

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARADUTTAN DOĞAL GIDA BOYASI ELDESİ  
ve ELDE EDİLEN GIDA BOYASININ  
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**


15/10/00


Kimyager Betül ÖZKILIÇ ÇİNO


FBE Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında  
Hazırlanan

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin AFAŞAR**

  
Prof. Dr. Hüseyin AFAŞAR  
15.10.2004

  
Doç. Dr. Filiz İMER  
15.10.2004

  
Prof. Dr. Adnan AYDIN  
15.10.2004

**İSTANBUL, 2004**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ŞEKİL LİSTESİ .....	iii
ÇİZELGE LİSTESİ .....	iv
ÖNSÖZ .....	v
ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Renk .....	2
2.1.1 Renk Tayfı .....	2
2.1.2 Doğrudan Gelen ve Yansıyan Işık .....	3
2.2 Gıdalarda Renk .....	4
2.2.1 Gıda Boyalarının Sınıflandırılması .....	5
2.2.1.1 Sentetik Boyalar .....	6
2.2.1.2 Doğala Özdeş Boyalar .....	6
2.2.1.3 Doğal Boyalar .....	6
2.2.2 Renk Seçimini Etkileyen Faktörler .....	7
2.3 Antosiyantinler .....	7
2.3.1 Yapı .....	9
2.3.2 Antosiyantinlerin Renklerini ve Kararlılıklarını Etkileyen Faktörler .....	11
2.3.2.1 pH .....	11
2.3.2.2 Sıcaklık .....	12
2.3.2.3 Oksijen ve Hidrojen Peroksit .....	12
2.3.2.4 Işık .....	13
2.3.2.5 Enzimler .....	13
2.3.2.6 SO <sub>2</sub> .....	13
2.3.2.7 Şekerler ve Şekerlerin Bozunma Ürünleri .....	14
2.3.3 Ekstraksiyon ve Analizler .....	14
2.3.3.1 Ekstraksiyon .....	14
2.3.3.2 Saflaştırma .....	15
2.3.3.3 Kalitatif Analizler .....	15
2.3.3.4 Kantitatif Analizler .....	16
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	18
3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler .....	18
3.1.1 Çözeltilerin Hazırlanması .....	19
3.2 Araçlar ve Gereçler .....	21
3.3 Denemeler .....	22
3.3.1 Uygun İyon Değiştirici reçine ve Eluasyon Çözeltilisini Bulma Çalışmaları .....	22
3.3.1.1 Uygun İyon Değiştirici Reçineyi Bulma Çalışmaları .....	22
3.3.1.2 Uygun Eluasyon Çözeltilisini Bulma Çalışmaları .....	24

3.4	Karaduttan Doğal Gıda Boyası Elde Etme Çalışmaları .....	27
3.4.1	Boyarmaddenin Isıya Karşı Direncinin İncelenmesi .....	29
3.4.2	Boyarmaddenin UV Işığa Karşı Direncinin İncelenmesi.....	29
3.4.3	Boyarmaddenin pH'ya Karşı Direncinin İncelenmesi .....	29
3.4.4	Boyarmadde Üzerine Hava Oksijeninin Etkisi .....	30
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1	Başlangıç Denemeleri .....	31
4.2	Spesifik Absorbtivite Katsayısının Hesaplanması .....	34
4.3	Isı Denemesi Sonuçları.....	35
4.4	UV Işığa Karşı Direnç.....	36
4.5	pH'ya Karşı Direnç .....	38
4.6	Hava Oksijenine Karşı Direnç.....	39
4.7	Tartışma.....	41
KAYNAKLAR .....		42
ÖZGEÇMİŞ .....		45

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Beyaz ışığın prizmadan geçerek kırılması .....	3
Şekil 2.2 Doğrudan gelen ve yansıyan ışık .....	3
Şekil 2.3 Ana renkler ve karışımları .....	4
Şekil 2.4 Antosiyeninlerin genel yapısı .....	9
Şekil 2.5 % Absorbans-pH grafiği .....	11
Şekil 2.6 Dolaylı oksidasyon mekanizması .....	12
Şekil 3.1 Zayıf bazik anyon değiştirici ile çalışma düzeneği .....	23
Şekil 3.2 Evaporasyon düzeneği .....	28
Şekil 4.1 Titrasyon Eğrisi .....	33
Şekil 4.2.a Boya çözeltisinin 250-600nm arası UV spektrumu .....	33
Şekil 4.2.b Boya çözeltisinin 450-600nm arası UV spektrumu .....	33
Şekil 4.3.a Başlangıç sıcaklığının UV spektrumu .....	36
Şekil 4.3.b Kaynama sıcaklığının UV spektrumu .....	36
Şekil 4.4.a Başlangıç çözeltisinin UV spektrumu .....	37
Şekil 4.4.b 6. saat sonunda UV spektrumu .....	37
Şekil 4.4.c 12. saat sonunda UV spektrumu .....	37
Şekil 4.4.d 24. saat sonunda UV spektrumu .....	37
Şekil 4.5.a pH 3 çözeltisinin UV spektrumu .....	38
Şekil 4.5.b pH 5 çözeltisinin UV spektrumu .....	38
Şekil 4.5.c pH 7 çözeltisinin UV spektrumu .....	38
Şekil 4.5.d pH 9 çözeltisinin UV spektrumu .....	39
Şekil 4.5.e pH 11 çözeltisinin UV spektrumu .....	39
Şekil 4.6 Boyarmadde çözeltisinin UV spektrumu .....	39
Şekil 4.7 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> eklenmiş boyarmadde çözeltisinin 10. dakika sonundaki UV spektrumu .....	40
Şekil 4.8 NaNO <sub>2</sub> eklenmiş boyarmadde çözeltisinin 5. dakika sonundaki UV spektrumu .....	40

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Avrupa Birliği'nce listelenmiş doğal gıda boyaları.....	6
Çizelge 2.2 Doğada en sık karşılaşılan antosiyaninler.....	10
Çizelge 4.1 İlave edilen mL (0,1 N NaOH), pH, renk değişimi .....	32
Çizelge 4.2 Asitlendirilen boya çözeltisi, dalga boyu, absorbands, konsantrasyon değişimi ....	34
Çizelge 4.3 Standart sapma hesaplamaları.....	35
Çizelge 4.4 Sıcaklık, $\lambda_{max}$ , absorbands değişimi .....	36
Çizelge 4.5 Süre, dalga boyu, absorbands değişimi .....	37
Çizelge 4.6 pH, çözelti rengi değişimi .....	38
Çizelge 4.7 Süre, $\lambda_{max}$ , absorbands değişimi .....	39

## **ÖNSÖZ**

Çalışmalarımızın başından bitimine kadar hiçbir konuda desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Hüseyin Afşar'a, çalışmalarımızdaki emeklerinden dolayı sayın Dr. Fatma Turak'a, manevi desteklerinden ötürü sevgili arkadaşlarıma, sevgili aileme ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

Günümüzde, pek çok alanda olduğu gibi gıda endüstrisinde de doğal kaynaklı hammaddelere ve ürünlere olan ilgi artmıştır. Bunun sonucu olarak, bu alanda yapılan araştırmalar hız kazanmıştır.

Bu çalışmada, doğal gıda boyası elde edilmeye çalışılmış ve pigment kaynağı olarak karadut meyvesi seçilmiştir. Karadut, içerisinde suda çözünen ve pek çok meyve ve sebzenin kırmızıdan maviye renklenmesine sebep olan antosiyanin bileşiklerini içermektedir.

Boyarmaddenin moleküler yapısı kesin olarak bilinmediğinden, bu maddenin sıcaklığa, pH'a, UV ışığa, hava oksijenine, yükseltgenler ve indirgenlere karşı dayanımı araştırılırken molar absorbtivite katsayısı yerine spesifik absorbtivite katsayısı kullanılmıştır. Spesifik absorbtivite katsayısını saptayabilmek için katı ve saf pigment elde edildikten sonra boyarmaddenin asitli çözeltisi hazırlanarak yukarıdaki etkenlere karşı davranışı araştırılmıştır. Spesifik absorbtivite katsayısı  $a = 9,9089 \text{ 100mL/gxcm}$  olarak hesaplanan boyarmaddenin, ısıya karşı kaynama noktasında bile dayanıklı olduğu, UV ışıktan etkilenecek kolaylıkla bozunduğu, asidik ortamda kararlıyken nötral ve bazik ortamda kararlılığını uzun süre koruyamadığı gözlenmiştir. Hava oksijenine karşı kararlılığını uzun süre koruyabilen boyarmaddenin, yükseltgen ve indirgenler karşısında hemen bozunduğu saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Karadut, gıda boyası, antosiyaninler, spesifik absorbtivite katsayısı.

## **ABSTRACT**

Recently, interest to the natural sourced raw materials and products is increased in food industry such as most industries. For this reason, investigations in this area get more favorable.

In this study, natural food colorant was produced by blackberry fruit that using as a pigment source. This fruit contains “anthocyanin compounds” which cause the colour change of most fruits and vegetables, soluble in water, from red to blue.

Because of unknown molecular structure of colouring matter, the resistance of this material was measured to the pH, temperature, UV light, air oxygen, oxidants and reductants. While doing these analysis, the specific absorbivity coefficient was used instead of molar absorbivity coefficient. For calculating specific absorbivity coefficient, firstly solid and pure pigment was formed and after that prepared its acidic solution. This acidic solution of pigment supplied that the investigation of the above properties. The specific absorbivity coefficient of colouring matter was found as 9,9089 100 mL/gxcm, it is resistance to the heat also at its boiling point and decomposed easily by UV light. Also, colouring matter is stable in acidic medium, but not stable in neutral and basic medium for a long time. At final, It is stable against air oxygen and is decomposed immediately by oxidants and reductants.

**Keywords :** Blackberry, natural food colorant, anthocyanins, specific absorbivity coefficient

## 1. GİRİŞ

Renk, günlük hayatta karşılaşılan her ürünün temel özelliklerinin başında gelir. Göz, üç ana renk olan kırmızı, sarı ve maviye tepki verir ve beyin, diğer renkleri bu üç ana rengin farklı kombinasyonları olarak algılar. Tat alma, duyma, dokunma ve diğer duyularımızda olduğu gibi, renklerin algılanışı da kişiden kişiye göre değişir. Günümüzde, tekstil, otomotiv ve matbaa gibi pek çok edüstride olduğu gibi gıda endüstrisinde de renk önemli bir rol oynar. Gıdalar, gerek görsel çekiciliklerini artırmak gerek üretim sırasında kaybolan renklerini geri kazanmak amacıyla gıda boyalarına gereksinim duyarlar. Gıda boyalarının keşfinden önceki dönemlerde, yiyeceklerin rengini ve lezzetini arttırmak için doğal ürünler kendi formları içinde yiyeceğe katılmaktaydılar; baharatlar, çeşitli kabuksuz meyveler, çeşitli otlar,... gibi. Sentetik boyaların keşfiyle, zaman içinde doğal gıda boyalarının yerini sentetik boyalar almaya başladı. İlk yıllarda, sentetik boya ile renklendirilen bir ürün, doğal gıda boyalarıyla üretilen üründen çok daha yüksek maliyetliydi. Bunun nedeni, doğal kaynakların bol miktarda bulunması ve daha düşük fiyatlarla satılmasıydı. Bunu takip eden zaman içersinde, çok çeşitli sentetik boyaların dünya çapında üretimine başlandı. Böylelikle başlangıçtaki durum tersine dönmüş oldu. Ancak her sentetik maddenin azda olsa vücuda olan zararlı etkilerinin fark edilmesi, günümüzde her alanda olduğu gibi gıda endüstrisinde de doğal gıdalara olan ilginin artmasına yol açtı. Bunun sonucu olarak, doğal gıda boyalarının elde edilmesi ve kullanılması çalışmaları hız kazanmış oldu.

Bu çalışmada, bir doğal gıda boyası elde edilmiş ve pigment kaynağı olarak karadut meyvesi seçilmiştir. Karadut, içerisinde suda çözünen ve pek çok meyve ve sebzenin kırmızıdan maviye renklenmesine sebep olan antosiyenin bileşiklerini içerir. Kuvvetli katyonik iyon değiştirici ile saflaştırılıp, alkollü asit çözeltisiyle reçeneden elue edilen boyarmadde, evaporasyon işleminin ardından kuru olarak ele geçirilmiştir. Bu çalışmalar sonunda elde edilen doğal boyarmaddenin sıcaklık, pH, UV ışık v.b. gibi çeşitli etkenlere karşı gösterdiği direnç araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Renk

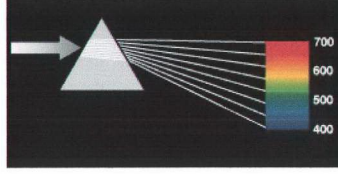
İnsan tarafından renklerin algılanması, ışığın cisimler tarafından yansıtılması ve öznenin göz yardımıyla beyne iletilmesi sayesinde gerçekleşir. Göz tarafından algılanan ışık, retinada sinirsel sinyallere dönüştürülüp, buradan optik sinir aracılığıyla beyne iletilir. Göz, üç temel renk olan, kırmızı, yeşil ve maviye tepki verir ve beyin, diğer renkleri bu üç temel rengin farklı kombinasyonları olarak algılar. Renklerin algılanışı dış koşullara bağlı olarak değişir. Aynı renk doğrudan gelen ve doğrudan gelmeyen ışıkta farklı algılanır. Fakat insanın görme duyusu ışığın kaynağına uyum sağlayarak, her iki koşuldaki rengin aynı olarak algılanmasını sağlar. Tat alma, duyma, dokunma ve diğer duyularımızda olduğu gibi, renklerin algılanışı da kişiden kişiye değişir. Denilebilir ki herhangi bir renk, iki ayrı insanda farklı duygular uyandırır.

