

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAZE VE TİCARİ VIŞNE SULARININ ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ VE
KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ORGANİK ASİT
İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ebru ÇEVİK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

MAYIS 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAZE VE TİCARİ VIŞNE SULARININ ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ VE
KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ORGANİK ASİT
İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ebru ÇEVİK
(509111008)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER

MAYIS 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **509111008** numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Ebru ÇEVİK**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **“TAZE VE TİCARİ VIŞNE SULARININ ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ”** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Ayşen YARAT**
Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Nevin ÖZTEKİN
İstanbul Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **3 Mayıs 2013**
Savunma Tarihi : **31 Mayıs 2013**

Aileme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda en büyük paya sahip olan, çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. F.Bedia Erim Berker'e,
Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgilerini paylaşan Sasil Uzaşçı'ya ve Filiz Tezcan Tekeli'ye,
Yakın arkadaşlık ve moral destekleriyle beni hiçbir konuda yalnız bırakmayan hep yanımda olan Ayça Çobanoğlu, Esin Gözde Erkul ve Esin Kaftanoğlu'na,
Ve en büyük destekçilerim, bugünlerimin mimarları, hiçbir zaman sevgilerini esirgemeyen sevgili Annem, Babam ve kardeşlerime hoşgörü ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Mayıs 2013

Ebru ÇEVİK
(Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....	3
2.1 Elektroforetik Mobilite.....	3
2.2 Elektroosmatik Akış.....	4
2.3 Elektroosmatik Akış Hızına Etki Eden Faktörler.....	6
2.3.1 Elektrik alan	6
2.3.2 pH.....	6
2.3.3 Tamponun iyonik şiddeti	6
2.3.4 Sıcaklık.....	6
2.3.5 Organik modifiye edici madde ilavesi	6
2.3.6 Yüzey aktif madde ilavesi.....	7
2.3.7 Kapiler kolonun polimer madde ile kaplanması	7
2.4 Ayırma Parametreleri	7
2.4.1 Geliş süresi	7
2.4.2 Pik genişlemesi	8
2.4.3 Rezolüsyon (Ayrışma)	8
2.5 Kapiler Elektroforez Cihazının Temel Bölümleri	9
2.5.1 Kapiler.....	9
2.5.2 Voltaj kaynağı	9
2.5.3 Elektrotlar.....	10
2.5.4 Örnek injeksiyonu	10
2.5.4.1 Elektrokinetik injeksiyon	10
2.5.4.2 Hidrodinamik injeksiyon.....	10
2.5.5 Örnek dedeksiyonu	11
2.6 Kapiler Elektroforez Teknikleri	11
3. ANTİOKSİDANLAR.....	13
3.1 Antioksidanlar ve Etki Mekanizması	14
3.2 Antioksidan Türleri	16
3.3 Antioksidan Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri	16
3.3.1 ORAC: Oksijen radikali absorplama aktivitesi (Oxygen radical absorbance capacity).....	17
3.3.2 TRAP: Toplam radikal kapanı antioksidan parametresi (Total radical trapping antioxidant parameter).....	18
3.3.3 TOCS: Toplam oksidan yakalama aktivitesi (Total oxidant scavenging capacity).....	19
3.3.4 CL: Kemiluminesans (Chemiluminescence)	19

3.3.5 FRAP: Demir (III) indirgeyici antioksidan aktivite (Ferric reducing antioxidant power).....	19
3.3.6 CUPRAC: Bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivitesi.....	20
3.3.7 TEAC veya ABTS metodu	20
3.3.8 DPPH metodu	21
3.3.9 İndirgeme potansiyeli metodu.....	22
3.3.10 Folin ciocalteu (FC) metodu: toplam fenol metodu.....	22
4. ORGANİK ASİTLER	25
4.1 Vişnede Tayin Edilen Organik Asit ve Özellikleri	25
4.1.1 Malik asit	25
4.1.2 Sitrik asit	26
5. DENEYSEL KISIM.....	27
5.1 Kapiler Elektforez Yöntemi İle Organik Asit Tayini	27
5.1.1 Kullanılan kimyasallar ve çözeltilerin hazırlanması	27
5.1.2 Cihazlar ve enjeksiyon koşulları	27
5.2 Antioksidan Tayini.....	28
5.2.1 Kullanılan kimyasallar ve çözeltilerin hazırlanması	28
5.2.2 Cihaz	28
5.2.3 DPPH yöntemin ile antioksidan tayini.....	28
5.2.4 FRAP yöntemi ile antioksidan tayini.....	28
6. SONUÇLAR.....	31
6.1 Kapiler Elektforez Yöntemi ile Organik Asit Tayini.....	31
6.1.1 Hesaplamalar.....	32
6.2 Antioksidan Tayini.....	33
7. TARTIŞMA VE YORUM.....	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ.....	41

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-Azinobis-3-Etilbenzotiazolin-6sulfonik asit
AOK	: Antioksidan Kapasitesi
CE	: Kapiler Elektroforez
CGE	: Kapiler Jel Elektroforez
CTAB	: N-Cetyl-N,N,N-trimetil amonyum bromür
CUPRAC	: Bakır (II) İndirgeyici Antioksidan Aktivitesi
CZE	: Kapiler Zon Elektroforez
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EOF	: Elektroosmotik Akış
FC	: Folin Ciocelatu
FRAP	: Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Aktivite
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ITP	: İzoelektrik Fokus
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi
ORAC	: Oksijen Radikali Absorplama Aktivitesi
PDC	: 2,6-piridindikarboksilik asit
TOCS	: Toplam Oksidan Yakalama Aktivitesi
TRA	: Toplam Radikal Kapanı Antioksidan Parametresi
TROLOKS	: 6-Hidroksil-2,5,7,8-Tetrametil Kroman-2-Karboksilik asit
UV-GB	: Ultraviyole Görünür Bölge

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon yöntemleri	11
Çizelge 2.2 : Kapiler elektroforez teknikleri.	11
Çizelge 6.1 : Vişne sularının malik asit ve sitrik asit miktarları.....	33
Çizelge 6.2 : Malik asit ve sitrik asit geri kazanım miktarları.....	33
Çizelge 6.3 : DPPH yöntemiyle elde edilen deaktivite sonuçları.....	33
Çizelge 6.4 : FRAP yöntemiyle elde edilen antioksidan aktiviteleri.....	34

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Farklı partiküllerin CE’ de geliş sırası.	5
Şekil 2.2 : CE’ nin şematik gösterimi.	9
Şekil 3.1 : Troloks molekülünün kimyasal yapısı.	19
Şekil 3.2 : ABTS’ nin molekül yapısı.	21
Şekil 3.3 : DPPH reaktifinin kimyasal yapısı.	21
Şekil 4.1 : Malik asit izomerleri.	26
Şekil 5.1 : Sitrik asit.	26
Şekil 6.1 : Taze vişne suyuna ait elektroferogram.	31
Şekil 6.2 : Ticari vişne suyuna ait elektroferogram.	32
Şekil 6.3 : Malik asit kalibrasyon grafiği	32
Şekil 6.4 : FRAP-DPPH korelasyonu.	34

TAZE VE TİCARİ VIŞNE SULARININ ANTIOKSİDAN KAPASİTESİ VE KAPİLER ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE ORGANİK ASİT İÇERİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Son yıllarda, vücudumuza alınan doğal antioksidan maddelerin kalp hastalıkları ve kanser riskini azalttığı yönündeki bilimsel çalışmalar, meyve ve meyve suyu tüketimine verilen önemi arttırmıştır. Latince adı *Prunus cerasus* olan vişne, yapısında bulunan yüksek miktarda polifenolik bileşikler ve meyveye rengini veren antosiyaninler nedeniyle antioksidan aktivitesi en yüksek meyvelerden biridir. Türkiye vişne üretiminde dünyada birinci sıradadır. Vişne; meyve suyu, dondurulmuş ve kurutulmuş meyve olarak tüketilmekte ve ihraç edilmektedir.

Antioksidanlar vücudu, metabolizmada oluşan serbest radikallere karşı koruyan maddelerdir. Serbest radikaller; DNA, protein ve lipit gibi makromolekülleri etkileyerek yaşlanmaya, doku hasarına ve bazı hastalıklara neden olmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikallerle tepkimeye girerek bunların başlattığı zincir reaksiyonu durduran ve böylece vücudumuzdaki hayati bileşenlerin zarar görmesini engelleyen molekülüdür. Bu nedenle antioksidan kapasitesi yüksek gıda ürünleri tüketmek kanser gibi hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürecini geciktirmede önem kazanmaktadır. Meyveler bu bakımdan en önemli doğal antioksidan kaynaklarıdır.

Öte yandan, meyve sularının organik asit profilleri onların koku ve tazeliğinin karakteristikleridir. Organik asit profilleri her meyve türüne göre farklılık gösterdiği için, meyve sularının organik asit içerikleri aynı zamanda bir meyve suyunun daha ucuz bir meyve suyu ile hilelendirilmesinde önemli bir indikatördür. Ülkemizde çok sayıda meyve suyu üretilmekte ve ihraç edilmektedir. Meyve sularının içeriklerinin kabul edilen standartlara uymaması ihracatta önemli sorunlara neden olmaktadır.

Günümüzde meyve sularının antioksidan aktivitesi ve organik asit miktarları meyve suyunun kalitesinin önemli göstergesi olduğundan, bu yönde bir çok analitik yöntem geliştirilmiştir. Antioksidan aktivite tayinleri, daha çok spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirilirken, organik asit içerikleri kromatografik yöntemlerle yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı ülkemizde önemli miktarda üretilen, taze ve ticari vişne sularının antioksidan aktivitelerinin ve organik asit içeriklerinin tayinidir.

Vişne sularının antioksidan aktivite tayinleri için FRAP ve DPPH yöntemleri kullanılmıştır. Her iki yöntemle bulunan antioksidan aktiviteleri istatistik yöntemle karşılaştırılarak, sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Vişne sularının organik asit içerikleri kapiler elektroforez yöntemiyle incelenmiştir. Kapiler elektroforez iyonların yüksek elektrik alan altında yük/büyükölük oranlarına göre ayrılmasını sağlayan bir ayırma ve analiz yöntemidir. Yöntemin, çok hızlı

ayırımı, çok az madde tüketimi ve yüksek ayırma gücü en büyük avantajıdır. Kapiler elektroforezde itici güç, kapiler içinde oluşan elektroosmotik akıştır. Organik asitlerin elektroforetik mobiliteleri çok yüksek olduğundan, elektroosmotik akış ile sürüklenmeleri güçtür. Bu nedenle bu çalışmada kapiler kolon dinamik olarak pozitif yüklü bir yüzey aktif madde ile kaplanarak, kapiler iç duvarı pozitif olarak yüklenmiştir. Organik asit standartları, polarite tersine çevrilerek negatif kutuptan enjekte edilmiştir. Böylece elektroosmotik akışın ve iyonların elektroforetik mobilitelerinin aynı yönde olması sağlanarak 3 dakika gibi çok kısa sürede ayırım ve analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, organik asitler UV aktif olmadıkları için ayırma ortamına ilave edilen bir kromofor madde yardımıyla dolaylı dedeksiyonları gerçekleştirilmiştir. Denemeler sonucu, organik asitlerin ayrılmasında en uygun ayırma şartlarının, tampon ortamı olarak pH 6'da 0,1 mM CTAB ve 5 mM PDC çözeltisi, 50 mBar basınçla 6 saniye örnek enjeksiyonu ve -30 kV ayırma voltajı, olduğu tespit edilmiştir. Dedeksiyon 210 nm'de yapılmıştır. Taze vişne sularında organik asit olarak malik asit tespit edilmiş ve kantitatif miktarları tayin edilmiştir. Ticari meyve sularında malik asit yanında koruyucu olarak katılan, meyve sularının etiketinde de belirtilen sitrik asit bulunmuştur.

