H, Tian H, Zhang X, Ma L, Ramassamy C, Li J. Isolation of Neuroprotective Anthocyanins from BlackChokeberry (*Aronia melanocarpa*) against Amyloid—Induced Cognitive Impairment. *Foods*. 2021; 10:63.
 44. Öztürk A, Steingass CB, Schweiggert R, Carle R, Yemiş O, Erşan S. Ultrasound-Assisted Extraction and (U)HPLC-DAD-ESI-MSn Analysis of

- Phenolic Compounds from Black Chokeberries Cultivated in Turkey. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2023; 96: 21-29
45. Razboršek MI, Ivanović M, Krajnc P, Kolar M. Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Extracting Phenolic Compounds from Chokeberry (*Aronia Melanocarpa*). *Molecules*. 2020; 25: 1619.
 46. Tirla A, Timar AV, Becze A, Memete AR, Vicas SI, Popoviciu MS, Cavalu S. Designing New Sport Supplements Based on *Aronia Melanocarpa* and Bee Pollen to Enhance Antioxidant Capacity and Nutritional Value. *Molecules*. 2023;28: 6944.
 47. Lin S, Meng X, Tan C, Tong Y, Wan M, Wang M, Zhao Y, Deng H, Kong Y, Ma Y. Composition and Antioxidant Activity of Anthocyanins from *Aronia Melanocarpa* Extracted Using an Ultrasonic-Microwave-Assisted Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Method. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022;89: 106102.
 48. Stanoeva JP, Damjanovski V, Cichna-Markl M, Stefova M. Anthocyanin Fingerprinting as an Authentication Testing Tool for Blueberry, *Aronia*, and Pomegranate Juices. *European Food Research and Technology*. 2024;250: 751-62.
 49. Zengin R, Maraş Z, Uğur Y, Özhan O, Karaat FE, Erdoğan S. Determination of Phytochemical Composition in Fruits and Leaves from Different Origins: Black Mulberry, Chokeberry and Elderberry Genotypes. *Analytical Letters*. 2024;1-23.
 50. Zhu F, Li J, Ma Z, Li J, Du B. Structural Identification and *in Vitro* Antioxidant Activities of Anthocyanins in Black Chokeberry (*Aronia Melanocarpa* Lliot). *EFood*. 2021;2: 201-208.
 51. Zielińska A, Siudem P, Paradowska K, Gralec M, Kaźmierski S, Wawer I. *Aronia Melanocarpa* Fruits as a Rich Dietary Source of Chlorogenic Acids and Anthocyanins: ¹H-NMR, HPLC-DAD, and Chemometric Studies. *Molecules*. 2020; 25: 3234.
 52. Zielińska A, Bryk D, Paradowska K, Wawer I. *Aronia Melanocarpa* Leaves as a Source of Chlorogenic Acids, Anthocyanins, and Sorbitol, and Their Anti-Inflammatory Activity. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2020;70:409-418.

53. Kim NH, Jegal J, Kim YN, Heo JD, Rho JR, Yang MH, Jeong EJ. The Effects of Aronia melanocarpa Extract on Testosterone-Induced Benign Prostatic Hyperplasia in Rats, and Quantitative Analysis of Major Constituents Depending on Extract Conditions. *Nutrients*. 2020; 12: 1575.
54. Kim DW, Han HA, Kim JK, Kim DH, Kim MK. Comparison of Phytochemicals and Antioxidant Activities of Berries Cultivated in Korea: Identification of Phenolic Compounds in Aronia by HPLC/Q-TOF MS. *Preventive Nutrition and Food Science*. 2021;26(4):459-468.
55. Kusznierevich B, Piasek A, Bartoszek A, Namiesnik J. Application of a commercially available derivatization instrument and commonly used reagents to HPLC on-line determination of antioxidants. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2011; 24: 1073-1080.
56. Rousseau KM. Method Development for The Analysis of Anthocyanins in Aronia Berries via HPLC. *The Honors College University of Maine*. 2014. Thesis.
57. Meng L, Zhu J, Ma Y, Sun X, Li D, Li L, Bai H, Xin G, Meng X. Composition and antioxidant activity of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* cultivated in Haicheng, Liaoning, China. *Food Bioscience*. 2019; 30: 100413.
58. Milutinović M, Branković S, Čujić N, Šavikin K, Kostić M, Kitić N, Miladinović B, Kitić D. Antispasmodic effects of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) extracts and juice and their potential use in gastrointestinal disorders. *Journal of Berry Research*. 2019; 10(2): 175-192.
59. Minkiewicz P, Pliszka B, Dziuba J, Oszmianski J. Second and Third Derivatives of UV Spectra as a Tool For Identification of Major Anthocyanins From *Aronia melanocarpa* Extract, Separated Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2004; 69: 1443-1452.
60. Niesen S, Göttel C, Becker H, Bakuradze T, Winterhalter P, Richling E. Fractionation of Extracts from Black Chokeberry, Cranberry, and Pomegranate to Identify Compounds That Influence Lipid Metabolism. *Foods*. 2022; 11: 570.
61. Ostberg-Potthoff JJ, Berger K, Richling E, Winterhalter P. Activity-Guided Fractionation of Red Fruit Extracts for the Identification of Compounds Influencing Glucose Metabolism. *Nutrients*. 2019; 11: 1166.

62. Imai M, Yamane T, Kozuka M, Takenaka S, Sakamoto T, Ishida T, Nakagaki T, Nakano Y, Inui H. Caffeoylquinic acids from aronia juice inhibit both dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase activities. *LWT - Food Science and Technology*. 2020; 129: 109544.
63. Esatbeyoglu T, Rodríguez-Werner M, Winterhalter P. Fractionation and isolation of polyphenols from *Aronia melanocarpa* by countercurrent and membrane chromatography. *European Food Research and Technology*. 2017; 243: 1261-1275.
64. Čujić N, Savikin K, Miloradovic Z, Ivanov M, Vajic UJ, Karanovic D, Grujic-Milanovic J, Jovovic D, Mihailovic-Stanojevic N. Characterization of dried chokeberry fruit extract and its chronic effects on blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*. 2018; 44: 330-339.
65. Čorković I, Rajchl A, Škorpilová T, Pichler A, Šimunović J, Kopjar M. Evaluation of Chokeberry/Carboxymethylcellulose Hydrogels with the Addition of Disaccharides: DART-TOF/MS and HPLC-DAD Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24: 448.
66. Cho CW, Rustam R, Gao D, Kim HM, Kang JS. Characterization of the Biactive Components in *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) Fruit Extracts and Purified Fractions by Spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Analytical Letters*. 2023; 56: 2291-2308.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ARONYA İÇEREN GIDA TAKVİYELERİNDE BULUNAN MAJÖR BİLEŞİKLERİN HPLC İLE EŞZAMANLI ANALİZİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 16	% 14	% 11	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	lee.yalova.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	% 1
6	docplayer.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Meriç, Zehra İlke. "Marmara Bölgesin'nde Yetişen Bazı Bitkilerin Cilt Leke Giderici ve Antioksidan Aktivitelerinin Değerlendirilmesi", Marmara Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<% 1