Işık, aydınlattığı nesnenin algılanmasını sağlayan araç olarak tanımlanır. Biz bir nesneyi ancak gözlerimiz nesnenin yansıttığı ışık tarafından uyarıldığı zaman görür ve bunu bir renk olarak algılarız.

#### 2.1.1 Renk Tayfı

Işık elektromanyetik bir dalgadır. Işığın özellikleri, radyo dalgalarından gamma ışınlarına kadar gidebilen elektromanyetik dalganın boyuna göre değişir. İnsanlar öğle ışığını “beyaz ışık” olarak algırlarlar. Bu görülen, ışığın 400nm’ den (mavi) 700nm’ ye (kırmızı) değişen kombinasyonlarıdır.

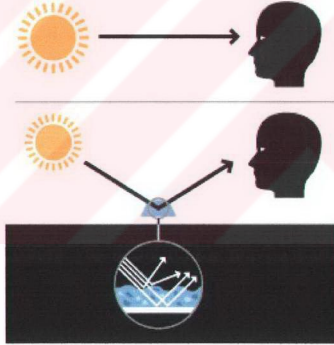
Beyaz ışık bir prizmadan geçtiği sırada kırılır ve gökkuşağının yedi rengine ayrılır. Bu ışık bir cisimle karşılaştığında, bir bölümü cismin üstünden yansır. Bizim, nesnenin rengi olarak algıladığımız şey işte bu yansımadır.



Şekil 2.1 Beyaz ışığın prizmadan geçerek kırılması

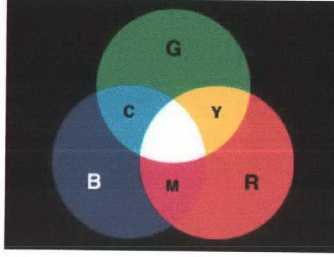
### 2.1.2 Doğrudan Gelen ve Yansıyan Renk

İnsanlar iki çeşit rengi algılayabilirler. Işık yayan bir cismin rengi “doğrudan gelen renk” ve bir ışık kaynağı ile aydınlatılmış bir cismin rengi “yansıyan renk” olarak adlandırılır. Yansıyan renk, cismin yüzeyinden ve yüzeyin iç kısımlarından yansıyan ışığın bir birleşimidir.



Şekil 2.2 Doğrudan gelen ve yansıyan ışık

İnsan gözü 400-500 nm civarındaki dalga boylarını mavi, 500-600 nm civarındakileri yeşil ve 600-700 nm civarındaki dalga boylarını kırmızı olarak algılar. Doğadaki tüm renkler bu üç rengin farklı oranlarda karışmasıyla elde edilebilir. Üç rengin eşit oranda karışımından beyaz ışık elde edilir. Her bir eleman %0 oranına indirildiğinde ise ışsızlık, karanlık yani siyah elde edilir. Karışımın kırmızı ayrıştırıldığı zaman siyah (mavi-yeşil karışımı), yeşil çıkarıldığı zaman magenta (mora yakın bir renk), mavi çıkarıldığındaysa sarı elde edilir ([www.epson.com.tr](http://www.epson.com.tr)).



Şekil 2.3 Ana renkler ve karışımları

## 2.2 Gıdalarda Renk

Gıda boyaları insanların yeme alışkanlıklarını daima şekillendirmiş ve bu nedenle uzun yıllardan beri tüketile gelmiştir. Doğal renkli bir gıdanın daha cazip olduğu kesindir ancak çoğunlukla endüstrinin beklentileri sonucu çeşitli katkılarla gıdanın renklendirilmesi durumu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, doğal kaynaklar modern gıda endüstrisinde kullanılmak üzere geniş bir aralıkta çekici renkler sağlayabilmektedirler. Özellikle beş doğal renklendirici, gıda endüstrisinde büyük oranda kullanılmaktadır. Bunlar;

- Annato
- Beetroot (Pancar)
- Antosiyantinler
- Turmerik (Zerdeçal, Hint Safranı)
- Carmine (Kırmızı)

Bir gıdanın rengi onun ilk karakteristik özelliğidir ve gıdanın rengi bu yiyeceğin tadı ve niteliği hakkında bir ön izlenim sunar. Ayrıca, bir yiyeceğin kalitesi ilk olarak rengi esas alınarak sorgulanır. Pek çok bilimsel araştırma yiyeceklerin renginin ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. Kuşkusuz herkes solmuş sebzelerden, çürümüş meyvelerden ve yanık yemeklerden kaçınır. Eğer yiyecek renkli ise renk ve tat eşleştirilir; sarı ve limon, yeşil ve ıspanak, kırmızı ve domates,... gibi. Pek çok kez tat ancak renkle doğru olarak tanımlanmaktadır (Du Bose v.d.,1980). Kırmızı limon yada siyah domatesin yeni teknolojilerle üretimi mümkün olmakla birlikte tüketici bulma olasılığı oldukça düşük

olacaktır. Bu nedenle üretilen gıdalar görsel bir çekiciliğe gereksinim duyarlar. Bazı besin maddelerinin kendine özgü renkleri vardır; meyveler, sebzeler, et, yumurta,... gibi. Ancak bazı gıda maddelerinin doğal renkleri çok düşük seviyededir yada hiç yoktur. Böyle ürünlerin, görsel çekiciliklerini arttırmak için renk katkılarına gereksinim duyulur. Bununla birlikte meyve ve sebzelerin renkleri mevsimden mevsime değişebilmekte ve bunlar, üretimin herhangi bir aşamasında renk kayıplarına maruz kalabilmektedirler. Gıda üreticileri, ürünlerinin görünümünün daima aynı olduğunu garanti etmek zorundadırlar. Üreticiler için rengin tutarlılığı, üretim sürecinin uygunluğunun görsel bir kanıtıdır.

Gıdalarda boyalar özetle;

1. Gıda maddesi doğal olarak renkliyse ancak bu renk tüketicinin talebinden daha hafif tondaysa renk tonunu artırmak amacıyla,
2. Üretim sırasında partiler arasındaki renk tonunun aynılığının garanti altında tutulması amacıyla,
3. Üretim sırasında rengini yitiren gıda maddesinin asıl renginin geri kazanılması amacıyla,
4. Şekerlemeler ve gazlı içecekler gibi neredeyse renksiz üretilen gıdaların renklendirilmesi amacıyla kullanılmaktadırlar (Food Adv. Com.,1987).

### **2.2.1 Gıda Boyalarının Sınıflandırılması**

Sör William Perkin'in 1856 yılında sentetik boyayı keşfiyle ve bunu takiben boyarmadde endüstrisinin gelişimiyle birlikte gıda maddelerine boya eklenmesi söz konusu olmuştur. Bundan önceki dönemlerdeyse yiyeceklerin rengini ve lezzetini arttırmak için doğal ürünler kendi formları içinde yiyeceğe katılmaktaydılar. Örneğin; baharatlar, çeşitli kabuksuz meyveler, çeşitli otlar,... gibi. Sentetik boyaların kullanıldığı ilk yıllarda bu şekilde üretilen bir ürün doğal gıda boyalarıyla üretilen üründen daha yüksek maliyetliydi. Bunun nedeni, doğal kaynakların bol miktarda bulunması ve daha düşük fiyatlarla satılmasıydı. Bunu takip eden zaman içerisinde çeşitli sentetik boyalar geliştirilip dünya çapında üretilmeye başlandı. Böylelikle başlangıçtaki durum tersine döndü. Günümüzde pek çok alanda olduğu gibi gıda endüstrisinde de doğal gıdalara olan ilginin artmasıyla doğal boyaların kullanılması çalışmaları da hız kazanmıştır (Hendry v.d., 1996).

Genel olarak literatürde 3 tip organik gıda boyası tanımlanır;

1. Sentetik Boyalar
2. Doğala Özdeş Boyalar
3. Doğal Boyalar

### 2.2.1.1 Sentetik Boyalar

Doğal yollar yerine kimyasal sentezlerle elde edilen renklendiricilerdir. Örneğin; sunset sarısı, karmoizin, tartrazin,... gibi.

### 2.2.1.2 Doğala Özdeş Boyalar

Bu renklendiriciler de kimyasal olarak sentezlenirler ancak bu reaksiyonlar doğadaki reaksiyonlarla özdeştir. Örneğin;  $\beta$ -karoten, riboflavin,... gibi.

### 2.2.1.3 Doğal Boyalar

Bu organik renklendiriciler, belli gıda hazırlama yöntemlerinde kullanılmak üzere doğal ve yenilebilir kaynaklardan elde edilirler. Örneğin; turmerik'ten kurkumin, annato tohumlarından biksin, kırmızı meyvelerden antosiyaninler gibi (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1 Avrupa Birliği'nce listelenmiş doğal gıda boyaları (Hendry v.d., 1996)

<u>Numara</u>	<u>Renk</u>
E100	Kurkumin
E101	Riboflavin,Riboflavin-5'-fosfat
E120	Karminik asit ve karminler
E140	Klorofiller ve klorofilinler
E141	Klorofiller ve klorofilinlerin bakır kompleksleri
E150a	Saf karamel
E153	Sebze karbonu
E160a	$\beta$ -karoten ve karışık karotenler
E160b	Annatto, biksin, norbiksin
E160c	Kırmızı biber ekstraktı, kapsantin, kapsorubin
E160d	Likopen
E160e	$\beta$ -Apo-8'-karotenol (C30)

E161b	Lutein
E161g	Kanthaksantin
E162	Kırmızı pancar, betanin
E163	Antosiyaninler

### 2.2.2 Renk Seçimini Etkileyen Faktörler

Bir uygulamada kullanılacak doğal gıda boyası seçilirken aşağıdaki faktörler incelenir (Hendry v.d., 1996):

- I. İstenen ton; İstenen renk tonunu elde etmek için sıklıkla iki yada daha fazla gıda boyasını karıştırmak gerekir.
- II. Ülke yasaları; ürün hangi ülkede satılacaksa o ülkenin konu ile ilgili yasalarına uygunluğa dikkat edilmelidir.
- III. İstenen fiziksel form; sıvı doğal boyalar maliyeti genellikle toz boyalardan daha fazla etkiler.
- IV. Gıda maddesinin birleşimi; özellikle sıvı bir sistem veya belli bir seviyenin üzerinde katı yada sıvı yağa sahip bir gıda maddesinde, tanin ve proteinlerin varlığında bazı gıda boyalarının kullanımı “antosiyaninler gibi” sınırlıdır. Bu durum bulanık yada net renk elde etmek istememize göre değerlendirilmelidir.
- V. Üretim koşulları; özellikle sıcaklık ve boyanın bu sıcaklıkta kararlı kalma süresi önem taşır.
- VI. pH; birçok doğal boyada renk tonunun kararlılığı pH'dan etkilenir. Bu nedenle gıda maddesinin pH'sı, kullanılacak boyanın seçiminde en etkili faktörlerden biridir.
- VII. Paketleme; paketteki ürün bir miktar oksijene ve ışığa maruz kalabilir. Bu nedenle gıda boyasının özelliklerine göre paketleme koşullarına dikkat etmek gerekir.
- VIII. İstenen raf ömrü ve depolama koşulları da göz önünde bulundurulmalıdır.

### 2.3 Antosiyaninler

Antosiyaninler suda çözünen ve pek çok meyve ve sebzenin kırmızıdan maviye renklenmesine sebep olan bileşiklerdir. Liste oldukça uzun olmakla birlikte; üzüm, kırmızı ve siyah kuş üzümü, ahududu, çilek, elma, vişne, karadut, pancar,... gibi meyveler bol miktarda antosiyanin içerir (Timberlake v.d., 1980). Kimyasal olarak flavilyum yada 2-

fenilbenzopriylum tuzlarının glikozidleridir ve genellikle altı antosiyanidinden şekillenirler, bunlar;

- Pelargonidin
- Delfinidin
- Siyanidin
- Petunidin
- Peonidin
- Malvidin

Antosiyaninlerin şeker kısmı ise, genellikle glukoz, galaktoz, ramnoz ve arabinozdan herhangi birinin varlığıyla şekillenir. Buna ek olarak şeker fenolik yada alifatik asitle açılmış olabilir. Doğada 300 çeşit antosiyanin bulunmuştur. Bazı meyvelerde “çilek gibi” bir yada iki çeşit antosiyanin bulunurken bazı üzüm çeşitlerinde en az 15 çeşit antosiyanin bulunmaktadır.

Rengi, içerisinde antosiyanin bulunan tüm meyve ve sebzelerden ekstrakte etmek mümkündür. Fakat ekonomik nedenlerle şarap endüstrisinin yan ürünü olan üzüm kabuğundan antosiyanin eldesi en çok kullanılan yöntemdir. Üzüm, yılda 10 bin ton antosiyaninin elde edildiği bir meyvedir (Timberlake, 1980). Yüksek pigmentli derisi sayesinde şarap üretiminden sonra bile renk ekstraksiyonu için uygun bir materyaldir. Ekstraksiyonda sulandırılmış asid çözeltisi kullanılır. Çok sayıda gıda maddesi önemli miktarda antosiyanin içerir. Bu gıda maddelerinde, üzüm kabuğundan elde edilen antosiyaninlerden başka, siyah kuş üzümü, karadut, franbuvas ve kırmızı lahananın konsantre suyu bulunabilir. Böyle gıda maddeleri, içlerinde bulunan bu materyallerin tüm renk ve tat özelliklerini taşırlar.

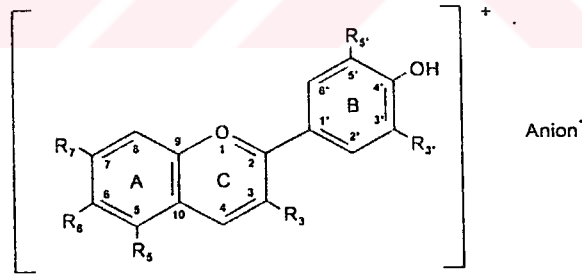
Ticari açıdan kırmızı lahananın ekstrakte edilmesiyle ele geçen renk de önemlidir. Bu yöntem üzüm ekstraksiyonundan daha pahalı bir yöntem olmakla birlikte kırmızı lahana ekstresinin ısı ve ışık stabilitesinin yüksek olması nedeniyle tercih edilmektedir (La Bell, 1990).