DETERMINATION AND COMPARISON OF THE AMOUNT OF ANTIOXIDANTS AND ORGANIC ACID CONTENT OF FRESH AND COMMERCIAL CHERRY (*PRUNUS Cerasus*) JUICES

SUMMARY

Recently, it is scientifically proved that natural antioxidants is associated with a lower risk of cardiovascular disease and cancer. Thus, the consumption of fruits and fruit juices, which are natural antioxidant sources, have gained increasing interest among consumers.

Sour cherry, is a species of *Prunus* in the subgenus *Cerasus*. It is closely related to the wild cherry. Sour cherries contain fewer calories than the sweet varieties, due to their lower sugar content. Sour cherry is considered to be one of the richest sources of antioxidants. Turkey is the first range in the production of sour cherry in the world. Sour cherry may be beneficial for the management and prevention of inflammatory diseases, including inflammatory pain. Beyond the anti-inflammatory benefits, many of the phenolic compounds in cherries may offer protection against heart disease and stroke. Anthocyanins in sour cherries also might lower blood lipids, thus reducing heart disease risk. Researchers believe sour cherries may have the potential to reduce the risk of colon cancer because of anthocyanins and cyanidin, another type of flavonoid found in cherries. Sour cherries and their compounds appear to aid in diabetes control and in reducing the complications associated with this disease.

Antioxidants are substances that may protect human cells against the effects of free radicals. Free radicals are atoms or groups of atoms with an odd (unpaired) number of electrons and can be formed when oxygen interacts with certain molecules. Free radicals, also known simply as radicals, are organic molecules responsible for aging, tissue damage, and possibly some diseases. Free radicals are highly unstable molecules that are naturally formed when you exercise and when your body converts food into energy. Human body can also be exposed to free radicals from a variety of environmental sources, such as cigarette smoke, air pollution, and sunlight. Free radicals can cause “oxidative stress,” a process that can trigger cell damage. Oxidative stress is thought to play a role in a variety of diseases including cancer, cardiovascular diseases, diabetes, Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, and eye diseases such as cataracts and age-related macular degeneration. Antioxidants react with free radicals and stop the chain reaction of them. Our body uses antioxidants to stabilize the free radicals. This keeps them from causing damage to other cells. Antioxidants can protect and reverse the damage caused by oxidation to some extent.

Human body produces some antioxidants to fight off the free radicals formed by normal body processes. We can also get antioxidants by eating a healthy diet. Examples of antioxidant-rich foods include fruits and vegetables that are high in

nutrients such as vitamins A, C and E, beta-carotene, lutein, lycopene and selenium. The best way to get antioxidants is by eating a diet with lots of vegetables, fruits, whole grains, seeds and nuts.

Several assays have been used to estimate antioxidant capacities in fresh fruits and fruit juices DPPH, FRAP, ORAC, TRAP, TOCS, CUPRAC and ABTS.

On the other hand, organic acid profiles in juices characterise flavours, freshness, or spoilage of juices. Because organic acid profiles are distinct to each type of fruit juice, their profiles also give important evidences about adulteration of a juice with cheaper juices.

The purpose of this study is to find antioxidant activities and organic acid profiles of Turkish fresh and commercial sour cherry juices.

The antioxidant capacities of juices were determined with DPPH and FRAP antioxidant assays. FRAP assay is based on the ability of phenolics to reduce yellow ferric tripyridyltriazine complex (Fe(III)-TPTZ) to blue ferrous complex (Fe(II)-TPTZ) by the action of electron-donating antioxidants. The resulting blue color measured spectrophotometrically at 593 nm is taken as linearly related to the total reducing capacity of electron-donating antioxidants. FRAP assay needs acidic (nonphysiologically low pH value=3.6) conditions to maintain the iron solubility. One FRAP unit is defined as the reduction of 1 mol of Fe (III) to Fe(II). The DPPH radical is a long-lived organic nitrogen radical and has a deep purple color. It is commercially available and does not have to be generated before assay. In this assay, the purple chromogen radical is reduced by antioxidant/reducing compounds to the corresponding pale yellow hydrazine. The reducing ability of antioxidants towards DPPH can be evaluated by electron spin resonance or by monitoring the absorbance decrease at 515–528 nm until the absorbance remains stable in organic media. The percentage of the DPPH (%DPPH_{rem}) remaining is calculated as:

$$\%DPPH_{rem} = 100 \times \%DPPH_{r=0}$$

%DPPH_{rem} is proportional to the antioxidant concentration, and the concentration that causes a decrease in the initial DPPH concentration by 50% is defined as EC₅₀. The time needed to reach the steady state with EC₅₀ is defined as T_{EC50}.

The results obtained both method well correlated.

ORAC, TRAP, TOCS, CUPRAC and ABTS can also be used determine antioxidant capacity of sour cherries but mostly used are DPPH and FRAP.

Organic acid contents of juices were determined by capillary zone electrophoresis method. Capillary electrophoresis (CE) is an analytical separation and analysis technique. The main advantage of the method is its high separation efficiency, its speed, and its very low sample consumption. In CE ions are separated based on their electrophoretic mobility in an electrical field with the use of an applied voltage. A typical capillary electrophoresis system consists of a high-voltage power supply which generates potential from -30 Kv to +30 kV, a sample introduction system which can be hydrodynamics (driven by a pressure difference over the capillary) or electrokinetic (by applying voltage), a capillary tube, a detector and an output device. Each side of the high voltage power supply is connected to an electrode. These electrodes help to induce an electric field to initiate the migration of the sample from the anode to the cathode through the capillary tube. The capillary is made of fused silica and is sometimes coated with polyimide. Each

side of the capillary tube is dipped in a vial containing the electrode and an electrolytic solution, or aqueous buffer. Before the sample is introduced to the column, the capillary must be flushed with the desired buffer solution. There is usually a small window near the cathodic end of the capillary which allows UV-VIS light to pass through the analyte and measure the absorbance. CE in free solution is called as capillary zone electrophoresis (CZE). CE has several modes like micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), capillary gel electrophoresis (CGE), capillary isotachopheresis (CITP), capillary isoelectric focusing (CIEF), capillar electrochromatography (CEC).

Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), which is based on solute partitioning between the micellar phase and the solution phase. This technique provides a way to resolve neutral molecules as well as charged molecules by CE. The samples are separated by differential partitioning between micelles (pseudo-stationary phase) and a surrounding aqueous buffer solution (mobile phase). The basic set-up and detection methods used for MEKC are the same as those used in CE. The difference is that the solution contains a surfactant at a concentration that is greater than the critical micelle concentration (CMC). Above this concentration, surfactant monomers are in equilibrium with micelles.

Macromolecules like DNA can be separated by capillary gel electrophoresis (CGE). CGE uses separation based on the difference in solute size as the particles migrate through the gel. Gels are useful because they minimize solute diffusion that causes zone broadening, prevent the capillary walls from absorbing the solute, and limit the heat transfer by slowing down the molecules.

Capillary isotachopheresis (CITP), is the only method to be used in a discontinuous system. The analyte migrates in consecutive zones and each zone length can be measured to find the quantity of sample present.

Capillary isoelectric focusing (CIEF) is a technique commonly used to separate peptides and proteins. These molecules are called zwitterionic compounds because they contain both positive and negative charges. The charge depends on the functional groups attached to the main chain and the surrounding pH of the environment. During a CIEF separation, the capillary is filled with the sample in solution and typically no EOF is used (EOF is removed by using a coated capillary). When the voltage is applied, the ions will migrate to a region where they become neutral ($\text{pH}=\text{pI}$). The anodic end of the capillary sits in acidic solution (low pH), while the cathodic end sits in basic solution (high pH). Compounds of equal isoelectric points are “focused” into sharp segments and remain in their specific zone, which allows for their distinct detection.

Capillar electrochromatography (CEC) have a packed column similar to chromatography. The mobile liquid passes over the silica wall and the particles. An electroosmosis flow occurs because of the charges on the stationary surface. CEC is similar to CZE in that they both have a plug-type flow compared to the pumped parabolic flow that increases band broadening.

The driving force of capillary electrophoresis is electroosmotic flow that formed in capillary. Because of the electrophoretic mobilities of organic acids is very high, it is difficult to drift with electroosmotic flow. That is why, in this study capillary column is coated with dynamically positive charged surfactant, and inner wall of capillary is charged positively. Organic acid standards injected at the negative pole

with reversed polarity. Thus, it is provided that electroosmotic flow and electrophoretic mobilities of ions are in the same direction, and separation and analysis carried out in a short time like 3 minutes. In addition, because of the organic acids are not UV active, they can be detected indirectly with the help of adding chromophore to the separation solution. Of trials, it is determined that appropriate separation conditions for the separation of organic acids are 0,1 mM CTAB and 5 mM PDC at pH 6 as buffer solution, 6 second for sample injection at pressure of 50 mbar and -30 kV separation voltage. Detection have been achieved at 210 nm. Malic acid is determined in fresh sour cherry juices as the organic acid and it is quantitatively determined. In commercial sour cherry juices, in addition to malic acid, citric acid is determined that adding as preservative for the juices. Citric acid is specified on the labels of commercial sour cherry juices.

1. GİRİŞ

Elektroforez, tampon çözelti içerisindeki yüklü parçacıkların elektriksel alan varlığında farklı hızlarda göçüne dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu ayırımı etkileyen en önemli faktörler analiz edilen örneğin elektroforetik hareketliliği (μ e) ve kapiler içindeki çözeltinin elektroosmatik akışıdır (EOF) [1].

Elektroforez, analitik olarak ayırımı zor olan birçok analite uygulanabilir. Bu yöntem; anorganik iyonlar, kiral moleküller, organik asitler, fenolik bileşikler, amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, peptitler, proteinler, DNA ve diğer birçok türün ayırımı için uygundur.

Kapiler elektroforez (CE) kılcal boru içinde gerçekleştirilen elektroforezdir. Bu yöntem, gelişmeye devam etmektedir. Araştırmacılar geniş kullanım alanı, hızlı ayırım sağlaması, hem analiz hem dedeksiyona uygunluğu, yüksek ayırma gücü ve az miktarda madde kullanımı sebebiyle bu yöntem üzerinde yoğunlaşmaktadırlar. Konvansiyonel elektroforezden kılcal boru içinde elektroforeze geçiş gaz kromatografisi teknikleri için geliştirilen düşük maliyetli, dar iç-çaplı kılcal boruların üretilmesiyle ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleri için yüksek hassasiyetli açık-hat (on-line) tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle mümkün olmuştur [2].

Kapiler elektroforeze has olumlu özellikler; geniş analitik çeşitlilik, yüksek verimli ayırım, yüksek kütle duyarlılığı, son derece düşük örnek hacimleriyle çalışma olanağı, hızlı analiz süreleri, tampon çözelti ve diğer malzemelerin (kapiler borular vb.) asgari düzeyde kullanımı, ileri tanı sistemleriyle (kütle spektroskopisi vb.) uyumluluk ve temel cihaz kurgusunun basitliği şeklinde sıralanabilir [3].

Günümüzde meyve sularının organik asit ve antioksidan içeriği araştırmaları artmaktadır. Organik asit profilleri her meyve türüne göre farklılık gösterdiği için, meyve sularının organik asit içerikleri aynı zamanda bir meyve suyunun daha ucuz bir meyve suyu ile hilelendirilmesinde önemli bir indikatördür. Bu çalışmanın amacı, kapiler elektroforez tekniğinin organik asit analizinde hızlı ve kolay uygulanan bir

teknik olduğunu göstermek ve bu çalışmada seçilen meyve suyu olan vişne sularının organik asit içeriklerini tayin etmektir.

Serbest radikalleri zararsız hale getiren maddelere antioksidan denir. Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi kronik hastalıkların önlemesi açısından çok büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle, bu çalışmada yüksek oranda polifenolik ve antosiyanin içerdiği bilinen vişne sularının antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır.

2. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez, bir elektrik alan altındaki tampon çözeltide yüklü partiküllerin belirli bir pH' da diferansiyel göç hızlarına dayanan ayırma yöntemidir [4]. İlk elektroforez cihazı Tiselius tarafından geliştirilmiş ve kendisine Nobel ödülü verilmiştir [5].

