

**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞARAPLARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE KÜKÜRT DİOKSİT  
VE TOPLAM ANTİOKSİDAN TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selda ALVAN**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**ŞUBAT 2015**



**İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞARAPLARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLERLE  
KÜKÜRDTİOKSİT VE ANTİOKSİDAN TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selda ALVAN  
(509091057)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Kimya Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK**

**ŞUBAT 2015**



İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509091057 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Selda ALVAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**ŞARAPLARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE KÜKÜRTDİOKSİT VE TOPLAM ANTİOKSİDAN TAYİNİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :**      **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri :**              **Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ** .....  
İstanbul Üniversitesi

**Doç. Dr. Gülçin GÜMÜŞ YILMAZ** .....  
İstanbul Teknik Üniversitesi

**Teslim Tarihi :**              **15 Aralık 2014**  
**Savunma Tarihi :**          **06 Şubat 2015**



*Anneme ve Babama,*





## ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve deneyimi ile bana yol gösteren ve her türlü olanağı sunan değerli hocam Sayın Prof. Dr.Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e gösterdiği her türlü destek, anlayış ve sabrından dolayı en içten dileklerle teşekkür ederim.

Laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında gerek deneysel çalışmalarda gerekse tezin yazım aşamasında fikirlerini, desteğini ve yardımını hiçbir zaman eksik etmeyen, tecrübelerinden faydalandığım Dr.Dilek ÖZYURT'a

Bu çalışmanın bu hale gelmesini üstün sabır, anlayış ve maddi manevi desteklerine borçlu olduğum, yaşamım boyunca beni her konuda destekleyen, her zaman moral kaynağım olan annem Şükriye ALVAN babam Hasan ALVAN ve ablam Şirin ÇOLAKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞUBAT 2015

SELDA ALVAN  
Kimyager



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ŞARAPLARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE KÜKÜRTDİOKSİT VE TOPLAM ANTİOKSİDAN TAYİNİ.....	xvii
ÖZET.....	xvii
DETERMINATION OF SULPHUR DIOXIDE AND ANTIOXIDANTS IN WINE BY SPECTROSCOPIC METHODS.....	xix
SUMMARY.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BÖLÜM.....	3
2.1 Gıdalarda Kükürt Dioksit Kullanımı.....	3
2.1.1 Kükürt dioksitin şıra ve şaraptaki kullanımı.....	3
2.1.2 Kükürt dioksitin şıra ve şaraptaki etkileri.....	6
2.1.2.1 Mikroorganizmalar üzerine etkisi.....	6
2.1.2.2 İndirgeyici etkisi.....	6
2.1.2.3 Durultucu ve çözündürücü etkisi.....	7
2.1.2.4 Toksik etkisi.....	7
2.1.3 Şıra ve şarapta kullanılan kükürt dioksit miktarları.....	7
2.1.4 Kükürt dioksit yerine kullanılacak maddeler.....	8
2.2 Kükürt Dioksit Analizi ile İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar.....	9
2.3 Antioksidanlar.....	10
2.4 Literatürde Yer Alan, Toplam Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	12
2.4.1 TEAC (trolloks eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi.....	12
2.4.2 FRAP ( Fe <sup>3+</sup> indirgeyici antioksidan kapasite ) yöntemi.....	13
2.4.3 CUPRAC ( Cu <sup>2+</sup> indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi.....	13
2.4.4 DPPH yöntemi.....	14
2.4.5 CERAC (Seryum iyonunu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi.....	14
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	15
3.1 Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasal Maddeler.....	15
3.2 Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması.....	15
3.3 Şarap Örneklerinin Hazırlanması.....	16
3.4 Örneklerden Kükürt Dioksitin Uzaklaştırılması.....	16
3.5 Uygulanan Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	16
3.5.1 Modifiye CERAC ( seryum indirgeme antioksidan kapasite ) yöntemi.....	16