Belli oranlarda antosiyanin içeren gıda maddelerini şöyle gruplandırabiliriz (Hendry v.d., 1996);

1. Alkolsüz içecekler
2. Meyve konserveleri
3. Şekerlemeler
4. Günlük ürünler “meyveli süt ve yoğurtlar gibi”
5. Dondurulmuş gıdalar
6. Toz karışımları “suyla seyreltilen toz karışımlar”
7. Alkollü içecekler “özellikle şarap”

### 2.3.1 Yapı

Antosiyaninler aynı biyosentetik orjinlere sahiptirler ve  $C_6C_3C_6$  karbon iskelet yapısındadırlar (Harborne, 1967; Grisebach, 1982). Diğer doğal renklendiricilerden farkları kuvvetli olarak görünür bölge ışınlarını absorblamalarıdır. Antosiyaninler, 18 farklı doğal antosiyanidininin glikozidleridir. Bunlar, 2-fenilbenzopirilyum (flavyliyum) ve polimetoksi türevlerinin tuzlarıdır. (Şekil 2.4, Çizelge 2.2)



Şekil 2.4 Antosiyaninlerin genel yapısı

Antosiyaninler, grupların pozisyonuna ve şeker gruplarının sayısına bağlı olarak 18 grupta sınıflandırılmıştır (Harborne, 1963). Sıklıkla 3-monozid, 3-biosid, 3,5-diglikozid ve 3,7-diglikozidden oluşurlar. Antosiyaninlerde en çok rastlanan glikozil grubu glukozdur. Ayrıca farklı sayıda monosakkarit, disakkarit veya trisakkarit bulundurabilirler. Şeker varlığı antosiyanin kararlılığına etki eder. Antosiyanin kararlılığı glikozil varlığında şu sırayla azalır; glukoz>galaktoz>arabinoz (Starr v.d., 1968; Martinelli v.d., 1992). Antosiyaninlere bağlı

şekerler, p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik, gallik ve p-hidroksibenzoik asitler gibi aromatik asitler ve/veya malonik, asetik, malik, süksinik, ve okzalik asit gibi alifatik asitlerle açillenirler. Açıl substituentler genellikle C-3 şeker karbonundan bağlanırken, esterleşme şekerin 6-OH veya 4-OH grubu üzerinden gerçekleşir (Gueffroy v.d. 1971; Hrazdina v.d.,1974).

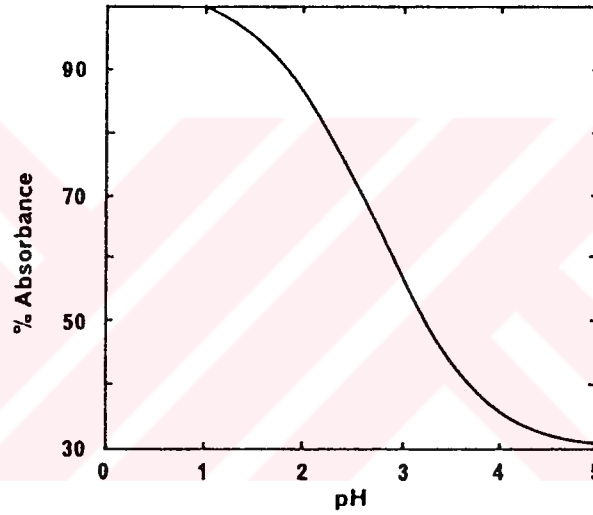
Çizelge 2.2 Doğada en sık karşılaşılan antosiyaninler

Antosiyanidin	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>5'</sub>	Renk
Pelargonidin(Pg)	OH	OH	H	OH	H	H	Turuncu
Siyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Delfinidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H	Turuncu-Kırmızı
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Mavi-Kırmızı
Malvinidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	Mavi-Kırmızı
Apigeninidin(Ap)	H	OH	H	OH	H	H	Turuncu
Luteolinidin (Lt)	H	OH	H	OH	OH	H	Turuncu
Trisetinidin (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	Kırmızı
Aurantininidin(Au)	OH	OH	OH	OH	H	H	Turuncu
6-Hidroksi-Cy	OH	OH	OH	OH	OH	H	Kırmızı
6-Hidroksi-Dp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Rosinidin (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	H	Kırmızı
Hirsutidin (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Mavi-Kırmızı
5-Metil-Cy	OH	OMe	H	OH	OH	H	Turuncu-Kırmızı
Pulehellidin (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	Mavi-Kırmızı
Öropinidin (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	Mavi-Kırmızı
Kapensinidin(Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OMe	Mavi-Kırmızı

## 2.3.2 Antosiyaninlerin Renklerini ve Kararlılıklarını Etkileyen Faktörler

### 2.3.2.1 pH

Antosiyaninler, pH indikatörü gibi hareket ederler. pH sırasıyla 1'den 14'e doğru yükselirken, antosiyaninlerin rengi kırmızıdan mavi-kırmızıya, mora, maviye, yeşilden sarıya doğru değişim gösterir. Bunun doğal sonucu olarak antosiyaninler yalnızca asidik yani pH'ın 4'ün altında olduğu şartlarda kullanılırlar. Renk tonu sadece pH'ın etkisiyle değişmez ancak renk şiddeti pH'ın 1 civarında olduğu durumlarda en yüksek seviyededir ve şiddet pH'ın yükselmesiyle düşüşe uğrar. Aşağıda pH'a karşı % absorbans eğrisini görmekteyiz (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. % Absorbans – pH grafiği

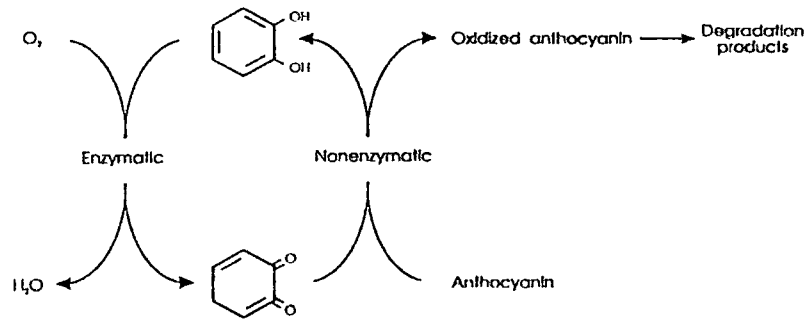
Grafikte görüldüğü gibi, pH'ın 3,5 olduğu aralıktaki renk şiddeti, pH'ın 2 olduğu aralıktaki renk şiddetinin yaklaşık yarısı kadardır. Yine bu aralıkta eğimin çok dik olduğu gözlenmektedir. Bu pH bölgesinde hangi renk şiddetinde çalışılacaksa ona uygun tampon hazırlanmasına dikkat edilmelidir. Herhangi bir pH'ta dört ana antosiyanin/aglikon yapıları arasında bir denge kurulur. Bunlar; mavi renkli kinonoidal “susuz” bazlar , kırmızı flavylium katyonu, renksiz karbinol “psödo” bazları veya yarı asetaller ve kalkonlardır (Hendry v.d., 1996).

### 2.3.2.2 Sıcaklık

Antosiyaninlerin kimyasal reaksiyonlardaki kararlılıkları ve bozunma oranları sıcaklıktan bir miktar etkilenir. Genel olarak yapısal özellikler, pH kararlılığında ve termal “ısı” kararlılıkta artışa yol açar (Van Buren v.d., 1968). Antosiyaninlerin bozunması anaerobik koşullarda pH’tan bağımsızdır (Adams, 1972). Bununla beraber oksijen varlığında, yüksek metoksil, glikozil, ve açıl substitusyonu “yer değiştirme” maksimum termal “ısı” kararlılık koşullarında genellikle pH artışına neden olur (Calvi v.d., 1978). Yani şekerli kısmın açılmesi ısı ve ışığa karşı antosiyaninlerin kararlılıklarını yükseltir. Yüksek sıcaklıklarda, kalkonlar gibi renksiz antosiyanin yapısı oluşur. Verilen bir sistemde çeşitli öğelerin ve kondensasyon “su açığa çıkarma” reaksiyonlarının koruyucu etkileri gözden kaçırılmamalıdır. Polimerik pigmentlerin konsantrasyonu sıcaklıkla yükselme göstermektedir ve meyve suları ile kırmızı şarapların daha kolay renklenmesini sağlamaktadırlar (Bakker v.d., 1986). Yapılan çalışmalar sonucunda, antosiyanin içeren gıdaların üretiminde yüksek sıcaklıkta kısa zamanlı prosesler tavsiye edilmektedir çünkü bu yolla en yüksek seviyede pigment tutunumu sağlanabilir. Kısa zaman, antosiyaninlerde kayda değer bir bozunmayı önlediği gibi, antosiyaninlerin renksiz türlere dönüşümüne de engel olur (Havlikova v.d., 1985; Rommel v.d., 1992).

### 2.3.2.3 Oksijen ve Hidrojen Peroksit

Oksijen, antosiyaninlerin doğrudan oksidasyon mekanizmasıyla bozunmalarına veya dolaylı oksidasyonla yani reaksiyon ortamında yükseltgenmiş ürünlerle birleşerek bozunmalarına neden olur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Dolaylı oksidasyon mekanizması

Askorbik asit ve oksijen antosiyaninlerin bozunmasına benzer etki hareket ederler (Keith v.d., 1965). En yüksek derecede pigment kaybı yüksek konsantrasyonlarda oksijen ve askorbik asit varlığında gerçekleşir. Askorbik asit, antosiyaninlerde  $H_2O_2$  ile dolaylı oksidasyon sonucu yıkıma neden olur.  $H_2O_2$  ilavesi ile antosiyanin içeren meyve sularında yoğun olarak renk azalması gözlenir. Yükseltgenme ürünleri, bozunma ve/veya polimerizasyon reaksiyonlarına katılabilir. Meyve sularında yarı asetaller veya kalkon türlerinin doğrudan oksidasyonu sonucu çökme ve bulanıklık gözlenebilir (Yoshida v.d., 1990).

#### **2.3.2.4 Işık**

Antosiyaninler, genel olarak UV ve görünür bölge ışınlarına yada diğer iyonizasyon kaynaklarına maruz kaldığında kararlılıklarını koruyamazlar. Işık, termal bozunma altındaki antosiyanin seviyesinde bir artışa neden olur. Foto-oksidasyon ile antosiyaninler ısıl bozunma sonucu oluşan ürünlerin benzerlerini verirler (Furtado v.d., 1993; Macorone v.d., 1987).

#### **2.3.2.5 Enzimler**

Bitki dokularında bulunan bazı enzimler, antosiyaninlerin bozunmasına ve renk kayıplarına neden olabilirler. Böyle enzimler genel olarak “antosiyanazlar” olarak adlandırılır. Antosiyanazlar aktivitelerine göre 2 gruba ayrılırlar;

- a. Glikozidazlar: Glikozid bağları hidroliz olmuş antosiyaninler serbest şeker ve aglikon verirler. Daha sonra aglikonlar kendiliğinden renksiz kalkonlara dönüşürler (Piffaut v.d., 1994).
- b. Polifenoloksidazlar(PPO): o-difenollerin varlığında antosiyaninlerin yükselgenmelerinde rol oynarlar (Siddiq v.d., 1994).

#### **2.3.2.6 $SO_2$**

$SO_2$  , antosiyaninlerle reaksiyona girerek renksiz bir katılma ürünü verir. Bu reaksiyon geri dönüşümlü bir reaksiyondur. Isı altında  $SO_2$  açığa çıkarak ürün olarak antosiyaninler kalır ve renk yeniden şekillenir. Süflide olmuş meyvenin kaynatılarak konservelenmesinde bu yöntem esas alınmıştır (Hendry v.d.,1996).

### 2.3.2.7 Şekerler ve Şekerlerin Bozunma Ürünleri

Meyve içeren ürünlerin üretimi esnasında yüksek konsantrasyonlu şeker kullanımı (örneğin  $>20\%$ ), azalan su aktivitesiyle antosiyanin kromoforları üzerinde kapsamlı bir koruma etkisi sağlar. Su aktivitesinin azalması, antosiyanin moleküllerinin bozunma oranını düşürür. Antosiyanin kromoforlarının hidratasyonu istenmeyen renksiz türlerin meydana gelmesine sebep olur. Bu sebeple kurutulmuş antosiyaninler “toz halinde”, oda sıcaklığında birkaç yıl bozunmaksızın saklanabilirler (Wrolstad v.d., 1990; Bronnum-Hansen v.d., 1985).

Bir eşik seviyesinin üzerinde “100 ppm gibi” şeker ve şekerin bozunma ürünleri antosiyaninlerdeki bozunmayı hızlandırır. Fruktoz, laktoz, ve sorboz ; glukoz, sükroz veya maltoz'dan daha yüksek oranda bozunmaya neden olurlar (Calvi v.d., 1978).