Kapiler elektroforezde ayırımı sağlayan bölge elektrolit çözeltisiyle doldurulmuş dar bir kolondur. Kapilerin yüksek elektrik direnci, düşük ısı üretimi ile çok yüksek elektrik alanların (100' den 500 V/cm' e kadar) uygulanmalarına olanak sağlar. Aynı zamanda, kapilerin geniş yüzey alanı hacim oranı, üretilen ısıyı yeterince dağıtır. Yüksek elektrik alan uygulanabilmesi; kısa analiz süreleri, yüksek etkinlik (10^5 tabaka sayısına ulaşan) ve ayırmacılık sağlar. Kapilerin iki ucu iki farklı çözelti kabına batırılır ve bu iki kapta bulunan elektrotlara uygulanan yüksek voltajın etkisi ile kapilerin bir ucundan injekte edilen örnek diğer ucuna doğru göç eder ve dedeksiyon bu uçta gerçekleşir [6,7].

2.1 Elektroforetik Mobilite

Elektroforetik ayırımın temeli, analitlerin bir elektrik alan altında, farklı hızlarda göç etmesine dayanmaktadır. Yüklü bir parçacığın elektriksel alandaki hızı aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$v = \mu_e \cdot E \quad (2.1)$$

v = iyonun hızı

μ_e = elektroforetik mobilite

E = elektrik Alan

Taneciğin mobilitesi ortamdaki elektrik alan kuvvetinden ve sürtünme kuvvetinden etkilenir. Yüklü tanecik üzerine etkili olan elektrik alan kuvveti iyonun yükü ve uygulanan elektrik alan ile doğru orantılı, sürtünme kuvveti ile ters orantılıdır [8].

Bu elektrik alan kuvveti aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$F_E = q.E \quad (2.2)$$

Küresel bir partikül için sürtünme kuvveti Stokes eşitliğı ile verilir.

$$F_F = - 6. \pi. \eta. r. v \quad (2.3)$$

Burada;

q = iyonun yükü

η = çözeltinin vizkositesi

r = iyonun yarıçapı

v = iyonun hızı

Elektroforez süresince iki kuvvetin dengede olduğı hal oluşur. Bu kuvvetler eşit fakat zıttır.

$$F_E = -F_F$$

$$q.E = 6. \pi. \eta. r. v \quad (2.4)$$

Bu eşitlik hıza göre çözölüp eşitlik (2.1) ile birleştirilince, mobiliteye ait eşitlik elde edilir.

$$\mu_e = q / 6. \pi. \eta. r \quad (2.5)$$

Ayırmada viskozite sabit olduğundan, elektroforetik mobilite (μ_e), taneciğın yük ve büyüklük oranına (q/r) bağılı olacaktır. Analitler bu orana bağılı olarak elektrik alanda farklı hıza sahip olurlar. Küçük ve çok yüklü türler yüksek mobiliteye sahipken, büyük ve az yüklü türler düşük mobiliteye sahiptir [9,11].

2.2 Elektroosmatik Akış

Silika kapiler SiOH'lardan oluşmuştur. Silika ile temasta olan çözeltinin pH'ı ikiden büyük olduğundan silika yüzeyinde iyonlaşma meydana gelir ve SiO⁻ grupları oluşur. Bu yüzden silika kapiler duvarı negatif yüklenir. Tampon çözeltinin (+) yüklü iyonları elektrostatik çekim sebebiyle duvarın kenarında delokalize olurlar. Bu

sisteme, yüksek bir voltaj uygulandığında (+) yüklü iyonlar (-) yüklü elektroda doğru hızlı bir akış meydana getirirler. İşte buna elektroosmatik akış (EOF) denir. Bu akış kapiler elektroforezde, ayrılmanın gerçekleşmesini sağlayan temel olaydır.

Elektroosmatik akış hızı şu şekilde ifade edilir:

$$v_0 = \mu_o \cdot E \quad (2.6)$$

Burada;

v_0 = elektroosmatik akış hızı

μ_o = elektroosmatik mobilite

Çözeltideki osmatik mobilite, genellikle iyonik mobilitelerden büyüktür. Bundan dolayı çözelti içindeki tüm tanecikler, yükü ne olursa olsun bu güçlü akış hızı ile negatif elektroda doğru sürüklenirler. Taneciklerin hızını şöyle ifade edebiliriz:

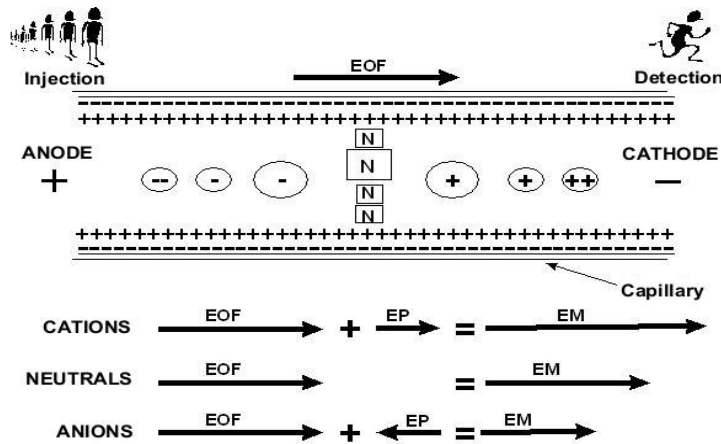
$$\text{Pozitif iyonlar için } v_+ = (\mu_o + \mu_+) \cdot E$$

$$\text{Nötral iyonlar için } v_0 = \mu_o \cdot E$$

(2.7)

$$\text{Negatif iyonlar için } v_- = (\mu_o - \mu_-) \cdot E$$

Örnek kapilerin pozitif ucundan injekte edildiğinde, dedektörde negatif uca yerleştirildiğinde, elektroosmotik akış bütün türleri yüküne bakmadan negatif elektroda doğru sürükleyeceğinden, bütün türler aynı anda belirlenebilir.



Şekil 2.1: Farklı partiküllerin CE' de geliş sırası.

Negatif olarak yüklenmiş silikada elektroosmatik akış hızı, anottan katoda doğrudur. Katyonların elektroforetik mobiliteleri, osmatik akış yönünde olduğu için ilk onlar dedektöre ulaşırlar. Nötral iyonların elektroforetik mobiliteleri olmadığından onlar elektroosmatik akış hızıyla hareket ederler. Anyonların elektroforetik mobiliteleri elektroosmatik akışla ters yönde olduğundan dedektöre en geç onlar ulaşır [10]. Bu olay Şekil 2.1’de gösterilmiştir .

2.3 Elektroosmatik Akış Hızına Etki Eden Faktörler

EOF çok önemlidir. Bu akış hızı çeşitli parametreler yardımıyla ayarlanarak ayırım sağlanır. Elektroosmatik akış hızına etki eden faktörler aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

2.3.1 Elektrik alan

Elektrik alan artarken elektroosmatik akış hızında da bir artma gözlenir [11].

2.3.2 pH

pH’ ın artması akış hızının artmasına neden olur. pH, elektroosmatik akış hızının ayarlanmasında en çok kullanılan parametredir [11,12].

2.3.3 Tamponun iyonik şiddeti

Tamponun iyonik şiddetinin arttırılması, zeta potansiyelini düşürür buna bağlı olarak da elektroosmatik akış hızında azalma görülür [11].

2.3.4 Sıcaklık

Sıcaklığın arttırılması, her 1°C için %2-3 oranında viskozitenin azalmasına sebep olur ve elektroosmatik akış hızının artmasına neden olur [11,13].

2.3.5 Organik modifiye edici madde ilavesi

Organik madde ilavesi ile viskozite değişir, bu sebeple EOF’ de değişir. Genellikle organik çözücülerin ilave edilmesi EOF’yi yavaşlatır [11]. Eğer organik madde viskoziteyi artırırsa EOF artabilir.

2.3.6 Yüzey aktif madde ilavesi

Ortama yüzey aktif madde ilavesiyle, bu maddeler kapiler yüzeyine adsorplanarak EOF hızını değiştirirler. Anyonik yüzey aktif maddeler EOF hızını artırırken katyonik yüzey aktif maddeler azaltır veya akış hızının yönünü değiştirebilirler [11].

2.3.7 Kapiler kolonun polimer madde ile kaplanması

Kapiler kolonların hidrofilik ve hidrofobik polimerlerle kaplanmasıyla elektroosmatik akış hızı yavaşlayabilir, yok olabilir veya tersine çevrilebilir [11].

2.4 Ayırma Parametreleri

Ayırma etkinliği, diğer kromatografik yöntemlerde olduğu gibi, teorik tabaka sayısı (N) ile ifade edilir.

$$N = (l/\sigma)^2 \quad (2.8)$$

l = kapilerin etkin uzunluğu

σ = pikin standard sapmasıdır.

Teorik plaka genişliği (HETP)

$$H = (l/N) \quad (2.9)$$

olarak ifade edilir.

Teorik plaka sayısı bir elektroferogramdan yararlanılarak da belirlenebilir.

$$N = 5,54.(t / w_{1/2})^2 \quad (2.10)$$

t = göç süresi

$w_{1/2}$ = yarı yükseklikteki pik genişliği

2.4.1 Geliş süresi

Ayrımda etkin olan ilk faktör, yüklü türlerin birbirinden farklı olarak kazandıkları elektroforetik mobiliteler sonucu gözlenen geliş süreleridir [12].

2.4.2 Pik genişlemesi

CE' de en önemli pik genişleme nedeni difüzyon nedeniyle pik genişlemesidir ve maddenin difüzyon katsayısı ve analiz süresi ile doğru orantılıdır. Difüzyonun pik genişlemesine etkisi, varyans cinsinden aşağıdaki eşitlik ile verilir.

$$\sigma^2 = 2.D.t \quad (2.11)$$

D = analitin difüzyon katsayısı

t = pikin geliş süresi

Yukarıdaki eşitliğe göre, analiz süresi kısaldıkça ve düşük difüzyon katsayısı maddelerde pik genişlemesi düşük olacaktır. Protein ve DNA gibi düşük difüzyon katsayısına sahip büyük moleküller, küçük moleküllere göre difüzyondan daha az etkilenmektedirler. Bu nedenle CE'de protein ve DNA ayırmalarında, çok yüksek teorik plaka sayılarına ulaşmak mümkün olur [14].

Kapiler kolon içerisindeki akım artışından kaynaklanan farklı sıcaklıktaki çözelti bölgeleri pik genişlemesine neden olur. Joule ısınması olarak bilinen bu ısınmadan dolayı çözeltinin iç kısımlarında viskozite daha az dolayısı ile iyon mobilitesi yüksek, kapiler duvarına yakın bölgelerde sıcaklık düşük, çözelti viskozitesi yüksek, iyon mobilitesi ise düşüktür. Bu sıcaklık farkı, pik genişlemesine neden olur [15].

Pik genişlemesine etki eden bir diğer faktör özellikle protein çalışmalarında rastlanan duvar adsorpsiyonudur.

2.4.3 Rezolüsyon (Ayrışma)

Bir ayırma yönteminde temel amaç örnek bileşenlerinden elde edilen piklerin tam olarak birbirinden ayrılmasıdır. İki pikin birbirinden ayrılmasının ölçüsü olan rezolüsyon (2.12) eşitliği ile verilir.