3.5.2	CUPRAC (Cu <sup>2+</sup> indirgeyici antioksidan kapasite ) yöntemi .....	17
3.6	SO <sub>2</sub> Tayin Yöntemleri .....	17
3.6.1	Moleküler absorpsiyon metodu (GFAAS) ile.....	17
3.6.2	TAC yöntemleri ile .....	18
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>19</b>
4.1	Troloks'un TAC Yöntemleri İle Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi .....	19
4.1.1	CERAC yöntemi .....	19
4.1.2	CUPRAC yöntemi.....	20
4.2	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 'in TAC yöntemleri ile kalibrasyon grafiklerinin çizimi .....	21
4.2.1	CERAC yöntemi .....	22
4.2.2	Modifiye CERAC yöntemi ile .....	23
4.2.3	CUPRAC yöntemi.....	24
4.3	Moleküler Absorpsiyon yöntemi (GFAAS ile) .....	25
4.3.1	Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi.....	25
4.3.1.1	Moleküler absorpsiyon metodu için uygun lambanın bulunması .....	25
4.3.1.2	Asit etkisi .....	26
4.3.1.3	Sıcaklık etkisi.....	26
4.3.2	Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi.....	28
4.4	SO <sub>2</sub> 'nin reçinede tutulması ve geri kazanımı .....	29
4.5	Şarap Örneklerinin TAC Tayini .....	30
4.5.1	Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile analizi .....	30
4.5.2	Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile analizi .....	31
4.6	Reçineden Geçirilmiş Şarap Örneklerinin TAC Tayini .....	31
4.6.1	Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile analizi .....	32
4.6.2	Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile analizi .....	32
4.7	Şarap Örneklerinde Moleküler Absorpsiyon Yöntemi ile SO <sub>2</sub> Tayini... 33	
<b>5.</b>	<b>SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....</b>	<b>35</b>
	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>39</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>43</b>

## KISALTMALAR

<b>ABTS</b>	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
<b>CERAC</b>	: Seryum(IV) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
<b>Cu(II)-Nc</b>	: Bakır(II)-Neokuproin
<b>Cu(I)-Nc</b>	: Bakır(I)-Neokuproin
<b>CUPRAC</b>	: Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
<b>DPHH</b>	: 2,2-difenilpikrilhidrazil(DPPH: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)
<b>FRAP</b>	: Femir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü
<b>TAC</b>	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
<b>TEAC</b>	: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
<b>BHA</b>	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
<b>TBHQ</b>	: Tersiyer Bütil Hidrokinon
<b>GFAAS</b>	: Grafit fırınlı Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

<b>Çizelge 3.1</b> :GFAAS ile kükürt dioksit analizi için deneysel koşullar (Se katot lambası, $\lambda = 204 \text{ nm}$ , $0,05 \text{ M HNO}_3$ ). ....	18
<b>Çizelge 4.1</b> :CERAC yöntemi ile troloks için elde edilen absorbens değerleri. ....	19
<b>Çizelge 4.2</b> :CUPRAC yöntemi ile troloks için elde edilen derişeme bağlı absorbens değerleri. ....	21
<b>Çizelge 4.3</b> :CERAC yöntemi ile $\text{Na}_2\text{SO}_3$ için elde edilen absorbens değerleri. ....	22
<b>Çizelge 4.4</b> :Modifiye CERAC yöntemi ile $\text{Na}_2\text{SO}_3$ için elde edilen absorbens değerleri. ....	23
<b>Çizelge 4.5</b> :Modifiye CERAC yönteminde $\text{SO}_2$ 'nin etkisi ( $C_{Ce} = 2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ). ...	24
<b>Çizelge 4.6</b> :CUPRAC yöntemi ile $\text{Na}_2\text{SO}_3$ için elde edilen absorbens değerleri. ...	24
<b>Çizelge 4.7</b> :GFAAS'de farklı oyuk katot lambaları kullanılarak kükürt dioksit için elde edilen kalibrasyon denklemleri. ....	25
<b>Çizelge 4.8</b> : $\text{HNO}_3$ derişiminin $\text{SO}_2$ nin moleküler absorpsiyonuna etkisi (Se katot lambası, $\lambda=204,0 \text{ nm}$ , Slit Genişliği= $0,50 \text{ nm}$ , $C_{\text{Na}_2\text{SO}_3}=600 \text{ mg/L}$ ). ...	26
<b>Çizelge 4.9</b> :GFAAS ölçümleri için farklı sıcaklıklarda uygulanan fırın programı (Se katot lambası, $\lambda=204,0 \text{ nm}$ , $0,05 \text{ mol/L HNO}_3$ ). ....	27
<b>Çizelge 4.10</b> : $\text{SO}_2$ derişimlerine karşılık okunan absorbens değerleri (Se katot lambası, $0,05 \text{ M HNO}_3$ ). ....	28
<b>Çizelge 4.11</b> :Anyon değiştirici reçineden geri alınan sodyum sülfid ( $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ). ....	30
<b>Çizelge 4.12</b> : $\text{SO}_2$ uzaklaştırılmamış şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri. ...	30
<b>Çizelge 4.13</b> : $\text{SO}_2$ uzaklaştırılmamış şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri. ...	31
<b>Çizelge 4.14</b> : $\text{SO}_2$ uzaklaştırılmış şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri. ....	32
<b>Çizelge 4.15</b> : $\text{SO}_2$ uzaklaştırılmış şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri. ...	33
<b>Çizelge 4.16</b> :Şarap örneklerinde GFAAS ile $\text{SO}_2$ analizi. ....	33
<b>Çizelge 5.1</b> :Kükürt dioksit için troloks eşdeğer katsayısı. ....	35
<b>Çizelge 5.2</b> :İyon değiştiriciden geçirilmeden ve geçirilerek hazırlanan şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen $\text{molL}^{-1}$ troloks değerleri arasındaki farktan $\text{SO}_2$ miktarının hesaplanması. ....	36
<b>Çizelge 5.3</b> :İyon değiştiriciden geçirilmeden ve geçirilerek hazırlanan şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol/L troloks değerleri arasındaki farktan $\text{SO}_2$ miktarının hesaplanması. ....	36