### 2.3.3 Ekstraksiyon ve Analizler

#### 2.3.3.1 Ekstraksiyon

Antosiyaninler, nötral veya alkali ortamda kararlı olmadıklarından asidik çözeltiler kullanılarak ekstrakte edilirler. Antosiyaninlerin ekstraksiyonunda çoğunlukla düşük kaynama noktalı alkollerin seyreltik mineral asitli ( $\leq 1\%$  HCl gibi) çözeltileri kullanılır (Harborne, 1984). Bu amaçla genellikle metanol tercih edilir ancak gıdalarda toksitesinden dolayı metanol yerine etanol kullanılır (Francis,1982). HCl ile asitlendirme sonucu, düşük pH'ın yanı sıra basit antosiyaninlerden flavylium klorür tuzları oluşacak bir aralık sağlanmış olur. HCl gibi mineral bir asidin kullanımı kompleks pigmentlerin ve ko-pigmentlerin doğal formlarının değişimine, sonraki konsantrasyonlarda ise kararsız açıl ve şeker kalıntılarının kaybına sebep olur (Moore v.d., 1982). Başlangıç pigment ekstraksiyonu için, %60 metanol, n-butanol, etilen glikol, propilen glikol, soğuk aseton, aseton/metanol/su karışımı kullanılabilir (Lowry v.d., 1974). Buna ek olarak kompleks poliaçillenmiş antosiyaninler için, zayıf organik asitler; özellikle formik asit ayrıca asetik, sitrik ve tartarik asit veya daha güçlü ve daha uçucu asitler; trifloroasetik asit ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanılmaktadır. Ekstraksiyon sırasında pigment bozunumunu en düşük seviyede tutmak için  $30^{\circ}\text{C}$ 'nin altında çalışılmalıdır (Francis,1982).

### 2.3.3.2 Saflaştırma

Antosiyanin içeren ekstraktların saflaştırılmasında, solvent sistemlerin genel olarak hiçbiri antosiyaninlere özgü bir ekstraksiyon sağlamaz. Bu çözeltiler, antosiyaninlerin yanı sıra pigment stabilitesi ve analizini etkileyebilen başka maddeleri de “polifenolik maddeler, pektin,... gibi” ekstrakte ederler. Böyle maddeler genellikle kromatografik yöntemlerle sistemden uzaklaştırılırlar. Saflaştırma amacıyla ayrıca Sephadex G-25 veya LH-20, oktadesilsilan, zayıf anyon değiştirici reçine (örneğin Amberlite CG-50) , polietilen glikol dimetilakrilat ve selüloz tipi reçineler kullanılabilir (Davies v.d., 1982; Kim v.d., 1989; Oszmianki v.d., 1988; Lasagabaster v.d., 1994). Ekstrakt içinde önemli oranda lipid, klorofil, veya istenmeyen polifenoller varsa bu materyaller petrol eteri, etil eter veya etil asetat ile yıkanarak giderilir. Analitik amaçlarla antosiyaninlerin saflaştırılmalarında çoğunlukla kağıt ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri kullanılırdı (Francis, 1982). Ancak daha hızlı ve etkili bir ayırışım için bu yöntemlerin yerini yakın zamanda ters faz HPLC yöntemi aldı. Bu teknik herhangi bir bozunmaya sebep olmadığı için elde edilen pikler kolaylıkla diğer analizler için saklanabilmektedirler (Hong v.d., 1990).

### 2.3.3.3 Kalitatif Analizler

Gelişmiş kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle antosiyaninlerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmaları mümkündür. Bununla birlikte, kromatografik veya spektroskopik yöntemler kesin tanımlama için tek başlarına yeterli değildirler. Yapısal karakterizasyon için genellikle aglikonların, şeker kısımlarının ve açıl gruplarının tanımlanması ile şeker ve açıl gruplarının bağlanma pozisyonlarının bilinmesi gerekir. Günümüzde bu amaçla farklı spektroskopik yöntemlerin kombinasyonları kullanılmaktadır; infra-red (IR) (Ribereau-Gayon v.d., 1960), Raman Rezonansı, ultraviolet/visible (UV/VIS) (Strack v.d., 1989), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (Hoshino, 1986) ve Kütle Spektrometrisi (MS) (Takura v.d., 1989) gibi. Kullanılabilir az miktarda materyal mevcut ise antosiyanin yapılarının aydınlanması için MS teknikleri tercih edilebilir. Antosiyaninlerin yapısal özelliklerinin tanımlanmasında hidroliz teknikleri halen önemini korumaktadır. Bu yöntem, HPLC ve gaz-sıvı kromatografisi (GLC) ile birlikte kullanıldığında çabuk ve kesin sonuç verebilmektedir (Baublis v.d., 1995).

Antosiyanin ve aglikonlarının tanımlanmasında daha geniş bilgi edinmek için sulu çözeltilerde yada kağıtta türetiriz. Renk turuncudan kırmızıya ve maviden kırmızıya dönerken yapı ise

pelargonidin, siyanidin, peonidin, malvidin, petunidin ve delphinidine doğru şekillenir (Strack v.d., 1989). Ayrıca UV ışık altında C-5 pozisyonundan substitue olmuş antosiyaninler floresans özellik gösterirler (Pellegrino v.d., 1981). Asidik çözeltide antosiyaninler ve aglikonları iki karakteristik maksimum absorpsiyon sergilerler, 450-550nm arasında görünür bölgede büyük bir pik ve 275nm'de UV bölgede küçük bir pik verirler. En bilinen antosiyanidinlerin ve pek çok antosiyaninin, %0,1 HCl-metanol'deki spektral karakteristikleri Harbone tarafından yayınlanmıştır, bunlar diğer yöntemlerle birlikte kullanılarak tanınmaya yardımcı olurlar (Strack v.d., 1989).

### 2.3.3.4 Kantitatif Analizler

Yapılacak analizlerin gereksinimlerine göre kantitatif yöntemler üç gruba ayrılır (Strack v.d., 1989);

1. Toplam antosiyanin konsantrasyonunun, çok az miktarda girişim yapan madde içeren yada girişim yapan bu maddeleri hiç içermeyen sistemlerde tanımlanması.
2. Toplam antosiyanin konsantrasyonunun girişim yapan materyaller içeren sistemlerde tanımlanması.
3. Tekil pigmentlerin kantitatif tayini.

Taze bitki ekstraktlarında yada meyve sularında genellikle, antosiyaninlerin maksimum absorpsiyon yaptıkları bölgede "465-550 nm" girişim yapan bileşikler az miktarda bulunur. Toplam antosiyanin konsantrasyonu, asitlendirilmiş alkolle seyreltilen örneğin uygun dalga boyunda absorbansının ölçülmesiyle ifade edilebilir. Adams adlı bir bilim adamı absorbans ölçümlerinin en yüksek düzeyde renk oluşumunu sağlayacak, mümkün olan en düşük pH 'ta yapılmasını önermiştir. Toplam antosiyanin miktarının karşılaştırmalı ölçümleri, pH 1'de örnek ağırlıklı olarak 3-glikozidler içerirken ve pH 1'in altında ağırlıklı 3,5-diglikozid varlığında yapılabilir (Adams, 1972).

Karışık antosiyanin içeren örneklerde, düşük pH değerindeki absorbans ölçümleri toplam antosiyanin konsantrasyonu ile orantılıdır. Karışım içindeki antosiyaninlerin her birinin konsantrasyonu, örnekteki her bir pigmentin oranının önceden bilinmesi ile hesaplanabilir. Mutlak konsantrasyonlar, absorbtivite ağırlıklı ortalaması kullanılarak ve belli dalga boylarındaki absorbans ölçümlerinin ağırlıklı ortalamaları kullanılarak hesaplanabilir

(Shewfelt v.d., 1978). Daha doğru hesaplamalar, içerisinde tek bir pigment bulunan veya ağırlıklı olarak bir pigment içeren örneklerden elde edilir. Çok sayıda antosiyaninin molar ekstinksiyon katsayıları “absorbivitelere” yayınlanmıştır (Francis, 1982). Tanımlama için molar absorbivitelere yararlanılacaksa, absorbans ölçümlerinde aynı solventle ve aynı pH’da çalışmak gerekmektedir. Saflaştırılmamış pigment ekstraktları, düşük pH’da antosiyaninlerin maksimum absorpsiyon yaptığı bölgede absorpsiyon yapan bileşikler içerebilirler. Girişim yapan maddeler içeren böyle örneklerde toplam antosiyanin konsantrasyonunu tanımlamak için diferansiyel veya subtraktif “çıkarma” absorpsiyon yöntemleri kullanılır (Wrolstad, 1976).

Subtraktif “çıkarma” yönteminde, örneğin görünür bölgedeki maksimum absorpsiyonuna gereksinim duyulur. Daha sonra ağartma yapılarak şahit okuma gerçekleştirilir. Bu değerden antosiyanin absorbansı çıkarılarak antosiyanin miktarına orantılı bir absorbans değeri elde edilir. Bu absorbans değeri, standart pigmentler ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisi kullanılarak konsantrasyona çevrilebilir. En çok kullanılan ağartıcı ajanlar sodyum sülfid ve hidrojen peroksittir. Subtraktif yöntemde kullanılan ağartıcı ajanlar, bazı girişim yapan maddelerin absorbanslarını düşürebilirler ve toplam pigment konsantrasyonunun yanlış hesaplanmasına neden olabilirler. Bu nedenle subtraktif yöntem pek çok bilim adamı tarafından eleştirilmektedir (Francis, 1982; Wrolstad, 1976).

Diferansiyel yöntem, antosiyanin kromoforlarının yapısal değişimlerinin pH’ın fonksiyonu olarak tanımlanması esasına dayanır. Yöntem ayrıca, girişim yapan kahverengi “bozunma” ürünlerinin spektral davranışlarının incelenmesine dayanır (Somers, 1978). Bozunma ürünleri genellikle pH’taki değişimden etkilenmez. Aynı dalga boyunda, iki pH değerinde ölçülen absorbanslar arasındaki fark, antosiyanin konsantrasyonuna eşit kabul edilir. Aradaki farkın alınması, girişim yapan maddelerden kaynaklanan absorbansın ihmal edilmesi anlamına gelir. pH 1 ve pH 4,5 diferansiyel yöntemde en çok tercih edilen pH’lardır. Dikkat edilmesi gereken bir nokta ise, pH’ın ayarlanması sırasında farklı antosiyanin türleri arasında denge oluşması için yeterli zamanın olmayışının yanlış sonuçlar doğurabilmesidir (Lin v.d., 1992).

Tekil antosiyaninlerin kantitatif analizleri, bunların öncelikle karışımdan ayrılmaları veya saflaştırılmaları ile mümkün olur. Bu amaçla genellikle kağıt veya ince tabaka kromatografisi yöntemlerine başvurulur. Önceden de bahsedildiği gibi, pek çok antosiyaninin molar

absorbiviteleri miktar hesaplarında kullanılmaktadır. Antosiyaninler için en kesin kantitatif analiz yöntemi ters faz HPLC'dir (Strack v.d., 1989).

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Kimyasal Maddeler Ve Çözeltiler

Sodyum hidroksit (Riedel de Haen, 06203)

Sodyum klorür (Merck)

Sodyum nitrat (Merck)

Sodyum nitrit (Merck)

Sodyum sülfat (Merck)

Hidroklorik asit, %37'lik (Merck)

Sülfat asidi, %95-97'lik (Riedel de Haen, 07208)

Nitrat asidi (Riedel de Haen, 07006)

Hidrojen peroksit (Merck)

Teknik metanol

Teknik etanol

İzopropil alkol (Merck)

Aseton (Merck)

Potasyum klorür (Merck)

Potasyum permanganat (Merck)

Potasyum iyodür (Riedel de Haen, 03124 )

Ksilen (Merck)

Gümüş nitrat (Fluka, 85228)

Nişasta (Horasan Kimya)

Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine (Dowex 50WX4 )

Zayıf asidik katyon değiştirici reçine (Amberlite IRC76)

Kuvvetli bazik anyon değiştirici reçine (Amberlite IRA900RF)

Zayıf bazik anyon değiştirici reçine (Amberlite IRA96RF)

pH-metrenin kalibrasyonunda kullanılan tampon çözeltiler:

pH 4,01 (Potasyum hidrojen ftalat, 25°C, Merck)

pH 7,00 (Potasyum dihidrojen fosfat / di-sodyum hidrojen fosfat, 25°C, Merck)

### 3.1.1 Çözeltilerin Hazırlanması

- %10'luk HCl Çözeltisi:

%37'lik HCl'den 27mL alınıp teknik metanol'ün 1 kez destillenmesi ile elde edilen saf metanolla 100mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti ekstraksiyon çözeltisi olarak kullanıldı.

- 0,1 M HCl Çözeltisi:

Yaklaşık 0,1 M HCl çözeltisi hazırlamak için, %37'lik HCl'den 9,9mL alınıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %1'lik HCl Çözeltisi:

%37'lik HCl'den 2,7mL alınıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %3'lük HCl Çözeltisi:

%37'lik HCl'den 8,1mL alınıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %5'lik HCl Çözeltisi:

%37'lik HCl'den 13,5mL alınıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %1'lik NaOH Çözeltisi:

1 g NaOH tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- 0,1 M NaOH Çözeltisi:

Yaklaşık 3 g NaOH, bir huni üzerinde destile su ile yıkanarak karbonatından arıtıldıktan sonra 200mL destile su içerisinde çözüldü. Bu çözeltinin 1mL'sinde çözünmüş olarak bulunan NaOH titrimetrik yöntemle saptandı. 100 mL 0,1 N çözelti için gereken hacim, hesaplandıktan sonra pipetle alınarak 100mL'ye seyreltildi.

- Metanolde %1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çözeltisi:

%98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den 1mL alınıp, metanolla 100mL'ye tamamlanır.

- %10'luk H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Çözeltisi:

%98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'den 10mL alınıp, destile suyla 100mL'ye tamamlanır.

- %5'lik  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  Çözeltisi:

5 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %5'lik  $\text{NaCl}$  Çözeltisi:

5 g  $\text{NaCl}$  tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- %10'luk  $\text{KCl}$  Çözeltisi:

10 g  $\text{KCl}$  tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- 0,1 M  $\text{AgNO}_3$  Çözeltisi:

Yaklaşık 0,1M'lık  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi hazırlamak için 17 g  $\text{AgNO}_3$  tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- 0,1M  $\text{KI}$  Çözeltisi:

Yaklaşık 0,1M'lık  $\text{KI}$  çözeltisi hazırlamak için 6,6 g  $\text{KI}$  tartılıp, destile suyla 100mL'ye tamamlandı.