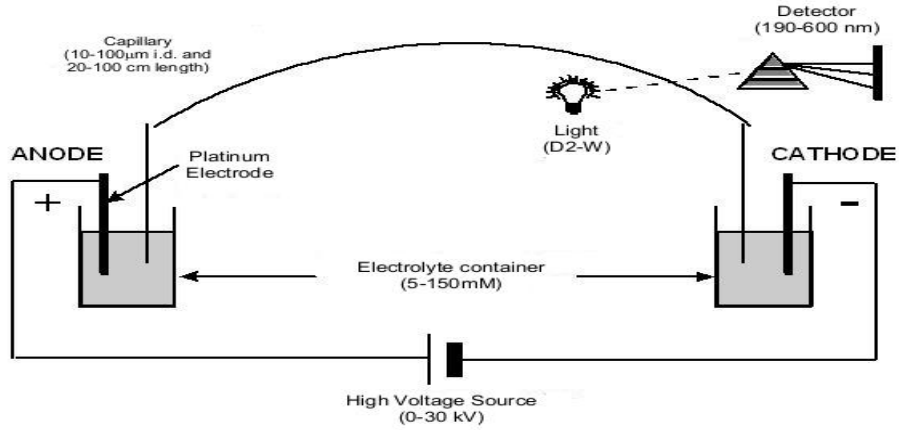
$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} \quad (2.12)$$

t = göç süresi

w = süre olarak pikin taban genişliği

2.5 Kapiler Elektrophorez Cihazının Temel Bölümleri

Kapiler Elektrophorez cihazının şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2 : CE’nin şematik gösterimi.

2.5.1 Kapiler

Kapiler elektrophorez cihazında kullanılan kapiler genellikle silika kapilerlerdir. Silika kapiler kırılmayı önlemek ve elastikiyeti korumak amacıyla koruyucu bir polimer tabaka ile kaplanmıştır. Kaplama, kolonun dayanıklı ve kolay kullanılabilir olmasını sağlar. Bu polimer tabakanın çok küçük bir kısmı yakılarak dedeksiyon için gerekli optik pencere elde edilir. Silika kapiler, 10-200 µm iç çapa ve çeşitli dış çaplara sahiptir. En çok kullanılan ise iç çapı 25-75 µm, dış çapı 350-400 µm olan kolonlardır. Genellikle 50-75 cm arası etkin uzunluğa sahiptirler. Toplam uzunluk ise, enstrüman özelliğine göre (dedektörden çıkış haznesine olan uzaklığa göre), etkin uzunluktan 5-15 cm daha uzun olmalıdır. Kapilerin boyu uzadıkça ayırım kolaylaşmasına karşın ayırım süresi artar [7]. Tekrarlanabilir sonuçlar açısından kapilerin kullanıma hazırlanması (şartlandırılma işlemi) çok önemlidir. İlk defa kullanılacak bir silika kapiler ilk önce 1M NaOH ile 10-30 dk ardından su ve çalışma tamponuyla da yıkanarak şartlandırılır.

2.5.2 Voltaj kaynağı

Tabaka sayısı voltaj ile orantılı olduğu için yüksek voltaj kaynağı kapiler elektrophorez için gereklidir. Üst limit genellikle 30 kV’tur. Voltajın sabit olması geçiş süresinin tekrarlanırlığı açısından önemlidir [16].

2.5.3 Elektrotlar

Platin elektrotlar kullanılır. Suyun ayrışması ile reaksiyonlar gerçekleşir[18]. Anotta ve katotta oluşan reaksiyonlar sırası ile;



2.5.4 Örnek injeksiyonu

Kapiler elektroforezde ayırımı yapılacak olan numuneyi kapilere almak için hidrodinamik ve elektrokinetik injeksiyon olmak üzere iki tip injeksiyon uygulanır.

2.5.4.1 Elektrokinetik injeksiyon

Elektrokinetik injeksiyonda, örnek haznesi ile çıkış tampon haznesi arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak örnek yüklenir. Analit, hem göç yolu ile hem EOF'nin pompalama etkisi ile kapiler içersine girer. Elektrokinetik injeksiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik injeksiyona göre daha azdır [17].

2.5.4.2 Hidrodinamik injeksiyon

Bu injeksiyon çeşidinde örnek, uygulanan basınç vasıtasıyla kapiler içerisine alınır. Cihazın tipine göre injeksiyon üç farklı yöntemle yapılmaktadır. Kapilerin dedektör tarafına vakum uygulanarak, kapilerin injeksiyon kısmına basınç uygulanarak ya da injeksiyon kabının yükseltilmesiyle bir sifon etkisi yaratılarak injeksiyon yapılabilir. Hidrodinamik injeksiyon için injeksiyon hacmi Hagen-Poiseuille'nin denkleminde hesaplanabilir.

$$V = \Delta P \pi r^4 t / 8 \eta L \quad (2.15)$$

Burada;

ΔP = kapiler boyunca oluşan basınç farkı (dyn.cm-2)

r = kapilerin iç çapı (cm)

t = injeksiyon süresi (s)

η = tampon viskozitesi (dyn.s.cm-2)

L = kapilerin toplam uzunluğudur.

2.5.5 Örnek dedeksiyonu

Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon çeşitleri, dedeksiyon sınırları. Avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.1’de verilmiştir. En çok kullanılan yöntemler UV absorpsiyon, floresans ve Lazer indüklenmiş floresans dedeksiyonudur.

Çizelge 2.1: Kapiler elektroforezde kullanılan dedeksiyon yöntemleri [11].

Yöntem	Dedeksiyon Sınırı (molar)	Avantajlar ve Dezavantajlar
UV-GB	$10^{-5} - 10^{-8}$	Kapsamlı
Absorpsiyon		Diyot ile spektral dedeksiyon
Floresans	$10^{-7} - 10^{-9}$	Hassas Örnek türevlendirmesi gerektirir Pahalı
Lazer	$10^{-14} - 10^{-16}$	Çok hassas
İletkenlik	$10^{-7} - 10^{-8}$	Kapsamlı Özel kapiler modifikasyonu gerekli
Kütle Spektrofotometresi	$10^{-9} - 10^{-8}$	Hassas Yapı hakkında bilgi sağlar

2.6 Kapiler Elektroforez Teknikleri

CE’ de çalışma amacına bağlı olarak kullanılan başlıca teknikler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2: Kapiler elektroforez teknikleri [10].

Model	Ayırmanın Temeli
Kapiler Zon Elektroforez (CZE)	Çözeltideki Analitlerin Serbest Mobilitelerinin Farklılığı
Misel Elektrokinetik Kromatografi (MEKC)	Misel ile Hidrofobik ve Hidrofilik Etkileşmeler Sonucu Moleküllerin Mobilitelerinin Farklılığı
Kapiler Jel Elektroforez (CGE)	İyon Büyüklüğü ve Küçüklüğü
İzoelektrik Fokus (ITP)	Analitlerin İzoelektrik Noktalarının Farklılığı

3. ANTİOKSİDANLAR

Geleneksel tanım olarak antioksidan oksidasyona karşı koyan, oksijen yada peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen maddedir. Her nefes aldığımızda ciğerlerimize yarım litre hava dolar. Bunun %20.7'si oksijendir. Oksijen alyuvarlarımıza bağlanır ve kalbe gider. Kalp, bu oksijenli kanı tüm hücrelere pompalar. Oksijen, hücredeki şekeri yakarak yaşam enerjisinin üretimini sağlar. Bu işlem esnasında oksijen moleküllerinin% 1-5'i değişime uğrar ve vücut için çok zararlı hale gelir ve serbest radikal oluşumuna neden olur. Serbest radikaller, peroksidasyon denen zincir reaksiyonlara sebep olurlar. Bu reaksiyonun kalp-damar, kanser ve romatizmal kireçlenmeler gibi hastalıklar üzerinde olası rolleri büyüktür. Vücudumuzda serbest radikalleri zararsız hale getiren enzim sistemi vardır. Enzim sisteminin güçlü çalışmaması sonucu hastalıklar ortaya çıkar. Bu durumda serbest radikalleri uzaklaştıracak dışarıdan alınacak maddelere ihtiyaç duyulur. Serbest radikalleri zararsız hale getiren bu maddelere antioksidan denir. Antioksidanlar serbest radikallerin neden olduğu kanser ve kalp rahatsızlıkları gibi kronik hastalıkları önlemesi açısından çok büyük bir öneme sahiptir [18].

Temel antioksidan kaynakları dörde ayrılmıştır [23].

1. Enzimler; Süperoksit dismutaz, peroksidaz, katalaz
2. Büyük moleküller; Albumin, Ferritin ve diğer proteinler
3. Küçük moleküller; Askorbik asit, urik asit, tokoferol, karetonoidler, polifenoller (Epigallokateşin, epigallokateşingallat, epikateşin, kateşin, kafeik asit, klorojenik asit, gallik asit, ferulik asit, kumarik asit vb.).
4. Bazı hormonlar; Östrojen, melatonin vb.

Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler "oksidan" veya "prooksidan" olarak tanımlanmaktadır [19]. Orbitallerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan homojen atomlar (Cl, Br), hidrojen atomu, Na, K gibi alkali metal atomları ve oksijenin rüksiyon ara ürünleri, süperoksit

radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet O_2 ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) gibi bağımsız, kısa ömürlü, reaktif atomlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller yiyeceklerde lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Bu durum besinlerin hem kokusunu bozmakta hem de besin değerini düşürmektedir [20].

Hücre içi ortamda oluşan serbest radikaller, önemli hücresel yapı ve bileşiklere etki ederler. Proteinler ve DNA; hücrede zarar gören önemli hedeflerden bazılarıdır. Biyolojik sistemlerde, serbest radikalın saldıracağı diğer bir hedef de hücre membranındaki lipidlerdir [21].

Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptir. Oluşan bu hasar; kanser, yaşa bağlı bağışıklık yetersizliği ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıklar ile ilişkilidir ve biyolojik yaşlanma sürecinde rol oynamaktadır. Günümüzde hemen her hastalığın bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kabul edilmektedir.

Serbest radikaller nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler bunlar:

1. Hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürmek,
2. Membran lipid ve proteinlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engellemek,
3. Nükleer membranını yararak nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek,
4. Bağışıklık sistemindeki hücreleri yok ederek bağışıklık sistemini zorlamak,

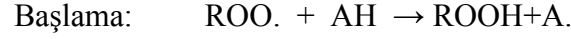
Bu etkiler oksidatif stres olarak bilinen DNA mutasyonları, hücre ölümleri ve hastalıkları gibi hasarlara neden olur.

3.1 Antioksidanlar ve Etki Mekanizması

Antioksidanlar hidrojen atomu verme kabiliyetine sahip kimyasal bileşenlerdir. Böylelikle, birincil radikalleri radikal olmayan kimyasal türlere çevirerek, okside olmuş antioksidan radikallere dönüştürler. Antioksidanların molekül yapısı sadece hidrojen atomu verme açısından değil, aynı zamanda radikalleri düşük reaktiviteli

hale getirip lipidler ile reaksiyona girmesini engellemesi açısından da oldukça uygundur [22].

Antioksidanların etki mekanizması 3.1’de gösterildiği gibidir.



Sistemde ki etkin mekanizma antioksidan yapısı, özellikleri ile çözünürlük partiyon katsayısı ve sistemde kullanılan çözügen gibi etkenlerle belirlenir. Bağ disosiasyon enerjisi (BDE) ve iyonizasyon potansiyeli (IP) mekanizmayı ve antioksidan etkinliğini belirleyen en önemli iki faktördür.

Her bir oksidan ve antioksidan farklı kimyasal ve fiziksel karaktere sahiptir. Her bir antioksidan reaksiyon sistemine bağlı olarak çoklu mekanizmaları ile yada farklı bir tekli mekanizma ile rol alır. Ayrıca antioksidanlar, farklı radikal yada oksidan kaynağına karşı farklı karşılık verir. Örneğin; Karotenoidler, fenoller ile kıyaslandığında; peroksil radikallerine karşı fenolik ve diğer antioksidanlar neredeyse etkisiz kalırken karotenoidler iyi bir radikal giderici etkiye sahiptir [23].