**Çizelge 5.4** :Şarap örneklerindeki kükürt dioksitin GFAAS, CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile bulunan değerleri. ....37



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1: Şarapta kükürt dioksitin değişik durumları. ....	5
Şekil 2.2: Kükürt dioksit üzerine pH'nın etkisi (25° C). ....	5
Şekil 4.1: CERAC yöntemi ile çizilen troloksun kalibrasyon grafikleri. *küçük grafik modifiye CERAC yöntemine aittir. ....	20
Şekil 4.2: CUPRAC yöntemi ile çizilen troloksun kalibrasyon grafiği. ....	21
Şekil 4.3: CERAC yöntemi ile çizilen Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 'in kalibrasyon reaksiyon grafiği. ....	22
Şekil 4.4: Modifiye CERAC yöntemi ile çizilen Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 'in kalibrasyon grafiği. ....	23
Şekil 4.5: CUPRAC yöntemi ile çizilen Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 'in kalibrasyon grafiği. ....	25
Şekil 4.6: SO <sub>2</sub> 'nin GFAAS kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği. ....	29



## ŞARAPLARDA SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLE KÜKÜRTDİOKSİT VE TOPLAM ANTIOKSİDAN TAYİNİ

### ÖZET

Bir çok meyve, sebze ve içecekler farkı çeşitlerde antioksidan içerirler.Örneğin vitaminler (E ve C), flavonoidler, karotenoidler. Antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklar, kanser, ve yaşa bağlı olarak dejeneratif dönüşümlere karşı koruma sağlarlar. Son yıllarda antioksidant dışında gıdalara birçok katkı maddesi katılmaya başlanmıştır. Bunlardan biriside kükürtdioksittir.

Kükürtdioksit ve çeşitli formları mikroorganizmaların büyümeleri kontrol etmek, yapay antioksidant olarak, enzim-kataliz reaksiyonlarını inhibe etmek için gıdalara katılır. SO<sub>2</sub>'nin yararı ise yiyeceklerin korunmasında kullanılır. Özellikle şaraplarda kükürtdioksit, zararlı mikroorganizmaların (sirke bakteri-yabani maya gibi) gelişmesini, şarabın oksidasyonunu ve esmerleşmesini engellemek amacıyla kullanılır. Ne kadar antioksidan gibi davranırsa fazlası çeşitli zararlara neden olur. Aşırı kullanım durumunda ise insanda baş ağrısı ve bazı alerjik durumlara yol açabilir.Bu yüzden bütün yiyeceklerde SO<sub>2</sub> miktarında sınırlama getirilmiştir.