- Nişasta Çözeltisi:

5-6 g patates nişastası az miktardaki su ile emülsiyon yapıldı. Bu emülsiyon kaynamakta olan damıtık suya ilave edildi, birkaç dakika daha kaynatıldı.

### 3.2 Araçlar Ve Gereçler

ATI Unicam UV2 marka UV-Vis spektrofotometre

Beckman marka 1 cm ışık yollu kuvarz küvet

Schott Gerate CG 818 dijital pH-metre, Metrohm marka 9100 Herisau kombine cam elektrot

Chiltren Hotplate H 531 magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı

Gec Avery VA304 hassas terazi

Philip Harris etüv (20-240°C)

Schott Duran ve Robu-Glas marka süzgeç kroze, por.3, 4

Vakum evaporatörü

1000, 500 ve 100 mL'lik armudi balonlar

Vakum desikatörü

Cam kolon

Ayırma hunisi

Kronometre

### 3.3 Denemeler

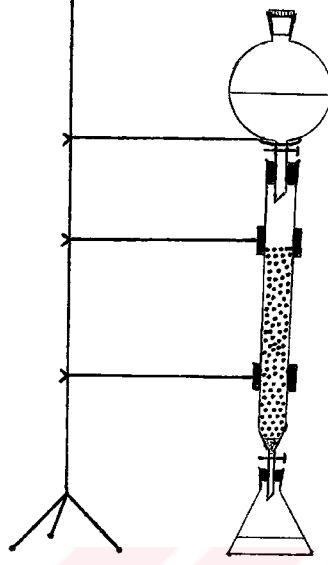
#### 3.3.1 Uygun İyon Değiştirici Reçine ve Eluasyon Çözeltisini Bulma Çalışmaları

##### 3.3.1.1 Uygun İyon Değiştirici Reçineyi Bulma Çalışmaları

Denemelere, boyarmaddeyi kolaylıkla tutan kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine ile başlandı. Ancak başlangıçta birçok eluasyon çözeltisi denenmesine rağmen, uygun olanın bulunamaması nedeniyle iyon değiştirici reçinenin cinsinin değiştirilmesine karar verildi. Destile suyla karaduttan ekstrakte edilen boyarmadde çözeltisi doğrudan kuvvetli katyonik, kuvvetli anyonik, zayıf katyonik ve zayıf anyonik reçineyle işleme sokuldu. Boyarmadde, bu şekilde yalnızca kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine tarafından tutuldu. Boyarmaddenin amfoterik yapıda olduğu bilindiğinden kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine yerine zayıf bazik anyon değiştirici reçine kullanılmaya karar verildi. Zayıf bazik anyon değiştirici reçine ile çalışabilmek için boyarmaddenin anyon formunda olması gerektiğinden, pH=10 civarına ayarlandı. Daha yüksek pH'larda, boyarmaddenin bozunduğu gözleendiğinden, kuvvetli bazik anyon değiştirici reçineyle çalışılmamıştır.

- pH=10' a getirilen boyarmadde çözeltisinden, ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için azot gazı geçirildi. Bu çözeltiden 1mL alınıp 10mL'ye seyreltildi. 5 saat sonunda çözeltinin pH' sı tekrar 3'e düşürüldüğünde renk pembeye döndü yani azot gazı varlığında, bazik ortamda boyarmadde kararlıdır.
- pH=10'daki boyarmadde çözeltisi 5 saat havayla temas halinde bırakıldı. Bu süre sonunda pH tekrar 3'e düşürüldüğünde renk kahverengi oldu yani bazik ortamda, oksijen varlığında boyarmadde kararlı değildir.

Bazik ve O<sub>2</sub>'li ortamda boyarmadde kararlı olmadığından azot ortamında çalışması gerekmektedir. Aşağıdaki düzenek bu amaçla kurulmuştur.



Şekil 3.1 Zayıf bazik anyon değiştirici reçine ile çalışma düzenegi

Yukarıdaki düzenekte, eluasyon işlemine başlamadan önce sistemden azot gazı geçirildi. Ayrıca eluatlar, içerisinde önceden %1'lik HCl zeltisi bulunan erlende toplandı. Sistem, %5'lik NaOH ile rejenere edildi. Sistemde olabilecek tüm hataların ortadan kaldırılmaya çalışılmasına rağmen, erlende asitlendirilen eluatlar kahverengimsi bir görünüm aldı. Bu, boyarmaddenin sistemin herhangi bir noktasında bozunmaya uğradığının bir göstergesidir. Bu nedenle zayıf bazik anyon değiştirici reçine kullanımından vazgeçilmiştir.

Zayıf asidik kation değiştirici reçine denemesi ise şu şekilde yapıldı;

İki behere eşit miktarda zayıf asidik kation değiştirici reçine konu. Birinci behere, karaduttan destile suyla ekstrakte edilen boyarmadde zeltisi doğrudan eklendi. İkinci behere, önce %10'luk KCl eklendikten sonra, 15 dakika beklendi. Böylelikle reçine  $H^+$  formundan  $K^+$  formuna dönüşmüş oldu. Daha sonra reçine üzerine karaduttan suyla ekstrakte edilen boyarmadde zeltisi eklendi. Her iki beherde de 2 saatlik bekleme süresi sonunda herhangi bir renk tutulması gözlenmedi.

Sonuç olarak, boyarmaddeyi tutma kapasitesi en yüksek olan kuvvetli asidik katyon değiştirici reçineyle çalışmalara devam etme kararı alındı.

### 3.3.1.2 Uygun Eluasyon özeltisini Bulma alışmaları

- Karaduttan suyla ekstraksiyon sonucu elde edilen boyarmadde çözeltisinin pH'sı ölçüldü ve  $\text{pH} = 3,91$  bulundu. Bu özelti bir ayırma hunisinden içi kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine dolu kolona damla damla aktarılmaya başlandı. Kolondan toplama erlenine düşen ilk pembe damladan reçinenin doygunluğa ulaştığı anlaşıldı. Daha sonra kolondan yaklaşık %25'lik  $\text{H}_2\text{SO}_4$  geçirilmeye başlandı. Erlene dolan turuncu kahverengi eluattan, uygun eluasyon çözeltisinin sülfat asidi olmadığını sonucuna varıldı. Pembe-kırmızı olması beklenen eluatın kahverengimsi rengi boyarmaddenin bozunduğunun göstergesidir.

Aynı işlem, yaklaşık %25'lik  $\text{HNO}_3$  kullanılarak tekrarlandığında boyarmaddenin bozunduğu gözlemlendi.

- Boyarmadde tutturulmuş kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine, %5'lik  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisinde 1 gece bekletildi. Bu süre sonunda ele geçen çok açık pembe-turuncu renkli çözelti, eluasyonun çok az miktarda gerçekleştiğini ve uygun eluentin  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  özeltisi olmadığını gösterdi.

- Boyarmadde tutturulmuş kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine, %5'lik  $\text{NaCl}$  çözeltisinde 1 gece bekletildi. Bu süre sonunda ele geçen açık pembe-turuncu renkli çözelti, eluasyonun çok az miktarda gerçekleştiğini ve uygun eluentin  $\text{NaCl}$  özeltisi olmadığını gösterdi.

- Karaduttan suyla ekstrakte edilen boyarmadde çözeltisinin pH'sı sıfıra düşürüldü. Bu özeltiden belli bir miktar kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine ile işleme sokuldu. Reçine hemen kırmızı renge döndü ve ardından bol suyla yıkandı. Eluasyon amacıyla %1  $\text{NaOH}$ + %10  $\text{KCl}$  çözeltileri karışımı reçine üzerine eklendi. Çok seyreltik pembe-turuncu bir renk elde edildi. Performansı oldukça düşük olan bu çözelti karışımının uygun eluent olmadığına karar verildi.

- Karaduttan suyla ekstrakte edilen boyarmadde çözeltisinin pH'sı  $\text{HCl}$  ile sıfıra düşürüldü. Bu özeltiden belli bir miktar, kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine ile işleme sokuldu.

Reçine, hemen boyarmaddeyi tutarak kırmızı renge döndü ve ardından bol suyla yıkandı. Eluasyon amacıyla reçineye 30-40 mL etanollü HCl çözeltisi katıldı. Reçine tarafından tutulan boyarmadde hemen elue olarak pembe bir eluat oluşturdu. Böylelikle uygun elue edici çözeltiyi bulma yolunda ilk adım atılmış oldu. Bu durum, yalnızca HCl veya etanolle eluasyonun gerçekleşip gerçekleşmeyeceği sorusunu akla getirdi ve aşağıdaki denemeler yapıldı;

Boyarmadde çözeltisiyle doyurulmuş kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine üzerine eluasyon amacıyla önce %1'lik sonra %3'lük sulu HCl çözeltisi eklendi. Ancak herhangi bir renk geçişi gözlenmedi.

Boyarmadde çözeltisiyle doyurulmuş kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine üzerine eluasyon amacıyla susuz etanol eklendi. Hafif turuncu bir renk geçişi olmasına karşın devamındaki porsiyonlarda herhangi bir renk geçişi gözlenmedi.

- Boyarmadde tutturulmuş kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine, eluasyon işlemi sırasında önce suyla ve hemen ardından metanolle yıkandı. Suyu reçineden herhangi bir renk geçişi olmazken, metanole uçuk pembe bir renk geçişi gözlemlendi. Bu durum, yalnızca metanolle eluasyon yapıp yapılamayacağı sorusunu akla getirdi. Reçine bol suyla yıkandıktan sonra, metanolle yıkama işlemi küçük porsiyonlar halinde sürdürüldü ve birkaç porsiyondan sonra renk geçişinin tamamen kesildiği görüldü. Kesin yargı için son yıkama suyunun pH'sına ve yıkama suyunun dekante edilmesinin hemen ardından reçineler arası pH'ya bakıldı.

Son yıkama suyu; pH=3,98

Reçineler arası; pH=4,00

Buradan çıkarılan sonuç, reçinenin asitliğinin ilk porsiyonlarda saf metanolle eluasyon için azda olsa uygun ortam yarattığıdır.

Bu durum, yalnızca asit kullanılarak eluasyon yapıp yapılamayacağı sorusunu beraberinde getirdi. %10'luk sülfat asidi çözeltisini reçine üzerine eklendi, herhangi bir renk geçişi

görülmedi. Sonuç olarak, asitlendirilmiş metanol çözeltisinin en uygun eluasyon çözeltisi olduğuna karar verildi.

- Karaduttan suyla ekstrakte etmek suretiyle bir miktar boyarmadde çözeltisi elde edildi ve pH'sı 3,86 olarak ölçüldü. pH, sülfat asidi ile asitlendirilerek 1'e indirildi. Bir kolona kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine dolduruldu. Ayırma hunisine aktarılan boya çözeltisi damla damla reçineyle temas ettirildi. Boya çözeltisinin bitimiyle ayırma hunisi önce destile suyla ardından metanolle dolduruldu ve reçine sırasıyla bol su ve metanolle yıkandı. Böylelikle meyveden boya çözeltisine geçmiş şeker ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Ortamda Cl<sup>-</sup> iyonun bulunması istenmediği için eluasyon H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün metanoldeki %1'lik çözeltisi ile yapıldı. Bu çözelti de ayırma hunisi yardımıyla damla damla reçineye verildi ve erlende koyu ve parlak pembe renkli eluat toplandı. Çeşitli porsiyonlar halinde toplanan bu eluatlar birleştirildi ve bir vakum evaporatöründe evapore edildi. Ancak boyarmadde kuru elde edilemedi. Önce yalnızca suyun kaldığını düşünülen bu çok derişik boya çözeltisine azeotropik karışım oluşturmak üzere 2,5 mL ksilen eklendi. Vakum altında evaporasyon işleminin devamında pekmezimsi bir kısım elde edildi. Evaporasyon işlemine uzun süre devam edidiğinde ise boyarmadde bozundu. Boyarmaddenin kuru elde edilememe nedeni, kullanılan asidin "H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>" kaynama noktasının 370<sup>0</sup>C civarında olmasıdır. Evaporasyon sırasında ne kadar vakum uygulanırsa uygulansın bu sıcaklık aşağıya çekilemez. Bu sebeple çalışmalar, kaynama sıcaklığı daha düşük olan HCl ile sürdürüldü.