Antioksidanlar iki tiptedir;

1. Birincil veya zincir kırıcı antioksidanlar
2. İkincil veya önleyici

Eser miktarlarda bulunan birincil antioksidanlar, peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bunların doymamış lipid molekülleri ile reaksiyona girmesini engeller ve böylelikle daha kararlı ürünlere dönüşmesini sağlar. İkincil antioksidanlar ise çeşitli mekanizmalar ile zincir başlatıcı reaksiyonları geciktirir. Lipid otooksidasyon oranını azaltan ikincil antioksidanların etkisi metal iyonlarını bağlama, oksijen yakalama, UV absorblama ve singlet oksijeni inaktif hale getirme şeklindedir. Etkili olabilmeleri için, genellikle metal iyonları, indirgenme ajanları, tokoferoller, veya diğer fenolikler gibi ikincil bir komponentin varlığına ihtiyaç duyarlar [22].

İkincil oksidanlar, antioksidan sinerjistleridir. Bu antioksidanların sinerjistik etkileri ortamda bulunan diğer birincil antioksidanlara bağlıdır. Ortamda primer

antioksidanlar bulunmadığı durumda antioksidan aktiviteleri çok düşüktür veya antioksidan aktivite göstermezler. Örneğin askorbik asit, ortamda fenolik maddelerin bulunması ile sinerjistik etki gösterir [24].

Antioksidan aktivitesi fiziksel faktörler, subtrat faktörleri, gıda maddesinin fizikokimyasal durumu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Fiziksel faktörler; oksijen, sıcaklık ve konsantrasyondur. Yüksek oksijen basıncı, oksijenle temas yüzeyinin genişliği, ısıtma ve ışınlama gibi durumlar zincir reaksiyonunun başlama ve yayılma basamaklarını hızlandırdığından antioksidan aktivite azalacaktır. Farklı sıcaklıklarda ise antioksidan aktivitesi değişiklik gösterir. Antioksidan aktivitesi konsantrasyonun yükselmesi ile artar. Oksidasyonun yeterli bir derecede engellenebilmesi için konsantrasyon belli bir kritik değerin üzerinde olmalıdır [25].

3.2 Antioksidan Türleri

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Çoğu sentetik antioksidan fenolik yapıdadır. Antioksidan aktivitesi arasındaki farklılık kimyasal yapı ile alakalıdır. Ticari olarak mevcut olan ve günümüzde kullanılan sentetik antioksidanlar butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG)'tır. Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilen yada gıdanın işlenmesi sırasında açığa çıkan bileşenlerdir. En önemli doğal antioksidanlar, tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyumdur. Son zamanlarda gıda kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni sentetik antioksidanların (BHA, BHT, gibi) kanserojen olduklarının düşünülmesidir [22].

3.3 Antioksidan Aktivitesi Ölçüm Yöntemleri

Antioksidanlarla ilgili yayımlanan bilimsel makalelere bakıldığında zaman antioksidan kapasitesini tarif etmek için farklı araştırmacılar tarafından bir çok farklı terim kullanıldığı görülür. Toplam antioksidan kapasitesini içeren bu terimler, etkinlik, güç parametre, potansiyel ve aktivite gibi terimlerdir. Kimyasal aktivite spesifik reaksiyon koşullarındaki basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı gibi etkenlere bağlıdır.

Bu nedenle antioksidan aktivitesi o reaksiyon koşullarında ki ölçümü yansıtır. Yukarıda belirtilen diğer terimler ise spesifik reaksiyondan daha bağımsızdır [26].

Antioksidan aktivitesi ise bir bileşenin oksidatif degradasyonu önleme kabiliyeti olarak tanımlanır [27].

Günümüzde antioksidan aktivitesi ölçümleri için birçok farklı yöntem mevcuttur. Bu yöntemler genellikle serbest radikalleri içermektedir. Reaktan olarak kullanılan serbest radikalın özelliğine bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilebilmektedir [28].

Gıda bileşimlerinin karmaşık yapısından dolayı her bir antioksidan bileşeni ayırmak ve özel olarak bu bileşenle çalışmak hem yeterince etkili değildir hem de oldukça masraflı bir yöntemdir. Tüm bu nedenlerden ötürü, hızlı ve uygun bir antioksidan tayin yöntemi bulma çalışmaları oldukça önem kazanmıştır [26].

Antioksidan aktivitesi analizleri için literatürde mevcut çalışmalar bakıldığında kullanılan radikal kaynağına, reaksiyon mekanizmasına vb. özelliklere göre çeşitli gruplandırılmalar görülmektedir.

Başlıca antioksidan aktivitesi analizleri, kimyasal reaksiyon mekanizmasına göre iki kategoriye ayrılabilir.

1. Hidrojen Atom Transferine Dayanan Metot (HAT): Antioksidan kapasitesi (AOK), serbest radikallerin antioksidan maddenin hidrojeni ile etkisiz hale gelmesinin ölçülmesi ile tayin edilir.

2. Singlet Elektron Transferine Dayanan Metot (SET): Potansiyel antioksidanların elektron transfer etmesi ile metal, karbonil ve radikal içeren bileşiklerin indirgenmesine dayanan metottur [23].

HAT-esaslı analiz yöntemlerinin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir ve kantitasyon kinetik eğrilerden türetilir. HAT-esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur.

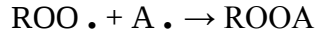
SET esaslı yöntemler reaksiyon sonunun indikatörü olarak bir oksidan (aynı zamanda reaksiyonu takip etmek için prob olarak kullanılır) ile redoks reaksiyonunu içerir.

HAT ve SET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür.

3.3.1 ORAC: Oksijen radikali absorplama aktivitesi (Oxygen radical capacity)

Bu metot Cutler ve Cao tarafından geliştirilmiştir [26]. ORAC yönteminde oksidasyon sonucu oluşan peroksil radikallerinin, antioksidan madde tarafından

inhibe edilmesi ölçülür. Klasik radikal zincir kırma reaksiyonlarından oluşur. Hidrojen atomu antioksidan madde tarafından radikale transfer edilir. Bu yöntemde AOK şöyle ölçülür: Peroksil radikalleri floresans bir madde (prob) ile reaksiyon vererek floresans özellikte olmayan bir ürün oluşturur. Floresans spektrofotometre ile miktar tayini yapılır. Antioksidan kapasitesi zamanla bu oluşan ürünün oranında ve miktarında azalma ile belirlenir [23].



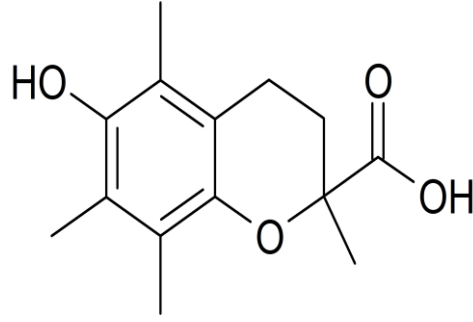
ORAC yönteminde antioksidan kapasitesi blank ve örnek arasındaki floresans şiddeti farkından yararlanarak hesaplanmaktadır.

Metot çözgen ve radikal kaynağı değiştirilerek hidrofilik ve hidrofobik sistemlere uyarlanabilir. Ancak analiz süresinin uzun olması (yaklaşık 1 saat) metot seçiminde sınırlayıcı etkenlerden biridir [23].

3.3.2 TRAP: Toplam radikal kapama antioksidan parametresi (Total radical trapping antioxidant parameter)

Bu metot antioksidan maddenin, AAPH veya ABAP bileşeninden oluşan peroksil radikalleri ile prob madde arasındaki reaksiyona engel olmasına dayanır. Reaksiyon gözlemlenerek bileşenin antioksidan kabiliyeti belirlenir. Oksijen kaynağı olarak farklı metotlar kullanılabilir. R-phycoerythin floresansı veya ABTS absorbansı reaksiyon prob maddesi olarak kullanılır [23].

R-PE ve APPH arasındaki reaksiyonun ilerlemesi florometrik olarak 495 ve 575 nm’de izlenir [26]. Antioksidan aktivitesi; zamanla antioksidanların tükenmesi yani okside olmuş prob maddenin görülme süresinin uzaması veya reaksiyon yüzdesinin azalması ile belirlenir. TRAP genellikle Troloks’a tekabül eden süre ile karşılaştırılarak verilir.



Şekil 3.1 : Troloks molekülünün kimyasal yapısı.

TRAP metodu glutathione, askorbik asit, tokoferol, beta karoten gibi enzimatik olmayan antioksidan kapasitesini ölçmek amacı ile kullanılır.

3.3.3 TOCS: Toplam oksidan yakalama aktivitesi (Total oxidant scavenging capacity)

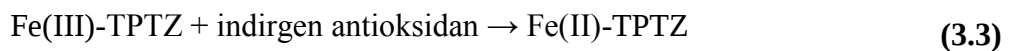
Bu metot hidroksil-peroksil ve peroksinitril radikallerine karşı antioksidan reaksiyonunun absorbans ölçümüne dayanır. Keto-&-methiobütrik asit (KMBA) substratı okside olarak etilen oluşturur. Oluşan etilen ise GC " head space" analizi ile belirlenir. Antioksidan kapasitesi ise; antioksidan maddenin etilen oluşumunu inhibe etmesi ile ölçülür. Burada kontrol reaksiyonuna karşı göreceli olarak antioksidan maddenin etilen oluşumunu inhibe etmesine bakılır [23].

3.3.4 CL: Kemiluminesans (Chemiluminescence)

Bu metot radikal oksidanların işaretleyici bileşenlere reaksiyon vererek uyarılmış duruma geçmesi ve böylelikle kemiluminesans ışığı yaymasına dayanır. Başlatıcı radikallerle reaksiyona giren herhangi bir molekül ışık oluşumunu engeller. Antioksidan kapasite ışık emisyonunun zamanla azalmasına dayanılarak ölçülür. Kemiluminesans çok düşük emisyon şiddeti ile karakterize edilir. İşaretleyici olarak ise en yaygın olarak kullanılan bileşik luminoldür [23].

3.3.5 FRAP: Demir (III) indirgeyici antioksidan aktivite (Ferric reducing antioxidant power)

Bu metotta Fe(III) tripiridiltriazin (TPTZ) kompleksinin antioksidanlar varlığında renkli Fe(II) şelatına indirgenmesinden yararlanmaktadır [29].



3.3' deki reaksiyona göre 595 nm'de şiddetli mavi renk oluşur. Reaksiyon süresi kısadır ancak; bazı polifenoller daha yavaş reaksiyon verebilirler. FRAP sadece ferrik iyonları indirgeyebilen maddeleri ölçer.

3.3.6 CUPRAC: Bakır (II) indirgeyici antioksidan aktivitesi

FRAP metodunda kullanılan demir yerine burada bakır metali kullanılır. Bu metot antioksidan maddenin Cu(II) 'yi Cu(I)'e indirgenmesine dayanır.

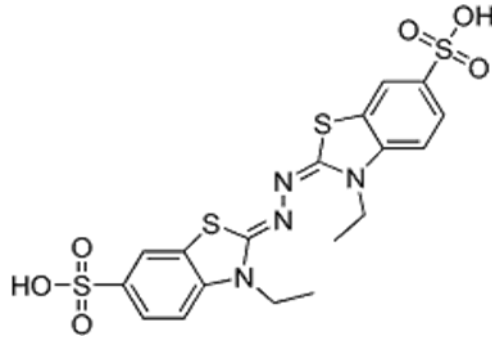
Bahtocuprione ve Neocuprione Cu(I) ile 2:1 oranında birleşerek renkli bir kompleks oluşturur. Bahtocuprione (2,9 -dimetyl-4,7diphenly-1,10 phenanthroline) ve Cu(I) ile 490 nm'de gözlenen bir kromofor oluşturur. Neocuproine (2,9-dimethyl-1,10 phenanthrolin) de 450 nm'de gözlenen bir kromofor absorbands ölçülür [23].

Bu yöntem, demir (III) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden sonuç veren FRAP gibi yöntemlerden daha hızlıdır, çünkü FRAP yönteminin bazı antioksidanları reaksiyon süresince tam yükseltgeyemediği ve glutatyon, tiol tipi antioksidanları ölçemediği literatürden bilinmektedir. Ayrıca reaktif oldukça seçimlidir, çünkü redoks potansiyeli fenantrolin veya tripridiltriazin tipi ligantların varlığında ferriferro çiftinden daha düşüktür.