Çalışmamızın amacı CERAC yöntemine interfere etkisi olan SO<sub>2</sub> molecular atomic absorpsiyon yöntemiyle tayin etmek ve sonra şarapların gerçek antioksidan kapasitelerini bulmaktır. Molecular absorpsiyon metodunda P.Parvinen, L.H.J.Lajunen and K.Wieczorek-Ciurowa'nın yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır. Bu çalışmada grafit fırın kullanarak SO<sub>2</sub>'nin moleküler absorpsiyonu ölçülmüş. Birçok katod lambasıyla çalışılmışlar (Mo,Ni,Ag,As) ve en uygun olanı As(206,98) katod lambasını kullanmışlar. Biz de çalışmamızda SO<sub>2</sub>'nin molecular absorpsiyonu için bir çok lamba ile çalışıldıktan (Mg,Se,Sb,As) sonra en uygun olan Se katod lambası kullandık. Daha sonra yöntemin doğruluğunu kanıtlamak için Cl formunda DOWEX X4 anyonik reçine kullanılarak SO<sub>2</sub> leri HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> şeklinde tutturularak atomik absorpsiyon yöntemiyle tayin ettik.En sonra çalışmamız ise reçineden geçirilmiş ve geçirilmemiş örneklerle CERAC ve CUPRAC yöntemleri uyguladık.Böylece her iki yönteminde birbirine yakın değerler verdiğini gözlemedik.



## **DETERMINATION OF SULPHUR DIOXIDE AND ANTIOXIDANTS IN WINE BY SPECTROSCOPIC METHODS**

### **SUMMARY**

Antioxidants ; Substances which prevent or delay oxidation of proteins, lipids, carbohydrates and DNA that in the living cells are named antioxidants. Because of decreasing properties of abnormalities and forming tumors, it provides life which has minimum effect of ageing. There is a lot of different substances which have antioxidant properties. These substances can be taken from outside and can produce by body for defense system according to the free radicals. These antioxidants are enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and SOD (superoxide dismutase). Antioxidants are widely used in dietary supplements and have been investigated for the prevention of diseases such as cancer, coronary heart disease and even altitude sickness. Although initial studies suggested that antioxidant supplements might promote health, later large clinical trials with a limited number of antioxidants detected no benefit and even suggested that excess supplementation with certain putative antioxidants may be harmful. Antioxidants also have many industrial uses, such as preservatives in food and cosmetics and to prevent the degradation of rubber and gasoline. As fruits, vegetables and beverages contain different varieties of antioxidant compounds such as vitamins (especially vitamins C and E), flavonoids and carotenoids, a diet rich in these is assumed to offer protection against cardiovascular diseases, cancer and age-related degenerative transformations.

Total Antioxidant Capacity Determination Methods in Literature as below

TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) Method ; Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) measures the antioxidant capacity of a given substance, as compared to the standard, Trolox. is based on the suppression of the absorbance of radical cations of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS) by antioxidants in the test sample when ABTS incubates with a peroxidase (metmyoglobin) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reaction mixture containing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µmol/L), metmyoglobin (6.1 µmol/L), ABTS (610 µmol/L), and Trolox (concentration range, 0–1.65 µmol/L) was incubated and subjected to spectrophotometry. The formation of ABTS radicals increased in proportion to the incubation period until a plateau was achieved after 30 min. The higher the concentration of Trolox used in the reaction mixture, the more the absorbance of ABTS radicals was suppressed.

FRAP ( Ferric Reducing Ability Plasma) Method; The FRAP assay was done according to Benzie and Strain (1996) with some modifications. The stock solutions included 300mM acetate buffer (3.1 g C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> 3H<sub>2</sub>O and 16mL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), pH 3.6, 10mM TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) solution in 40mM HCl, and 20mM FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O solution. The fresh working solution was prepared by mixing 25mL acetate buffer, 2.5mL TPTZ solution, and 2.5mL FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O solution and then warmed at 37°C before using. Fruit extracts (150mL) were allowed to react with 2850 mL of the FRAP solution

for 30 min in the dark condition. Readings of the colored product [ferrous tripyridyltriazine complex] were then taken at 593 nm. The standard curve was linear between 25 and 800 mM Trolox. Results are expressed in mM TE/g fresh mass. Additional dilution was needed if the FRAP value measured was over the linear range of the standard curve.

CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity) Method ; The “parent” CUPRAC (CUPRIC Reducing Antioxidant Capacity) method of antioxidant measurement, introduced by our research group to world literature, is based on the absorbance measurement of Cu(I)-neocuproine (Nc) chelate formed as a result of the redox reaction of chain-breaking antioxidants with the CUPRAC reagent, Cu(II)-Nc, where absorbance is recorded at the maximal light absorption wavelength of 450 nm; thus this is an electron-transfer (ET)-based method.

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Method ; The DPPH assay was done according to the method of Brand-Williams et al. (1995) with some modifications. The stock solution was prepared by dissolving 24 mg DPPH with 100 mL methanol and then stored at 20°C until needed. The working solution was obtained by mixing 10mL stock solution with 45mL methanol to obtain an absorbance of 1.170.02 units at 515 nm using the spectrophotometer. Fruit extracts (150 mL) were allowed to react with 2850 mL of the DPPH solution for 24 h in the dark. Then the absorbance was taken at 515 nm. The standard curve was linear between 25 and 800 mM Trolox. Results are expressed in mM TE/g fresh mass. Additional dilution was needed if the DPPH value measured was over the linear range of the standard curve.

CERAC (Cerium Reducing Antioxidant Capacity) Method ; A Ce(IV)-based reducing capacity (CERAC) assay was developed to measure the total antioxidant capacity (TAC) of foods, in which Ce(IV) would selectively oxidize antioxidant compounds but not citric acid and reducing sugars. The redox potential of the Ce(IV) oxidant was fine-tuned in 0.3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> +0.7M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous medium for selective oxidation. In the classical Ce(IV)-based assay for which the name CERAC was proposed, the presence of citric acid (at 1.5×10<sup>-5</sup>M) caused approximately 25% reduction in Ce(IV) (at 2.0×10<sup>-4</sup>M) recovery, whereas in the present method, the presence of citric acid (at 1.0×10<sup>-4</sup>M) caused negligible error in the TAC measurement of quercetin. The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values in the order of quercetin>rutin>gallic acid>catechin>caffeic acid≥ferulic acid>naringenin>naringin>trolox≥ascorbic acid were established with the proposed method and were found to be compatible with those found with other antioxidant assays. It is noteworthy that naringin and rutin were also hydrolyzed in the acidic medium of the method so as to exert their full antioxidant capacity not measured by other TAC assays. The proposed TAC assay with Ce(IV) is simple, low-cost, rapid, and can be easily applied in modestly equipped conventional laboratories.

In recent years there has been much publicity given to consumer concerns about the addition of chemicals to food. One area of concern is the interaction between additives and the possible health risks or joint effects of the cocktail of additives that is consumed each day. Sulphur dioxide, in its various forms, is added to food to inhibit and control the growth of microorganisms, to inhibit enzyme-catalysed reactions, to inhibit non-enzymic browning, and to act as an antioxidant and reducing agent. By providing stabilizing and conditioning functions, it improves the appearance and maintains the quality of foods and wines. However, it has drawn much attention recently because of its allergenic effect on those individuals who are

hypersensitive. Nowadays, many countries have set strict limits on the residual amount of sulphur dioxide in different types of food. Therefore, sulphur dioxide content of wine should be precisely determined along with their total antioxidant content.