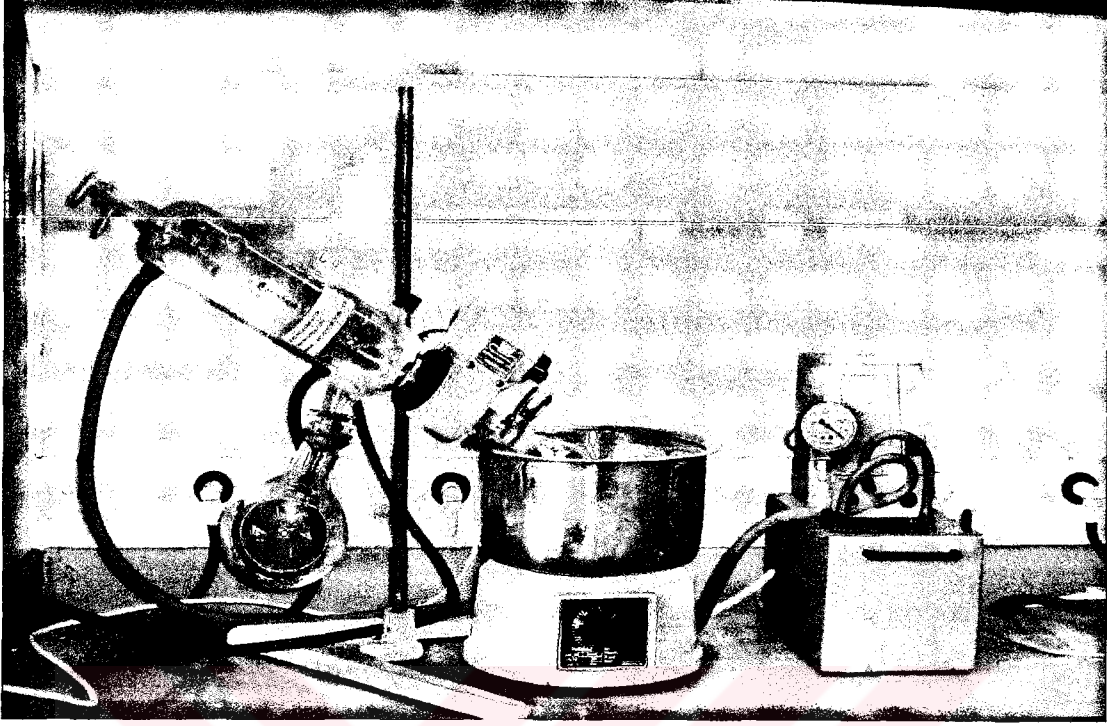
- Karaduttan suyla ekstrakte edilen boyarmadde çözeltisinin pH'sı sıfıra düşürüldü. Bu çözeltiden belli bir miktar kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine ile işleme sokuldu. Reçine, boyarmaddeyi tutarak kırmızı renge döndü. Ardından reçine bol suyla yıkandı. Eluasyon amacıyla reçineye 30-40 mL metanollü HCl çözeltisi katıldı. Reçine tarafından tutulan boyarmaddede kuvvetli bir renk geçişi gözlemlendi. Böylelikle uygun eluasyon çözeltisi bulunmuş oldu.

### 3.4 Karaduttan Doğal Gıda Boyası Elde Etme Çalışmaları



400 mL'lik 4 behere 100'er gram karadut kondu. Birinci behere 100mL destile su eklenip, zaman zaman çalkalanarak 10 dakika beklendi. Sonra, beherdeki çözelti 2 numaralı behere dekante edildi. Birinci behere yeniden 100mL destile su eklendi. 10 dakika sonunda ikinci beherdeki çözelti üçüncü behere, birinci beherdeki çözelti ikinci behere dekante edildi. Birinci behere yeniden 100mL destile su eklendi. Bu işlemler 4 ayrı porsiyon ekstrakt elde edilinceye kadar sürdürüldü. Ekstraktlar, kapaklı erlenlerde korundu. Bu çözeltilere iletkenlik ölçümü, pH tayini, titrasyon gibi başlangıç denemeleri yapıldı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1'de verilmiştir.

Daha sonra çözeltinin pH'sı, HCl ile 1'e düşürüldü. Bu çözelti, belli bir miktar kuvvetli asidik kation değiştirici reçine ile işleme sokuldu. Reçine, boyarmaddeyi tutarak kırmızı renge döndü. Boyarmadde çözeltisi ve reçine bir manyetik karıştırıcıda en düşük devirde, 1 saat süreyle karıştırılarak reçinenin doyması sağlandı. En düşük devir, reçinelerin zarar görmesini engellemek amacıyla seçildi. Sonra, boyarmadde çözeltisinin fazlası dekante edildi. Reçine, her 100mL'lik porsiyon en düşük devirde ve 15 dakika karışmak kaydıyla 600mL destile suyla yıkandı. Son yıkama suyunun tadına bakılarak şekerin ortamdaki uzaklaştığından emin olundu. Ardından reçine, 200mL metanolle 50'şer mL'lik porsiyonlar halinde bir manyetik karıştırıcıda yine en düşük devirde 15 dakikalık sürelerde karıştırılarak yıkandı. Metanolle yıkamaktaki amaç, ortamdaki suyun olabildiğince uzaklaştırılmasıdır. Metanolle yıkama sırasında ilk porsiyonlarda hafif bir renk geçişi gözlemlendi. Ancak bu geçişin, gerçek bir eluasyon olmayıp reçineler arası pH'nın düşük olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Devam eden porsiyonlarda asitliğin giderilmesiyle renk geçişinin durduğu gözlemlendi. Daha sonra HCl'in metanolde hazırlanan %10'luk çözeltisiyle eluasyona başlandı. Bu çözeltinin her 100mL'lik porsiyonu ve reçine bir manyetik karıştırıcıda en düşük devirde 1 saat süreyle karıştırıldı. Eluatlar evaporasyon işlemine tabi tutulmak üzere toplandı.



Şekil 3.2 Evaporasyon düzeneği

Toplanan eluatlar 1000mL'lik armudi balona aktarıldı ve bir vakum evaporatöründe evaporasyon işlemine başlandı (Şekil 3.3). İşlemin sonunda, boyarmadde armudi balonun çeperinde kuru olarak ele geçirildi. Çepere yapışmış boyarmadde, izopropil alkolle çözülerek 100mL'lik armudi balona alındı. Bu çözelti, tekrar evaporasyon işlemine tabi tutuldu. Kuruyan boyarmadde spatülle kazınarak 0,1051 gram tartıldı. Kalan boyarmadde kapalı bir kap içinde vakum desikatörüne kondu. Tartılan boyar madde 100mL %1'lik HCl'de çözüldü. Ancak çözeltide çözünmemiş partiküller olduğu görüldü. Doğru bir analiz için aşağıdaki yöntem izlendi;

Sinterleştirilmiş bir cam kroze  $110^{\circ}\text{C}$ 'deki etüvde 2 saat kurutuldu. Bu süre sonunda desikatöre alınarak sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesinin ardından cam krozenin darası alındı ( $T_1$ ).

$$T_1=24,1452\text{g}$$

%1'lik HCl ile hazırlanmış olan boya çözeltisi cam krozede süzülerek süzüntü diğer işlemler için ayrıldı. Cam kroze, birkaç porsiyon asetonla yıkandıktan sonra  $110^{\circ}\text{C}$ 'deki etüvde 2 saat

kurutuldu. Bu süre sonunda desikatöre alınarak sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesinin ardından cam kroze tartıldı ( $T_2$ ).

$$T_2=24,1474\text{g}$$

$$T_2-T_1= 24,1474-24,1452= 0,0022\text{g (çözünmeyen kısım)}$$

$$T-(T_2-T_1)= 0,1051-0,0022= 0,1029\text{g (çözünen kısım)}$$

$$C=0,1029 \text{ g/100mL} \quad (\text{Konsantrasyon= Çözünen Kısım/100mL})$$

0,1029 g/100mL derişimindeki boya çözeltilisinin spesifik absorpsiyon katsayısını tayin etmek için çeşitli denemeler yapıldı, sonuçlar Bölüm 4.2'de verilmiştir.

#### 3.4.1 Boyarmaddenin Isıya Karşı Direncinin İncelenmesi

Bir miktar kuru boyarmaddenin %1'lik HCl içindeki çözeltilisi, geniş ağızlı bir beherde ısıtıcıda ısıtmaya başlandı. Çözeltiliden, kendi sıcaklığından başlamak üzere her  $10^{\circ}\text{C}$ 'de bir 20'şer mL'lik örnekler alındı. Çözeltili  $98^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika kaynatıldı, bu çözeltiliden de 20mL'lik bir kısım alındı ve tüm örneklerin sıcaklıklarının oda sıcaklığına düşmesinin ardından UV spektrumları çekildi. Bulunan sonuçlar Bölüm 4.3'te verilmiştir.

#### 3.4.2 Boyarmaddenin UV ışığa Karşı Direncinin İncelenmesi

Bir miktar kuru boyarmaddenin %1'lik HCl içindeki çözeltilisi şilifli bir erlen içinde, 125 watt'lık UV ışık kaynağı ile arasında yaklaşık 25cm mesafe olacak şekilde bir kabin içine yerleştirildi. UV ışık kaynağı altında 24 saat boyunca bekletildi ve çeşitli zaman dilimlerinde UV spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.4'te verilmiştir.

#### 3.4.3 Boyarmaddenin pH'ya Karşı Direncinin İncelenmesi

Kuru boyarmaddeden, 0,1 M HCl ve 0,1M NaOH kullanılarak pH 3, 5, 7, 9, 11 çözeltileri hazırlandı. Her bir çözeltilinin UV spektrumu alındı. Asidik sahadaki boya çözeltilerinin rengi değişmezken, pH'sı 7, 9 ve 11 olan çözeltilerin renkleri değişti. Rengi değişen çözeltilerin, saat başı asitlendirilerek renklerinin geri dönüp dönmediği kontrol edildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.5'te verilmiştir.

#### 3.4.4 Boyarmadde Üzerine Hava Oksijeninin Etkisi

Evaporasyon işleminin ardından elde edilen kuru boyarmaddenin %1'lik HCl içinde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu alındı. Bu çözeltiden 40mL'lik bir kısım geniş ağızlı bir beherde hava ile temas halinde bırakıldı. Çeşitli zaman aralıklarında çözeltinin UV spektrumu alındı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.6'da verilmiştir.

Aynı çözeltinin bir diğer 40mL'lik porsiyonuna 5-6 damla  $H_2O_2$  çözeltisi ve yine bu çözeltinin 40mL'lik başka bir porsiyonuna 5-6 damla  $NaNO_2$  damlatıldığında elde edilen sonuçlar Bölüm 4.6'da verilmiştir.



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Başlangıç Denemeleri

Karaduttan doğrudan destile suyla ekstrakte edilen boya çözeltisine uygulanan ilk denemelerin sonuçları aşağıdaki gibidir;

İletkenlikler;

- Birinci ekstrakt: 54 mSiemens
- İkinci ekstrakt: 45 mSiemens
- Üçüncü ekstrakt: 36 mSiemens
- Dördüncü ekstrakt: 42 mSiemens
- Kullanılan su; 4,2  $\mu$ Siemens

Absorbanslar ( $\lambda=510\text{nm}$ );

- Birinci ekstrakt: 0,519
- İkinci ekstrakt: 0,498
- Üçüncü ekstrakt: 0,297
- Dördüncü ekstrakt: 0,295

pH;

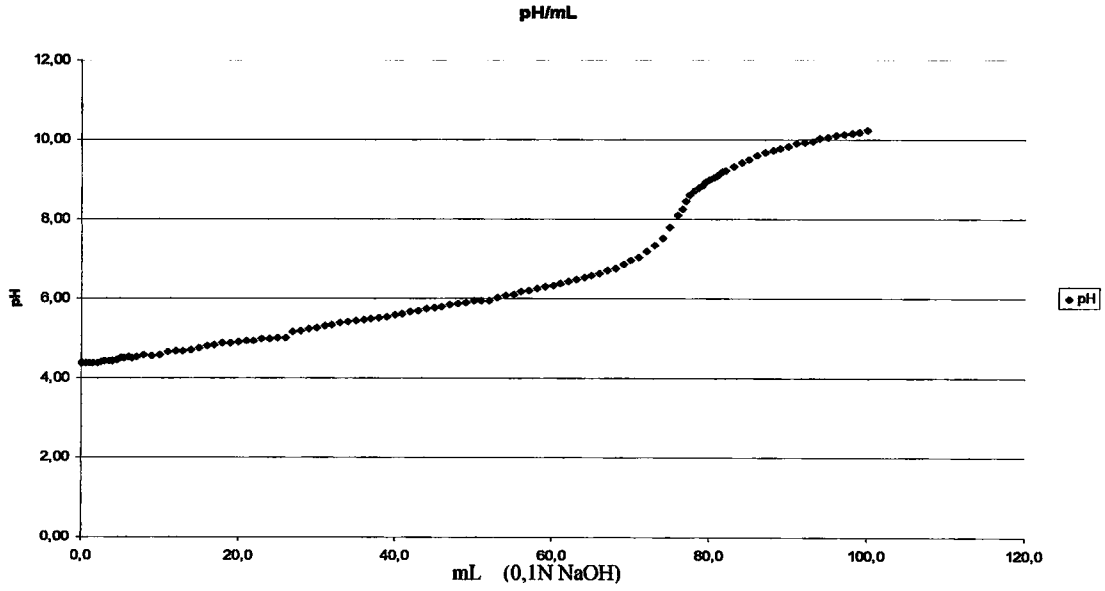
- Birinci ekstrakt: 3,61
- İkinci ekstrakt: 3,60
- Üçüncü ekstrakt: 3,61
- Dördüncü ekstrakt: 3,59

Titrasyon;

Titrimetrik olarak miktar tayin etme ve ayrıca asidin kuvvetini görebilme amacıyla 25mL boyarmadde çözeltisi 0,1N NaOH ile titre edildi. Titrasyonda, ilave edilen baz miktarı, elde edilen pH ve gözlenen renk Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 İlave edilen mL (0,1 N NaOH), pH, renk değişimi

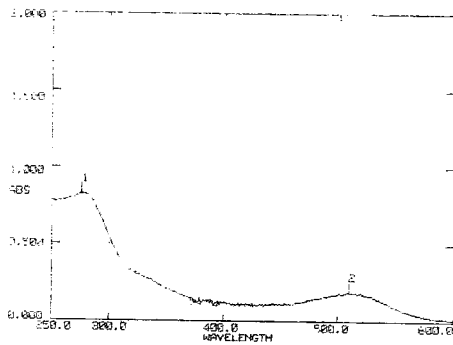
mL(0,1N NaOH)	pH	Renk
0,0	4,37	Pembe-kırmızı
1,0	4,37	Pembe-kırmızı
2,0	4,39	Pembe-kırmızı
3,0	4,42	Pembe-kırmızı
4,0	4,44	Pembe-kırmızı
5,0	4,50	Pembe-kırmızı
6,0	4,52	Pembe-kırmızı
7,0	4,52	Pembe-kırmızı
8,0	4,57	Pembe-kırmızı
9,0	4,55	Pembe-kırmızı
10,0	4,59	Pembe-kırmızı
20,0	4,91	Pembe-kırmızı
30,0	5,27	Pembe-kırmızı
40,0	5,60	Mor
50,0	5,95	Mor
60,0	6,33	Mor
70,0	6,95	Kahverengi
80,0	8,99	Kahverengi
90,0	9,83	Yeşil
100,0	10,22	Yeşil



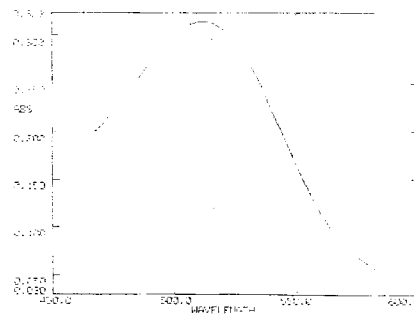
Şekil 4.1 Titrasyon eğrisi

Grafikte görüldüğü gibi eşdeğer nokta  $\text{pH}=7,8$ 'de ortaya çıkmaktadır. Bu nokta dışında başka bir dönüm noktası görülmediğinden boyarmaddenin monoproitik özellik taşıdığı tahmin edilmektedir. Eşdeğer noktadaki NaOH tüketimi 76,0 mL'dir. 38,0 mL NaOH tüketildiğinde yarı nötralizasyon noktasına erişilmiş olur. Grafikten anlaşılacağı gibi, yarı nötralizasyon noktasına karşılık gelen  $\text{pH}$  5,4'tür. Sonuç olarak bu asidin  $\text{pK}_a$  değeri 5,4 , disosiyasyon sabiti ise  $K_a=2,51 \times 10^{-5}$ ' dir.