3.3.7 TEAC veya ABTS metodu

TEAC analizi ilk olarak Miller ve Rice -Evans tarafından 1993'te rapor edilmiştir. Daha sonraları ise bu metot geliştirilmiştir.

Bu metotta ABTS [2,2'-azonobis(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonat] peroksil veya diğer oksidanlara okside olur ve ABTS^{•+} radikal katyonu oluşur. Oluşan ABTS radikal katyonu oldukça şiddetli bir renge sahiptir. Antioksidan kapasite, test bileşeninin ABTS^{•+} radikal katyonu ile direkt olarak reaksiyona girmesi ile renk şiddetindeki azalma ölçülerek belirlenir [23]. 1mM deneysel örneğin absorbandsda yaptığı değişim kadar değişim yapan Troloks konsantrasyonu TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasite) değeri olarak tanımlanmaktadır [26].



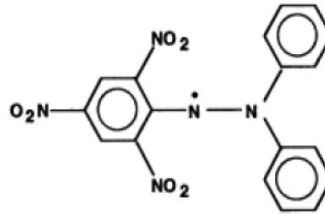
Şekil 3.2: ABTS' nin molekül yapısı.

ABTS^{•+} radikal katyonundaki azalma denklem 3.4'de verilmiştir.

$$\% \text{ ABTS}^{\bullet+} \text{ azalması} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{başlangıç}} - \text{Abs}_{\text{son}})}{\text{Abs}_{\text{başlangıç}}} \right] * 100 \quad (3.4)$$

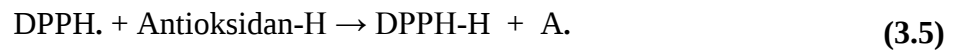
3.3.8 DPPH metodu

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikal yakalama yönteminde, kararlı ve sentetik bir radikal olan DPPH kullanılır ve antioksidanın bu serbest radikali yakalama yeteneği ölçülerek antioksidan aktivite tanımlanır.



Şekil 3.3: DPPH reaktifinin kimyasal yapısı.

Antioksidan -DPPH radikali reaksiyon mekanizması aşağıda olduğu gibidir.



DPPH, koyu mor renkte bir radikaldir. Antioksidan bir proton alarak renksiz α, α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne dönüşür. Antioksidan madde tarafından indirgenmesi sonucu rengi açılır. En yaygın olarak kullanılan dekolarizasyon test metodu 515-517 nm'de DPPH' in antioksidan madde ile reaksiyonunun absorbansının ölçülmesidir [25].

DPPH analizinde genellikle belirli miktarda DPPH çözeltisi ve örnek çözeltisi karıştırıldıktan 30 dakika ya da absorbans sabit oluncaya kadar geçen süre sonra

515nm’de absorbands okunur. İndirgenme reaksiyonu boyunca çözeltinin rengi solmaya devam eder [26].

Kalan DPPH’ in hesaplanması denklem 3.6’ de verilmiştir.

$$\%DPPH \text{ kalan} = 100 * [DPPH.] / [DPPH.] \text{ to} \quad (3.6)$$

Kalan DPPH, antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır ve başlangıç DPPH konsantrasyonunun yarıya indiği durumdaki antioksidan konsantrasyonu EC₅₀ olarak verilir. DPPH metodu basit ve hızlı olduğundan antioksidan aktivitesi belirlemede sıklıkla kullanılır.

3.3.9 İndirgeme potansiyeli metodu

Serbest radikalleri, yakalama aktivitesi esasına dayanan diğer yöntemlerden biri olan indirgeme potansiyeli metodunda yüksek absorbands, yüksek indirgeme potansiyelini gösterir. Bu metotta antioksidan maddenin indirgeme gücüne bağlı olarak antioksidan aktivite belirlenir. Potasyum ferrisiyanid [K₃Fe(CN)₆] maddesindeki Fe(III) iyonlarının antioksidan reaksiyon sistemi içerisinde Fe(II) iyonlarına indirgenmesi 700 nm’de ölçülerek antioksidan aktivite belirlenir. Yüksek absorbands değeri yüksek indirgeme potansiyelini gösterir. Sonuçlar askorbik asit eşdeğeri olarak verilir [30].

3.3.10 Folin ciocalteu (FC) metodu: toplam fenol metodu

Gıdaların içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. FC metodu doğal ürünlerde toplam fenolik madde ölçümü için kullanılmaktadır. Ancak aynı zamanda temel mekanizma oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına dayandığı için diğer bir AOK metotlarından biri olarak kullanılabilir. Genellikle toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivitesi arasında oldukça iyi bir lineer korelasyon görülür.

FC reaktantı ile fenolik maddelerin okside olması sonucu 745-765 nm’de gözlenebilen renkli bir ürün oluşur.

Fenolik olmayan maddeler tarafından da indirgenebilen FC reaktantı sadece fenoliklere karşı spesifik değildir. Fenolik bileşenler FCR ile bazı şartlar altında reaksiyon verirler sodyum karbonat ile pH yaklaşık 10’ a ayarlanır. Fenolik

protonların disosiyasyonu ile fenolat anyonu oluşur ve buda FCR'yi indirgeyebilme özelliğine sahiptir. Fenolat anyonu FCR reaksiyonundan oluşan mavi renkli bileşen fenolik maddenin yapısından bağımsızdır.

Bu metot basit, duyarlı ve kesinliği yüksek bir metottur. Ancak reaksiyon asidik pH'ta yavaşır ve spesifikliğini kaybeder. Metodun en önemli dezavantajı, ortamda bulunan ekstrakte edilebilir proteinleri de ekstrakte etmesidir. Bu nedenle spesifik bir metot olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca metodun diğer bir dezavantajı da analiz sırasında ortamda bulunan askorbik asit gibi indirgen maddelerle etkileşime uğramasıdır [26].

Fenol referans standardı olarak gallik asit kullanılır. Fakat bazı kaynaklarda farklı standartlara da rastlanmıştır. Burada bahsedilen yöntemlerden farklı olarak hidrojen peroksit yakalama, hidroksil radikali yakalama, süper oksit anyon yakalama gibi yöntemlerde mevcuttur.

Standart bir analizin eksikliğinden dolayı, farklı araştırma grupları tarafından rapor edilen sonuçları karşılaştırmak zordur. En önemli problem gıdalardaki ve biyolojik örneklerde ki antioksidan aktiviteyi güvenilir şekilde ölçen analiz metotlarının validasyon eksikliğidir.

Antioksidan aktivitesi ölçüm metotlarını standartlaştırmak anlamlı karşılaştırmalar yapabilmek açısından oldukça önemlidir.

Standartlaştırılmış bir metot;

1. Potansiyel uygulamalarda ki kimyasal olayları önlemelidir.
2. Biyolojik olarak alakalı bir radikal kaynağı içermelidir.
3. Basit olmalıdır.
4. Metot belirli bir son nokta ve kimyasal mekanizmaya sahip olmalıdır.
5. Enstrümanlar kolaylıkla temin edilebilmelidir.
6. Tekrarlanabilirlik iyi olmalıdır.
7. Metot farklı radikal kaynağı kullanılarak lipofilik ve hidrofilik antioksidanlara uyarlanabilmelidir.

4. ORGANİK ASİTLER

Molekülünde –OH ve –COOH grupları bulunan doğal bileşiklere organik asit denir. Bu asitler meyve ve sebzelerde değişik cins ve miktarlarda ama daima suda erimiş halde bulunurlar. Genellikle serbest halde, bir kısmı da tuz, ester gibi bileşikler çözünmüş şeklinde bulunur.

Meyvelerin içerdiği organik asitlerin çeşit ve miktarlarında çok büyük farklılıklar vardır. Bazen bir, bazen de iki tür organik asit baskın miktarda bulunabilir. Örneğin üzümelerde tartarik asit, elmalarda malik asit, turunçgillerde sitrik asit baskın iken; armutlarda malik asit ile sitrik asit miktarları birbirine yakın değerlerde bulunurlar.

Meyve ve sebze sularının üretiminde de tatlandırıcı veya koruyucu olarak organik asitler kullanılır. Tatlandırıcı olarak özellikle sitrik asit tercih edilir. Onun dışında tartarik, fumarik ve fosforik asit de kullanılır. Benzoik asit ise koruyucu olarak kullanılır [31].

4.1 Vişnede Tayin Edilen Organik Asit ve Özellikleri

4.1.1 Malik asit

Malik asit, vişnede bulunan organik asittir. Diğer adı elma asididir. Sert ve yumuşak çekirdekli meyvelerde toplam asitliğin %50-90'ı malik asittir.

Malik asit, kapalı formülü $C_4H_6O_5$, molekül ağırlığı 134.09 g/mol olan dibazik bir hidroksi asittir. Kokusuz, beyaz, kristal tuz halinde ya da tanecik halinde, ekşi tattadır. Birçok bitkide tuz halinde veya serbest halde bulunur.

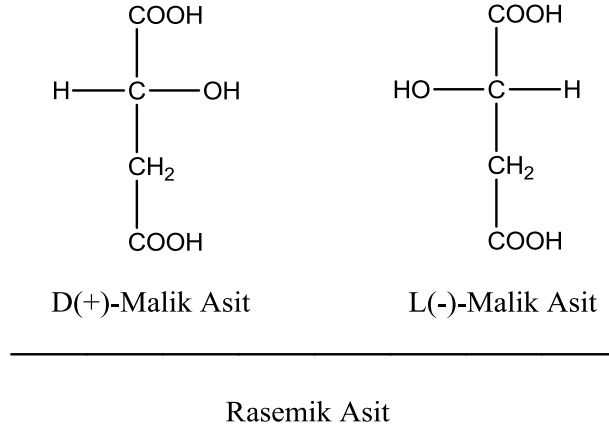
Malik asidin 3 tane stereoizomeri vardır. Bunlar; optikçe aktif olan D(+)-malik asit, L(-)-malik asit ve rasemik DL-malik asittir.

L(-)-malik asit: 101°C'de erir.

D(+)-malik asit: DL-malik asidin ayrıştırılması ile L(-) malik asitten üretilir.

DL-malik asit: Ergime noktası 130°C'dir. Aspartik süksinik ve tartarik asitlerden çeşitli yollarla yapay olarak elde edilebilir.

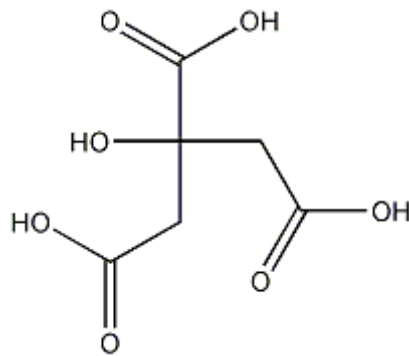
Malik asit, aroma düzenleyici olarak alkolsüz içeceklerde, taklit reçel, jöle ve şekerleme yapımında kullanılır. Ayrıca, vişne ve diğer meyve sularından hazırlanan içeceklerde renk stabilizatörü olarak kullanılır [31].



Şekil 4.1 : Malik asit izomerleri.

4.1.2 Sitrik asit

Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3-propan trikarboksilik asit), ekşi tadı, düşük toksisitesi, emiliminin kolay olması ve suda çözünürlüğünden dolayı gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde, asitliği düzenleyici, aroma arttırıcı, koruyucu, şelat oluşturucu, oksidasyonu önleyici ve emülgatör olarak geniş kullanım alanına sahiptir [32].



Şekil 5.1 : Sitrik asit.

5. DENEYSEL KISIM

5.1 Kapiler Elektforez Yöntemi İle Organik Asit Tayini

5.1.1 Kullanılan kimyasallar ve çözeltilerin hazırlanması

PDC (Pridinyum Dikromat), CTAB (Setil trimetil amonyum bromür) Merck'ten (Darmstadt, Almanya); malik asit Sigma-Aldrich'den (Almanya) temin edilmiştir. Bütün çözeltiler Elga Purelab Option-Q model sistemi ile elde edilen saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Vişneler ve vişne suları farklı yerel marketlerden temin edilmiştir.