The aim of this work was to measure the CERAC antioxidant capacity and sulphur dioxide amount of wine samples. There are an interference effect of sulphur dioxide on the CERAC method. Therefore, sulphur dioxide in wine samples was established with molecular atomic absorption method. For this purpose, several hollow cathode lamps (As, Se, Sb, Mg) were used and as a result of in this study, Se, which was used hollow cathode lamp at a wavelength of 204 nm, was chosen for the analysis of sulfur dioxide. molecular atomic absorption method were used to determination of sulphur dioxide in the sulphited wine samples and antioxidant capacities of the same samples were analysed by CERAC and CUPRAC. Real antioxidant capacity of wine samples were found subtracting the quantity of interferent sulphur dioxide. CERAC (Ceric ion reducing antioxidant capacity) assay, is based on the room temperature - oxidation of antioxidant compounds with Ce(IV) sulfate in dilute sulfuric acid solution, and measuring the absorbance of unreacted Ce(IV) at 320 nm. CUPRAC method was used for determining the sulphite levels of sulphited wine samples by prior separation of monohydrogensulphite at pH 3 on an anion exchanger followed by spectrophotometry. The desulphited wine solutions were analysed for their antioxidant content by CUPRAC. The CERAC method results were highly reproducible, and correlated well with those of CUPRAC. Turkish wines generally showed higher antioxidant capacity than those reported in the literature from other varieties of different geographical origin.





## 1. GİRİŞ

XIX. yüzyılın başlarında sanayi devriminin başlaması ile hızlı sanayileşmenin sonucu olarak yer altı ve yer üstü kaynakları hızla kirletilmiştir. Özellikle atmosfere salınan zararlı gazlar ozon tabakasının incelmesinde büyük rol oynamıştır. Ozon tabakasının incelmeye güneş ışınlarının zararlı etkilerini beraberinde getirmiştir. Bunun yanında kimya sanayinin gelişmesi ile çeşitli alanlarda kullanılan herbisit ve peptisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar gibi ürünler üretilmeye başlanmıştır. Bu da somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldıran ve insanlarda kanser, hızlı yaşlanma, kalp hastalıkları gibi zararlı etkileri olan serbest radikallerin oluşumunu arttırmıştır. Günümüzün en ciddi sağlık sorunlarını da beraberinde getirmiştir [1].

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girebilen bu moleküllere ‘oksidan moleküller’ veya ‘reaktif oksijen’ de denmektedir. Bu radikaller hücredeki diğer moleküllerle kolayca etkileşime girerek oksidatif stres meydana getirirler. Serbest radikaller normal hücresel metabolizma sırasında oluşabileceği gibi çeşitli dış etkenler aracılığı ile de meydana gelebilir. Oksidatif stres, organizmadaki pro-oksidan ve anti-oksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Radikaller; lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi temel hücresel bileşenlerde hasara yol açabilme özelliğine sahiptirler [2].

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere “antioksidan” adı verilir. Bir çok meyve, sebze ve içecekler farklı çeşitlerde antioksidan içerirler. Örneğin vitaminler (özellikle E ve C ), flavonoidler, karotenoidler. Antioksidanlar gıdalarda lipid oksidasyonunu önleyen veya geciktiren yapıda bileşiklerdir. Bunlar, serbest radikal yakalayıcısı, oksijen tutucu ve şelat ajanı olarak görev yaparlar. Gıdalarda lipid oksidasyonunun tümüyle önlenmesi mümkün olmamakla birlikte raf ömrünü uzatırlar ve besin maddelerinden oksidasyona duyarlı olanları da koruduklarından gıda kalitesinde bir anlamda yükselmiş olmaktadır. Antioksidanların yağlarda lezzet

ve kaliteyi geliştirdikleri, ilerlemiş düzeydeki oksidatif acılaşmayı veya herhangi bir nedenle oluşmuş tat bozukluklarını giderebildikleri, mikrobiyal bozulmayı, ketonik ve hidrolitik acılaşmayı önledikleri gibi yanılırlara dūřmemek gerekmektedir. Ayrıca antioksidanın etkisini tam olarak gösterebilmesi için mümkün olduğunca acılaşmanın ilk kademesinde hatta acılaşma başlamadan önce ilave edilmeleri gereklidir. Antioksidan, besinlerdeki vitamin A, vitamin C, vitamin E, vitamin B2, vitamin B6, folik asit, selenyum, çinko antioksidanların sistemlerinin etkisini artırır. Görüldüđü gibi en çok sebze, meyve, kurubaklagil, soğan, sarımsak ve kuruyemişlerde bulunur. Antioksidanlar kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve yařa bağlı olarak dejeneratif dōnüřümlere karşı koruma sağlarlar. Son yıllarda antioksidan dışında gıdalara birçok katkı maddesi katılmaya başlanmıştır. Bunlardan biriside kükürt dioksittir.