Bu dört ayrı ekstraktın birleştirilmesiyle elde edilen boya çözeltisinin 250-600nm ve 450-600nm'de UV spektrumları alındı.



Şekil 4.2.a 250-600nm arası



Şekil 4.2.b 450-600nm arası

### Cl<sup>-</sup> Tayini;

Karaduttan suyla ekstrakte edilen boyarmadde çözeltisi üzerine bir miktar HNO<sub>3</sub> çözeltisi ekleyip hafifçe ısıtmak suretiyle boyarmaddenin yapısının tamamen bozunması sağlandı. Bozunan boyarmadde çözeltisinde sarımsak renkli çökelti oluştu. Adi süzgeç kağıdı yardımıyla çökelti süzüldü. Süzüntüye birkaç damla AgNO<sub>3</sub> damlatıldı. Süzüntünün bulanıklaşması boyarmaddenin anyonunun Cl<sup>-</sup> olduğunu gösterdi.

Boyarmadde çözeltisi üzerine bu kez H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve katı KMnO<sub>4</sub> eklendi. Şerit halinde kesilmiş adi süzgeç kağıdına KI ve nişasta çözeltisi emdirildi. Bir ısıtıcıda behere konan boyarmadde, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KMnO<sub>4</sub> çözeltisi ısıtıldı. Çıkan buharların süzgeç kağıdının rengini maviye dönüştürmesi boyarmaddenin yapısında Cl<sup>-</sup> olduğunu bir kez daha gösterdi.

### Yukarıdaki ilk sonuçların ışığında;

- Boyarmadde iyonik karakterlidir,
- Boyarmadde asidik özellik gösterir,
- Boyarmadde monoprofik bir asittir,
- Boyarmaddenin anyonu Cl<sup>-</sup> iyonudur denilebilir.

### 4.2 Spesifik Absorbivite Katsayısının Hesaplanması

0,1029 g/100mL derişimindeki boya çözeltisinden çeşitli hacimler alınarak, %1'lik HCl çözeltisi ile 10'ar mL'ye tamamlandı ve bu çözeltilerin 510nm'de UV spektrumları alındı.

Çizelge 4.2 Asitlendirilen boya çözeltisi, dalga boyu, absorbans, konsantrasyon değişimi

	$\lambda$ (nm)	A	C (g/100mL)
1mL Boya Çöz.+9mL HCl	510	0,104	0,0103
2mL Boya Çöz.+8mL HCl	510	0,206	0,0206
3mL Boya Çöz.+7mL HCl	510	0,299	0,0309
4mL Boya Çöz.+6mL HCl	510	0,402	0,0412
5mL Boya Çöz.+5mL HCl	510	0,512	0,0514
6mL Boya Çöz.+4mL HCl	510	0,609	0,0617
7mL Boya Çöz.+3mL HCl	510	0,720	0,0720
8mL Boya Çöz.+2mL HCl	510	0,816	0,0823
9mL Boya Çöz.+1mL HCl	510	0,917	0,0926

$A = C \times l \times a$     A: Absorbans  
 C: Konsantrasyon (g/100mL)  
 l: Işın yolu (cm)  
 a: Spesifik absorbtivite katsayısı (100mL/gxcm)

$$\bar{a} = 89,1801/9 = 9,9089 \text{ 100mL/gxcm}$$

$\bar{a}$ : aritmetik ortalama

Çizelge 4.3 Standart sapma hesaplamaları

a(100mL/gxcm)	$a_i - \bar{a}$	$(a_i - \bar{a})^2$	$(a_i)^2$
10,0971	0,1882	0,0354	101,9514
10,0000	0,0911	0,0083	100,0000
9,6764	-0,2325	0,0541	93,6327
9,7573	-0,1516	0,0230	95,2049
9,9611	0,0522	0,0027	99,2235
9,8703	-0,0386	0,0015	97,4228
10,0000	0,0911	0,0083	100,0000
9,9149	0,0060	0,0000	98,3052
9,9028	-0,0061	0,0000	98,0654

$$\delta_b = (\sum(a_i - \bar{a})^2/n)^{1/2}$$

$\delta_b$ : Standart sapma

n: Terim sayısı

$$\delta_b = (0,1333/9)^{1/2} = 0,1216$$

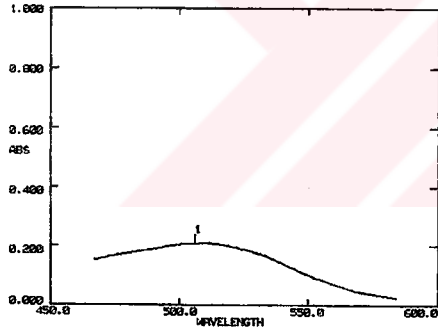
Sonuç olarak spesifik absorbtivite katsayısı  $a = 9,9089 \text{ 100mL/gxcm}$ ,  $\delta_b = 0,1216$  olarak bulundu.

#### 4.3 Isı Denemesi Sonuçları

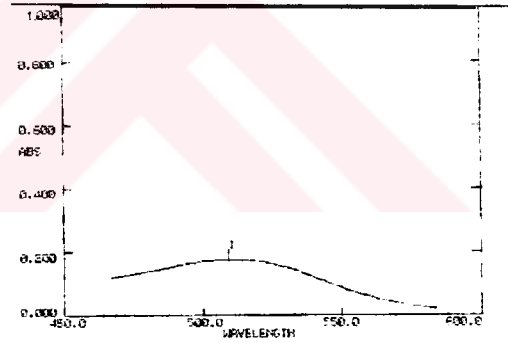
Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan örneklerin UV spektrumları alınarak Çizelge 4.4 oluşturuldu. Bu sonuçların ışığında, boyarmaddenin asitli ortamda kararlılığını kaynama sıcaklığında bile koruduğu söylenebilir. Absorbanslarda gözlenen küçük artışın çözeltideki çözücünün buharlaşması sonucu ortaya çıkan konsantrasyon yükselmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.4 Sıcaklık,  $\lambda_{max}$ , absorbans değişimi

Sıcaklık ( $^{\circ}$ C)	$\lambda_{max}$ (nm)	A
17,5	509	0,177
30	510	0,184
40	509	0,180
50	508	0,181
60	509	0,185
70	508	0,186
80	510	0,192
90	510	0,194
98	506	0,207



Şekil 4.3.a Başlangıç sıcaklığı



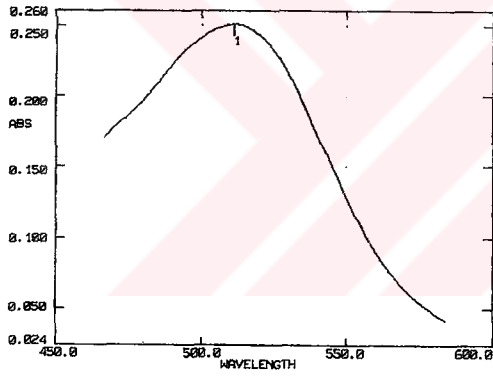
Şekil 4.3.b Kaynama sıcaklığı

#### 4.4 UV Işığa Karşı Direnç

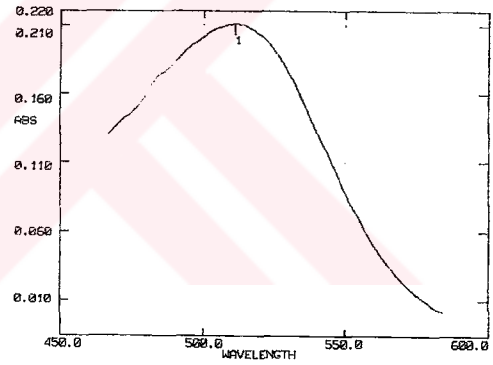
Bölüm 3.4.2'de anlatıldığı gibi UV ışık altında bekletilen çözeltinin aşağıdaki zaman dilimlerinde UV spektrumları alınarak Çizelge 4.5 oluşturuldu. Absorbanslardaki düşüş nedeniyle boyarmaddenin, asitli ortamda UV ışık kaynağı altında, ilk saat itibarıyla bozunmaya başladığı söylenebilir. Yine absorbanslara bakılarak, 12inci saatte maddenin yaklaşık olarak yarısının, 24üncü saatte ise tamamının bozunduğu sonucuna varılır.

Çizelge 4.5 Süre, dalga boyu, absorbans değışimi

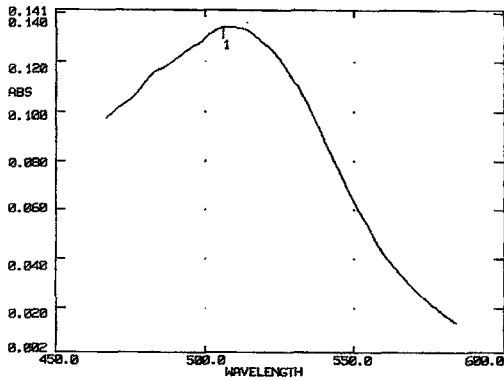
Süre (Saat)	$\lambda$ (nm)	A
0	510	0,261
1	510	0,255
2	510	0,251
3	510	0,249
4	510	0,239
5	510	0,224
6	510	0,210
12	510	0,134
24	510	0,077



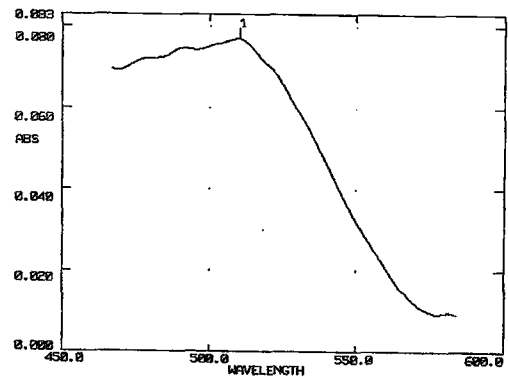
Şekil 4.4.a Başlangıç çözeltisi



Şekil 4.4.b 6. saat sonunda



Şekil 4.4.c 12. saat sonunda



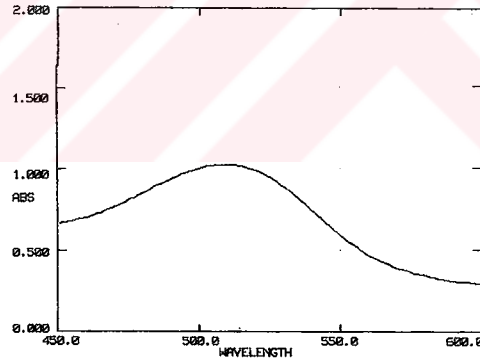
Şekil 4.4.d 24. saat sonunda

#### 4.5 pH'ya Karşı Direnç

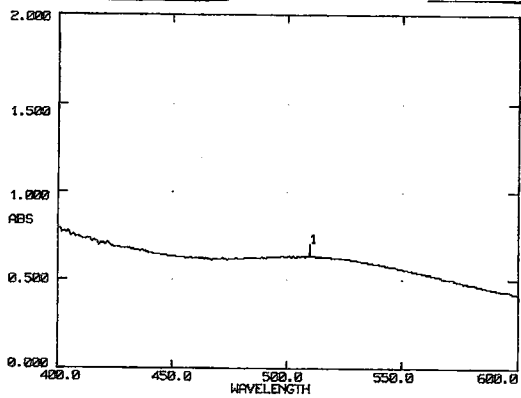
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı gibi hazırlanan çözeltilerin UV spektrumları alındı. Ağzı açık erlenlerde bekletilen çözeltilerin, her saat başı asitlendirmek suretiyle bozulup bozunmadıkları bakıldı. Birinci saatin sonunda pH 9 ve 11 çözeltileri, üçüncü saatin sonundaysa pH 7 çözeltisinin bozunduğu gözlemlendi. pH 3 ve pH 5 çözeltileri ise kararlılıklarını 2 haftaya kadar korudular. Buradan çıkan sonuç, boyarmaddenin asidik ortamda kararlılığını uzun süre korurken bazik ortamda kolaylıkla bozunduğudur.