Bu uygulamada optimum ayırım için tampon 5 mM 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC), 0.1 mM N-Cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide (CTAB) olarak seçilmiştir. Tampon çözelti NaOH yardımıyla pH 6'ya ayarlanmıştır. PDC bir kromofor olarak dolaylı dedeksiyonu, CTAB pozitif yüklü bir yüzey aktif madde olarak kapiler iç duvarının pozitif olarak yüklenmesini sağlamıştır.

Malik asit stok çözeltisi 5 mM derişimde hazırlanmıştır. Sonrasında hazırlanmış stok çözeltiden saf su ile istenilen oranlarda seyreltilerek numuneler hazırlanmıştır.

Vişne suları, taze vişneden ve ticari vişne sularından elde edilmiştir. Vişne suları 0,5 µm'lik mikro filtreden süzölüp, 400 kat seyreltilerek kapiler kolona enjekte edilmiştir.

5.1.2 Cihazlar ve enjeksiyon koşulları

Tampon çözeltinin pH'ı Thermo Scientific marka pH metre ile ayarlanmıştır. Ayırma, CE enjeksiyon sistemi (Prince Technologies BV, Emmen, Netherlands) ile kombine UV Visible dedektör (Lambda 1000, Bishoff, Leonberg, Germany) kullanılarak yapılmıştır. Otomatik kapiler yıkaması, örnek enjeksiyonu, voltaj uygulaması ve verilerin değerlendirilmesi DAX 8.0 Data Acquisition and Analysis programında yapılmıştır. Ayırım 30 kV potansiyel uygulanarak 25°C'de,

enjeksiyon 50 mbar basınçta 6 saniyede gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon negatif kutuptan yapılmıştır. Dedeksiyon 210 nm’de yapılmıştır.

Kullanılan silika kapiler kolon 75 µm iç çapına sahiptir ve Polymicro Technologies’den (Phoenix, AZ, Amerika) temin edilmiştir. Toplam uzunluğu 65cm ve etkin uzunluğu 55 cm’dir. Kapiler kolon ilk kullanımda 1 M NaOH ile 30 dakika, su ile 10 dakika süreyle muamele edilmiştir. Gün başlarında kapiler kolon 1M NaOH ile 15 dakika, su ile 5 dakika ve tampon çözelti ile 10 dakika süreyle yıkanmıştır. Enjeksiyon aralarında 1,5 dakika tampon çözelti ile yıkama yapılmıştır.

5.2 Antioksidan Tayini

5.2.1 Kullanılan kimyasallar ve çözeltilerin hazırlanması

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), FeCl₃.6H₂O (Demir Klorür), CH₃COONa.3H₂O (Sodyum Asetat), TPTZ (tripridiltiazin), HCl (Hidroklorik Asit) Merck’den (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir.

20 mg/L DPPH çözeltisi metanolde hazırlanmıştır. 20 mM FeCl₃.6H₂O; 0,3 M CH₃COONa.3H₂O; 10 mM TPTZ(40Mm HCl’ de çözündürülmüş) standartları hazırlanmıştır.

5.2.2 Cihaz

Antioksidan tayini için Shimadzu UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

5.2.3 DPPH yöntemin ile antioksidan tayini

20 µL vişne suyu örneği, 1980 µL DPPH ile karıştırılarak 30 dakika karanlıkta bekletilir ve 515 nm’de absorbansları ölçülür. Deaktivite yüzdesi 5.1’deki eşitlikle hesaplanır.

$$\frac{Kontrol(abs) - Örnek(abs)}{Kontrol(abs)} * 100 \quad (5.1)$$

5.2.4 FRAP yöntemi ile antioksidan tayini

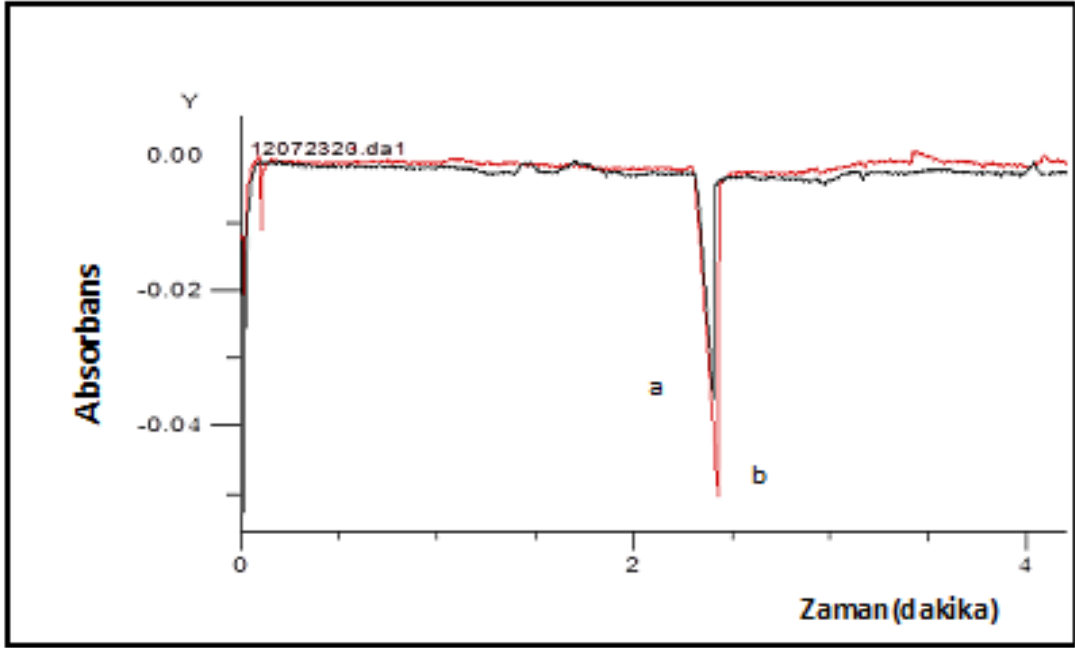
Hazırlanan standartlar 1:1:10 (v:v:v) oranında 20 mM FeCl₃.6H₂O; 0,3M CH₃COONa.3H₂O; 10mM TPTZ karıştırılarak 10 dakika 37°C’ de inkübasyon

işlemi uygulanır. 50 µL vişne suyu örneği, 1950 µL standart çözelti ile karıştırılarak tekrar aynı işlem uygulanır ve 10 kat oranında seyreltilerek 593 nm’de absorbansı ölçülür. Bu yöntem için FeSO₄’ün kalibrasyon grafiği çizilmiş ve antioksidan kapasitesi mmol Fe⁺²/L cinsinden hesaplanmıştır.

6. SONUÇLAR

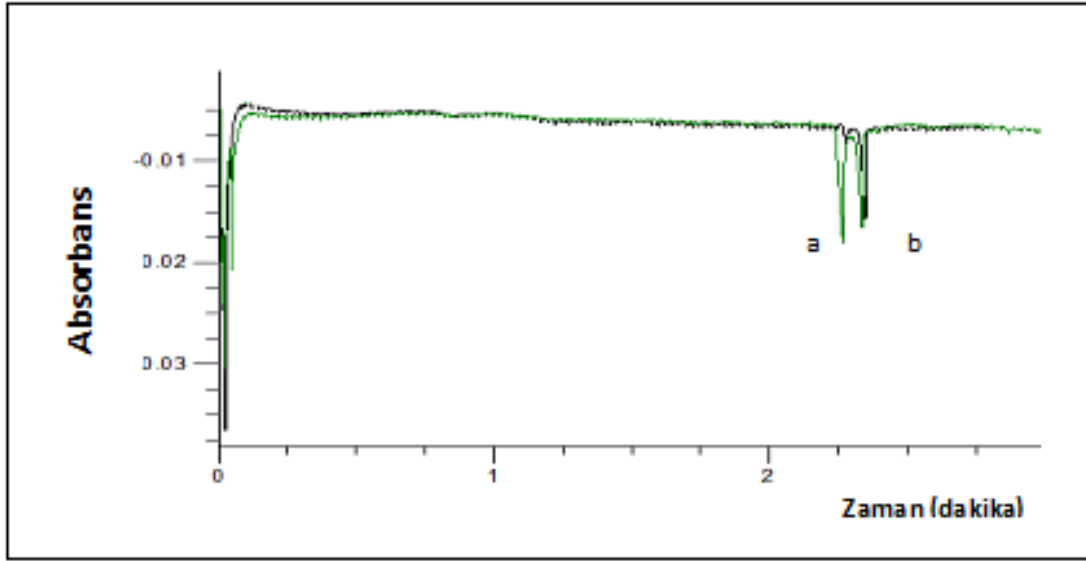
6.1 Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Organik Asit Tayini

Vişne suyu örneğinde organik asit olarak sadece malik asit tespit edilmiştir. Şekil 6.1'deki a elektroferogramı 1/400 oranında seyreltilmiş vişne suyuna aittir. b elektroferogramı ise 1/400 oranında seyreltilmiş vişne suyuna malik asit eklenmiş örnektir.



Şekil 6.1: Taze vişne suyuna ait elektroferogram.

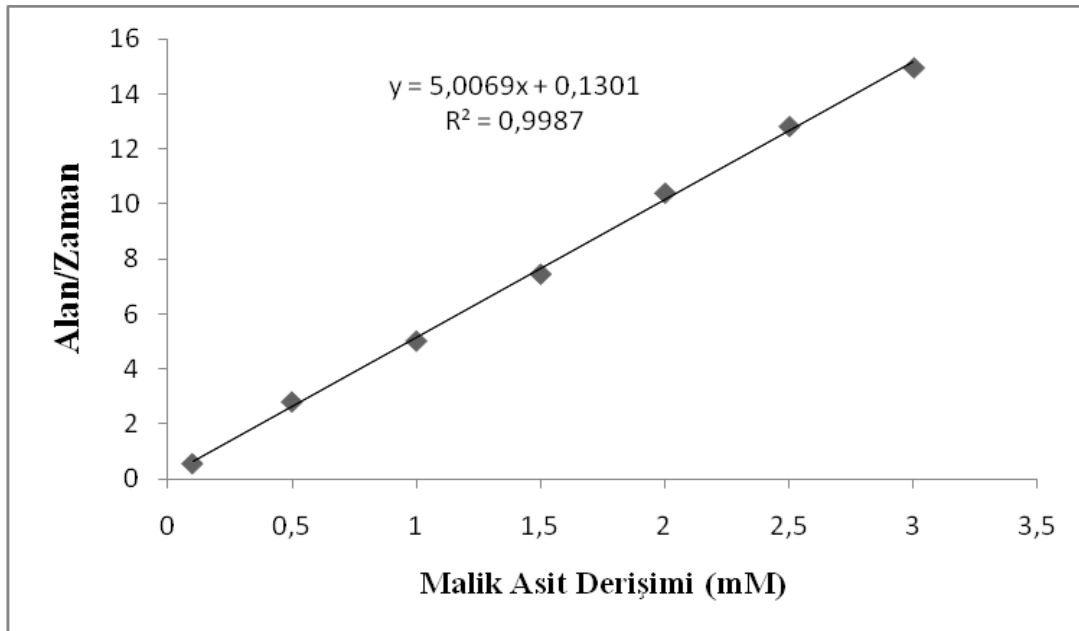
Ticari meyve sularında malik asit yanında koruyucu olarak katılan ve meyve sularının etiketinde de belirtilen sitrik asit varlığı tespit edilmiştir. Şekil 6.2'deki a piki 1:500 oranında seyreltilmiş ticari vişne suyuna sitrik asit eklenmiş örnektir, b piki ise ticari vişne suyundaki malik asit pikidir.



Şekil 6.2 : Ticari vişne suyuna ait elektroferogram.