Çizelge 4.6 pH, çözelti rengi değişimi

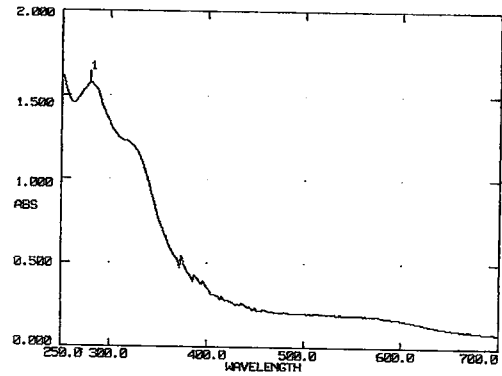
pH	Çözelti Rengi
3	Kırmızı
5	Pembe
7	Mor
9	Kahverengi
11	Yeşil-kahverengi



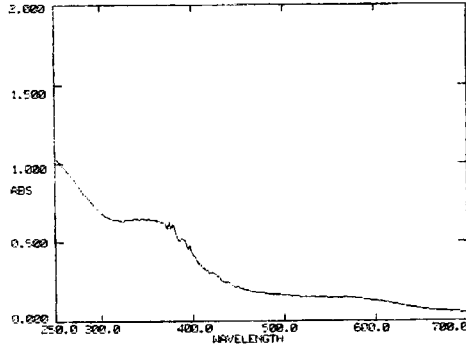
Şekil 4.5.a pH 3 çözeltisi



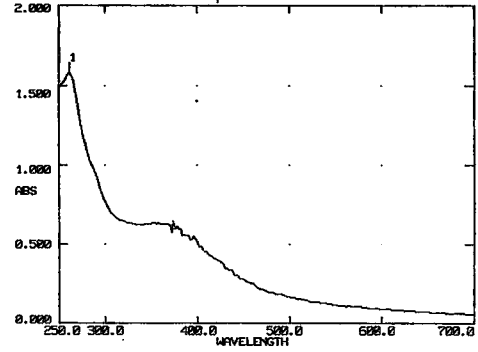
Şekil 4.5.b pH 5 çözeltisi



Şekil 4.5.c pH 7 çözeltisi



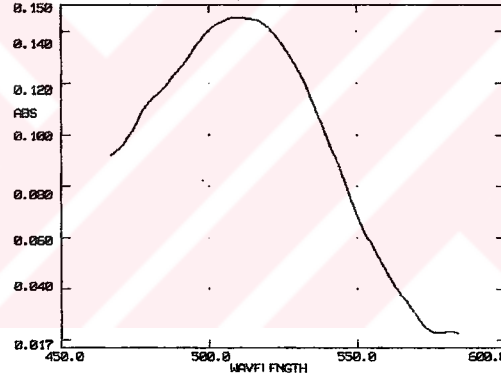
Şekil 4.5.d pH 9 çözeltisi



Şekil 4.5.e pH 11 çözeltisi

#### 4.6 Hava Oksijenine Karşı Direnç

Evaporasyon işleminin ardında elde edilen kuru boyarmaddenin %1'lik HCl içinde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu alındı.



Şekil 4.6 Boyarmadde çözeltisinin UV spektrumu

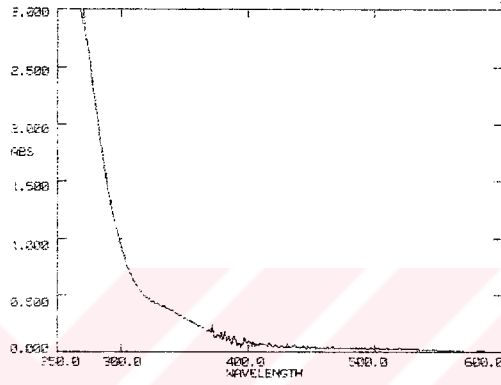
Yukarıda UV spektrumu görülen boyarmadde çözeltisinden 40mL'lik bir kısım geniş ağızlı bir beherde hava ile temas halinde bırakıldı. Çeşitli zaman aralıklarında çözeltinin UV spektrumu alınarak aşağıdaki çizelge oluşturuldu.

Çizelge 4.7 Süre, dalga boyu ve absorbans değişimi

Süre(Saat)	$\lambda_{max}(nm)$	A
0	510	0,191
12	511	0,222
24	511	0,221
48	510	0,227

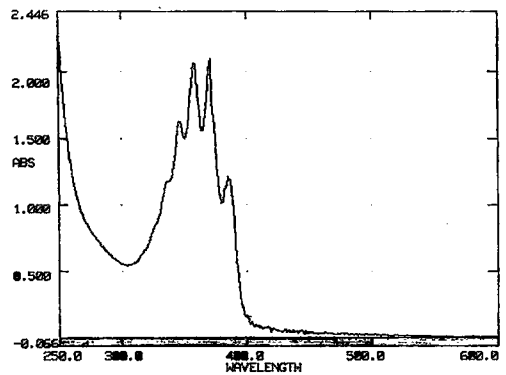
Çizelgede,  $\lambda_{\max}$ 'larda önemli bir değişiklik olmazken, absorbanslarda küçük bir artış görülmektedir. Absorbansdaki bu artışın, ağzı açık olarak bekletilen çözeltinin çözücüsünün uçması sonucu meydana gelen konsantrasyon yükselmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çözeltinin 40mL'lik porsiyonuna 5-6 damla  $H_2O_2$  çözeltisi damlatıldı. Boyarmaddenin 10. dakika sonunda bozunduğu gözlemlendi. Aşağıda 10. dakikadaki UV spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.7  $H_2O_2$  eklenmiş boyarmadde çözeltisinin 10. dakika sonundaki UV spektrumu

Yine bu çözeltinin 40mL'lik başka bir porsiyonuna 5-6 damla  $NaNO_2$  damlatıldığında boyarmaddenin 5. dakika sonunda bozunduğu gözlemlendi. Aşağıda 5. dakikadaki UV spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.8  $NaNO_2$  eklenmiş boyarmadde çözeltisinin 5. dakika sonundaki UV spektrumu

Yukarıdaki denemelerin ışığında boyarmaddenin, hava oksijenine karşı uzun süre kararlılığını koruduğu ancak yükseltgen ve indirgenler karşısında bozunduğu sonucuna varılır.

#### 4.7 Tartışma

Toroslar ve özellikle Akdeniz iklimi bitki örtüsüne has olan ve halk arasında “ekşi kara” yada “rum dutu” olarak bilinen karaduttan kuru boyarmadde elde edilen çalışmada aşağıdaki genel bilgilere ulaşılmıştır;

- Boyarmaddenin yapısı tam olarak bilinmemektedir ancak yüksek ihtimalle bir veya birkaç çeşit antosiyanin molekülünden oluştuğu düşünülmektedir. Bu nedenle, yapılan çalışmada molar absorbtivite katsayısı yerine kıyaslama olanağı sağlayabilmesi amacıyla spesifik absorbtivite katsayısı kullanılmıştır.
- Kuru boyarmaddenin asit içerisindeki çözeltisi, ısı ve hava oksijeni karşısında kararlılığını uzun süre koruyabilmektedir. Ancak boyarmadde, UV ışık altında, yükseltgen ve indirgenler karşısında ve yüksek pH değerlerinde kararlılığını koruyamamaktadır. pH 1’den 14’e doğru değişirken boyarmaddenin rengi de kırmızıdan mora, mordan yeşil, sarı ve kahverengiye doğru değişir. Bu nedenle, boyarmaddenin hem kararlı hem de renginin kırmızı olduğu asidik alanda kullanımı önerilmektedir. Özellikle şekerlemeler, gazlı içecekler ve meyve sularına eklenmesi gibi. Ayrıca çalışmada spesifik absorbtivite katsayısının hesaplanması amacıyla boyarmadde kuru olarak elde edilmiştir. Pratikte, doğrudan meyveden ekstraksiyonla elde edilen boyarmadde çözeltilerinin gıda maddelerine eklenmesi önerilmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki bu yolla üretilen gıda maddesi, eklenen boyarmaddenin tüm renk ve tat özelliklerini taşır. Bu durum, doğal kaynaklı gıda boyalarının tümü için geçerlidir.

**KAYNAKLAR**

- Adams, J.B. Changes in The Polyphenols of Red Fruits During Processing- The Kinetics and Mechanism of Anthocyanin Degradation. Campden Food Pres. Res. Assoc., Chipping Campden, Glos. Tech. Bull. P. 2. (1972).
- Bakker, J. ve Tiberlake, C.F. J. Sci. Food Agric. 37 (1986) 288-292.
- Baublis, A.J. ve Berber-Jimenez, M.D. J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 640-646.
- Bronnum- Hansen, K. And Flink, J. M. J. Food Technol. 20 (1985) 725-733.
- Calvi, J.P. ve Francis, F.J. J. Food Sci. 43 (1978) 1448-1456.
- Davies, A.J. ve Mazza, G. J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 1341-1345.
- Du Bose, C.N., Cardello, A.V. and Maller, O.J. Food Science 45 (1980) 1393-1399.
- Food Advisory Committee, FdAC/RE/4, HMSO, London (1987).
- Francis, F.J. in Anthocyanins as Food Colors (P. Markakis, ed.), Academic Press, New York (1982) Chapter 7.
- Furtado, P., Figueiredo, P., Chaves Des Neves, C. and Pina , F. J. Photochem. Photobiol. A. Chem. 75 (1993) 113-118.
- Grisebach, H. in Anthocyanins as Food Colors (P. Markakis, ed.), Academic Pres, New York (1982) Chapter 3.
- Gueffroy, D. E., Kepner, R.E. ve Webb, A.D. Phytochem. 10 (1971) 813-819.
- Harborne, J.B. in Chemical Plant Taxonomy (T. Swain, ed.), Academic Pres, New York (1963) Chapter 13.
- Harborne, J.B. in The Comparative Biochemistry Of The Flavanoids, Academic Pres, New York (1967) Chapter 1.
- Harborne, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 2<sup>nd</sup> edn. Chapman & Hall, London (1984).
- Havlikova, L. ve Mikova, K.Z. Lebensin. u. Forsch. 181 (1985) 427-432.
- Hendry, G.A.F. ve Houghton, J.D. Natural Food Colorants, 2<sup>nd</sup> edn. Chapman & Hall, London (1996).
- Hong, V. ve Worlstad, R.E. J. Agric. Food Chem. 38 (1990) 698-708.
- Hoshino, T. Phytochem. 23 (1986) 829-832.
- Hrazdina, G. ve Franzese, A.J. Phytochem. 13 (1974) 225-229.

- Keith, E.S. ve Powers, J.J. *J. Agric. Food Chem.* 13 (1965) 577-5479.
- Kim, J.H., Nonaka, G.L., Fujieda, K. ve Uemoto, S. *Phytochem.* 28 (1989) 1503.
- La Bell, F. *Food Processing (USA)*, April (1990) 69-72.
- Lasagabaster, A., Martin, C. ve Goni, M.M. *J. Chem. Tech. Biotech.* 60 (1994) 397-403.
- Lin, M., Shi, Z. ve Francis, F.J. *J. Food Sci.* 57 (1992) 766-767.
- Lowry, J.B. ve Chew, L. *Econ. Bot.* 28 (1974) 61-62.
- Macorone, E., Ferrigno, V., Longo, L.L. ve Rapisarda, P. *Chim.* 77 (1987) 499-508.
- Martinelli, E.M., Scilingo, A. ve Pifferi, G. *Anal. Chim. Acta* 259 (1992) 109-113.
- Moore, A.B., Francis, F.J. ve Jason, M.E. *J. Food Protect.* 45 (1982) 590-593.
- Oszmianski, J. ve Sapis, J.C. *J. Food Sci.* 53 (1988) 1241-1242.
- Pellegrino, F., Sekular, P. ve Alfano, R.R. *Photobiochem. Photobiophys.* 2 (1981) 15-20.
- Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M. ve Metehe, M. *Food Chem.* 50 (1994) 115-120.
- Ribereau-Gayon, P.R. ve Josien, M.L. *Bull. Soc. Chim. Fr.* (1960) 934-937.
- Rommel, A., Worlstad, R.E. ve Heatherbell, D.A. *J. Food Sci.* 57 (1992) 385-391.
- Shewfelt, R.L. ve Ahmed, E.M. *J. Food Sci.* 43 (1978) 435-438.
- Siddiq, M., Arnold, J.F., Sinha, N.K. ve Cash, J.N. *J. Food Process. Pres.* 18 (1994) 75-84.
- Somers, T.C. *Phytochem.* 10 (1971) 2175-2186.
- Strack, D. ve Wray, V. in *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 1 (J.B. Harborne, ed.), Academic Press, London (1989).
- Starr, M.S. ve Francis, F.J. *Food Technol.* 22 (1968) 1293-1295.
- Takura, H., Kumaoka, Y. ve Sugisawa, H. *Agric. Biol. Chem.* 53 (1989) 1969-1970.
- Timberlake, C.F. ve Bridle, P. 'Anthocyanins' in *Developments in Food Colours*, Vol. 1 (J. Walford ed.), Applied Science Publishers, London (1980) pp. 115-149.
- Timberlake, C.F. *Food Chem.* 5 (1980) 69-80.
- Van Buren, J.P., Bertino, J.J. ve Robinson, W.B. *Am. J. Enol. Vitic.* 19 (1968) 147-154.

Wrolstad, R.E. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Bull. 624. Oregon Agric. Exp. St., Corvallis (1976).

Wrolstad, R.E., Skrede, G., Lea, P. ve Enersen, G. J. Food Sci. 55 (1990) 1064-1065, 1072.

Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K. ve Gioto, T. Agric. Biol. Chem. 54 (1990) 1745-1751.



**ÖZGEÇMİŞ**

Doğum tarihi	11.02.1978	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1993-1996	Çemberlitaş Kız Lisesi
Lisans	1997-2001	İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2002-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı
Çalıştığı Kurum	2003	Halimoğlu Fasarit Boya Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Halen devam etmekteyim.)