6.1.1 Hesaplamalar

Vişne suyundaki malik asit miktarını hesaplamak için 0,1 mM- 3 mM standart malik asit konsantrasyon aralığında kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 6.3: Malik asit kalibrasyon grafiği.

Çizelge 6.1 : Vişne çeşitlerindeki malik asit ve sitrik asit miktarları.

Vişne Çeşidi	Malik Asit Miktarı (g/L)	Sitrik Asit Miktarı (g/L)
Kütahya 1	25,0±0,7	X
Kütahya 2	40,4±0,7	X
Kütahya 3	30,9±1,4	X
Kütahya 4	34,6±0,7	X
Kütahya 5	26,0±0,8	X
İzmir	28,0±1,2	X
Yalova	24,8±0,9	X
Ticari 1	5,85±0,04	(0,66±0,02).10 ⁻³
Ticari 2	5,73±0,08	(2,31±0,04).10 ⁻³
Ticari 3	6,03±0,08	(0,83±0,05).10 ⁻³
Ticari 4	5,64±0,05	(2,46±0,04).10 ⁻³

Kalibrasyon denkleminde dayanarak yapılan hesaplamalara göre yukarıdaki malik asit ve sitrik asit miktarları bulunmuştur.

Çizelge 6.2 : Malik asit ve sitrik asit geri kazanım yüzdeleri (sırasıyla).

Spike (mM)	Geri Kazanım (%)
0,44	% 97-99
0,88	% 98-96
1,7	% 98-102

Tekrarlanırlık için 10 defa arka arkaya enjeksiyon yapılmış ve % RSD 4,03 olarak bulunmuştur.

6.2 Antioksidan Tayini

DPPH ve FRAP yöntemiyle elde edilen sonuçlar Çizelge 6.2 ve 6.3’de verilmiştir.

Çizelge 6.3: DPPH yöntemiyle elde edilen deaktivite sonuçları.

	DPPH %
Kütahya 1	82,6±1,6
Kütahya 2	81,1±3,8
Kütahya 3	86,0±3,4
Kütahya 4	83,9±1,1
İzmir	83,3±0,2
Yalova	86,0±0,9
Ticari 1	33,9±1,9
Ticari 2	73,4±4,9
Ticari 3	66,0±2,8
Ticari 4	68,0±4,2

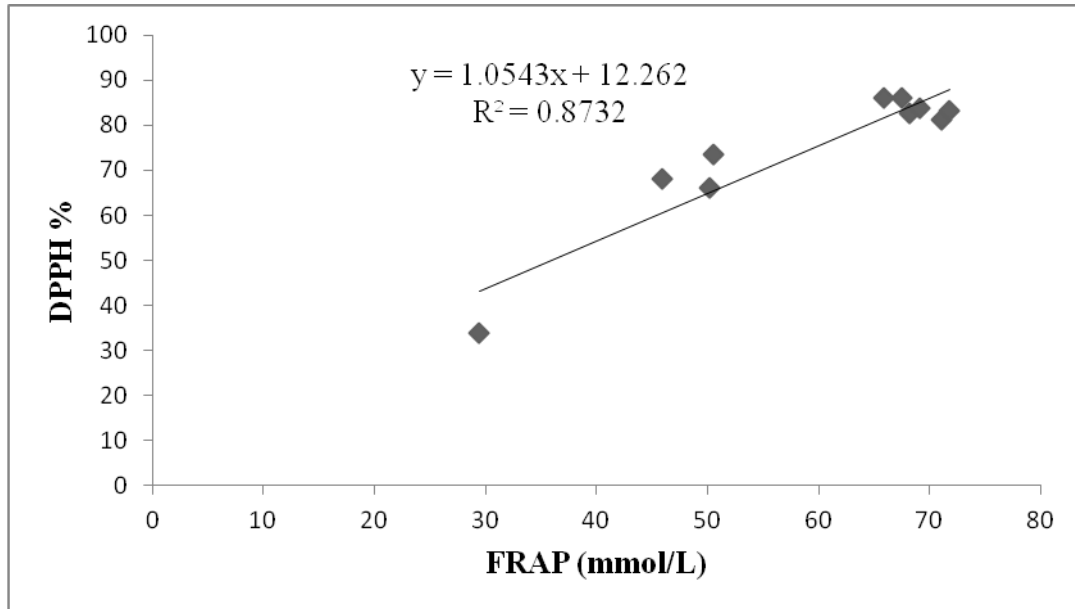
Çizelge 6.4: FRAP yöntemiyle elde edilen antioksidan miktarları.

	FRAP (mmol Fe ²⁺ /L)
Kütahya 1	68,22 ±0,58
Kütahya 2	71,06±0,45
Kütahya 3	65,88±1,31
Kütahya 4	69,12±0,76
İzmir	71,79±0,76
Yalova	67,43±0,45
Ticari 1	29,42±0,27
Ticari 2	50,53±0,63
Ticari 3	50,22±0,31
Ticari 4	45,92±0,13

DPPH ile bulunan deaktivite sonuçlarında taze vişnelerin deaktive yüzdeleri % 81,1-86; vişne sularının ise % 33,9-73,4 arasındadır.

FRAP yöntemi ile yapılan sonuçlarda da taze vişnelerin antioksidan kapasiteleri vişne sularından daha iyidir.

Bulunan DPPH ve FRAP değerleri arasında yüksek korelasyon ($R^2>0,80$) saptanmıştır. Korelasyon grafiği Şekil 6.3'de verilmiştir.



Şekil 6.4: FRAP-DPPH korelasyonu.

7. TARTIŞMA VE YORUM

Yapılan denemeler sonucu organik asitlerin kapiler elektroforez yöntemi ile analizleri uygun tampon olarak seçilen pH 6'da 5 mM PDC ve 0,1 mM CTAB çözeltisinde 6 saniye hidrodinamik enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Taze vişne sularında sadece malik asit saptanırken, ticari meyve sularında malik asit yanında koruyucu olarak katılan ve etiketlerinde de belirtilen sitrik asit varlığı tespit edilmiştir. Yöntemin malik asit ve sitrik asit için tekrarlanırlığı % 4,03 (%RSD) olarak hesaplanmıştır. Malik asidin minimum tespit sınırı (LOD) 0,01 mM, sitrik asidin minimum tespit sınırı (LOD) 0,002 mM olarak bulunmuştur. Malik asidin minimum ölçüm sınırı (LOQ) 0,035 mM, sitrik asidin minimum ölçüm sınırı (LOQ) 0,007 mM olarak saptanmıştır. Yöntemin doğruluğu, analiz edilen örneklerle farkı konsantrasyonlarda malik asit ilavesi ile kontrol edilmiş ve geri kazanım değerleri ise %97-102 değerleri arasında bulunmuştur.

Vişne sularının antioksidan kapasiteleri iki farklı yöntemle saptanmış ve iki yöntem sonuçları yüksek korelasyon göstermiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Manz A.** 2003. Electrophoresis. *Bioanalytical Chemistry*. World Science Pub. Co.,Inc. s47-84.
- [2] **Xu Y.** 1996. *The Chemical Educator*. 1 (2): 1-14.
- [3] **Tagliaro F, Dely Z, Mikšik I, Ulfelder KJ.** 1998. Concepts and principles of high performance capillary electrophoresis. *HPLC in Enzymatic Analysis* (Ed: Rossomando, E.) John Wiley & Sons, NY.
- [4] **Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A.,** 1998. Principles of Instrumental Analysis, Saunders College Publishing, USA.
- [5] **Özden S., R., Akı-Şener E., Yalçın İ.,** 2004. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Pratikleri 1-2.
- [6] **Nutku, M. S.,** 1988. İnorganik anyonların, organik asitlerin ve DNA parçalarının kapiler elektroforez ile ayırımında polielektrolit kullanımı, Doktora Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [7] **Alemdar, İ.,** 1997, Fenollerin sulu çözeltilerden organo kil üzerinde adsorpsiyon ile zenginleştirilmesi ve kapiler elektroforez yöntemi ile tayini, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [8] **Cansever Ş., Erim F.B.,** 2005. Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I, *J.Chromatogr.B*, 818 (2): 309-311, 2005.
- [9] **Manz, A., Pamme, N., Jossifidis, D.,** 2004. *Bioanalytical Chemistry*, Imperial College Press, London.
- [10] **Şenel, K. A.,** Metal İyonlarının 1,10- Fenantrolin ile Kompleks Oluşturarak Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü., (1996)
- [11] **Heiger D.,** 2000. High Performance Capillary Electrophoresis An Introduction, Agilent Technologies, Germany.
- [12] **Cansever M.Ş.,** 2010 Metabolik Hastalıkların Teşhisinde Kapiler Elektroforez Doktora Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [13] **Aydın H.M.,** 2007. Unlarda Katkı Maddesi Bromatın Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Tayini, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [14] **Hjerten, S.,** 1990: "Zone broadening in electrophoresis with special reference to high performance electrophoresis in capillaries: An interplay between theory and practice," *Electrophoresis*, vol. 11, pp. 665–69.
- [15] **Grossman, P. D.,** 1992, *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic, London.

- [16] **Kocatürk, N.**, 2002. İnorganik anyonların kapiler elektroforez yöntemi tayininde yüksek tuz etkisinin incelenmesi ve deniz suyunda bromüt tayini, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [17] **Bjergegaard, C., Michaelsen, S.**, 1999. Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis, Paston Prepress, Denmark.
- [18] **Yener Tekeli, Mehmet Sezgin**, Centaurea Carduiformis (Peygamber Çiçeği)'i Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi Selçuk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Kimya.
- [19] **Özyurt, D.**, 2005. Toplam flavonoid miktarının geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [20] **Yakup Kar, Nejdet Şen, Yener Tekel**, Samsun Yöresinde ve Mısır Ülkesinde Yetiştirilen Çörekotu (Nigella sativa L.) Tohumlarının Antioksidan Aktivite Yönünden İncelenmesi,,2(2),197 203,2007.
- [21] **Naczki, M. and Shahidi, F.**, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A,1054,95-111.
- [22] **Madhavi, D. L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D. K.**, 1996. Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives .Markel Dekke, Newyork, pp41-50
- [23] **Prior, R. L., Wu, X., Scaich, K.**, 2005. Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(8),3110-3113.
- [24] **Hudson, B.**,1990. Food Antioxidants, Elsevier Science, USA, pp173-188.
- [25] **Pokorny, J., Yanishlieva, N. And Gordon , M.** 2001. Antioxidants in food, CRC Press, USA.
- [26] **Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L.**, 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry,53,1841 1856.
- [27] **Roginsky, V. And Lissi, E. A.**, 2005. Reviews of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92,235 254.
- [28] **Prakash, A.**, 2001. Antioxidant activity. Medallion Laboratories Analytical Progress.19(2); www.medlabs.com/file.aspx.
- [29] **Apak, R.**, 2005. Gıda maddelerinde toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri arasında Cu(II) indirgeyici antioksidan kapasite CUPRAC XIX. Ulusal Kimya Kongresi, Kuşadası, 30 Eylül -4 Ekim.
- [30] **Mathew, S. and Abraham, T. E.**, 2006. Studies on the antioxidant activities of cinnamon bark extracts, through various in vitro models, Food Chemistry.94,520-528

- [31] **Burcu, Hülya**, Bazı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinde Farklı Gelişme Dönemlerinde Tanelerdeki Organik Asit Dağılımı, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta, 2004.
- [32] **Kristiansen B., Matthey M., Linden J.**, “Citric Acid Biotechnology”, Taylor & Francis, London, 1999, 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Ebru ÇEVİK

Doğum Yeri ve Tarihi: Üsküdar , 06.11.1988

E-Posta: ebrucevik29@hotmail.com

Lisans: Kimya

Yüksek Lisans: Kimya

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- Çevik, E., Uzaşçı, S., Erim, F. B., Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Meyve Sularının Organik Asit İçeriklerinin İncelenmesi, *Ulusal Analitik Kimya Kongresi*, 03-07 Eylül, 2012 Hatay, Türkiye.