Kükürtleme maddeleri şarapılıktaki mısırdan nişasta üretiminde sofralık üzümün bakteri ve küf tesiriyle ürümlerinin önlenmesinde reel ve benzeri ürünlere işlenecek olan meyvelerin muhafazasında kurutulmakta olan meyve ve sebzelerde mikrobiyal kontrolünde kullanılır. Kükürt dioksit ( $SO_2$ ) ve çeşitli formları, mikroorganizmaların büyümlerini kontrol etmek, enzim-kataliz reaksiyonlarını inhibe etmek için gıdalara katılır. Özellikle şaraplarda kükürt dioksit, zararlı mikroorganizmaların (sirke bakteri-yabani maya gibi) gelişmesini, şarabın oksidasyonunu ve esmerleşmesini engellemek amacıyla kullanılır. Ne kadar antioksidan gibi davranırsada fazlası çeşitli zararlara neden olur. Aşırı kullanım durumunda ise insanda baş ağrısı ve bazı alerjik durumlara yol açabilir. Bu yüzden bütün yiyeceklerde  $SO_2$  miktarında sınırlama getirilmiştir [3].

Çalışmamızın amacı şaraplardaki kükürt dioksit miktarının geliştirilen moleküler atomik absorpsiyon yöntemi ile GFAAS kullanılarak tayin etmek ve CERAC yöntemine interfere etkisi olan kükürt dioksidin şarap örneklerinden uzaklaştırılarak gerçek antioksidan kapasitelerini bulmaktır. Bu amaç doğrultusunda DOWEX X4 anyonik reçine kullanılarak kükürt dioksit,  $HSO_3^-$  anyonu şeklinde reçinede tuturulmuş ve şarap örneklerinden  $SO_2$  uzaklaştırıldı. Çalışmamızda reçineden geçirilmiş ve geçirilmemiş örneklere CERAC ve CUPRAC yöntemleri uygulayarak örneklerin gerçek antioksidan kapasiteleri hesaplandı.

## **2. GENEL BÖLÜM**

### **2.1 Gıdalarda Kükürt Dioksit Kullanımı**

Kükürt dioksit ve çeşitli formları mikroorganizmaların büyümeleri kontrol etmek, yapay antioksidan olarak, enzim-kataliz reaksiyonlarını inhibe etmek için gıdalara katılır. SO<sub>2</sub>'nin yararı ise yiyeceklerin korunmasında kullanılır. Özellikle şaraplarda kükürt dioksit, zararlı mikroorganizmaların (sirke bakteri-yabani maya gibi) gelişmesini, şarabın oksidasyonunu ve esmerleşmesini engellemek amacıyla kullanılır.

Gıda sanayinde yaygın kullanım alanına sahip olan kükürt dioksit sağlığa zararlı bir maddedir. Bu nedenle kükürt dioksitin bilinçli olarak kullanılması gerekir. Şarapla ilgili yasal düzenlemeler ve standartlarda kükürt dioksit miktarına sınırlamalar getirilmiştir. Kükürtlemede amaç mümkün olduğunca az kükürt dioksit kullanarak en yüksek yararı sağlamak olmalıdır. Kükürt dioksitin bilinçli bir şekilde kullanılabilmesi öncelikle şaraptaki etkilerinin bilinmesine ve kullanılacak kükürt dioksitin miktarının buna göre belirlenmesine bağlıdır. Ayrıca ham maddenin özellikleri, iklim koşulları, kullanılan araç ve gereçlerin durumu, elde edilmek istenen şarap tipi gibi çeşitli faktörler de kullanılacak kükürt dioksit miktarı üzerinde etkili olur.

#### **2.1.1 Kükürt dioksitin şıra ve şaraptaki kullanımı**

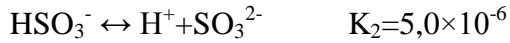
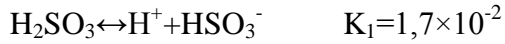
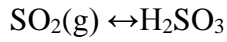
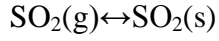
Şarapçılıkta kükürt dioksitin kullanımı ortaçağa kadar dayanmaktadır. Kükürt dioksitin Romalılar zamanında şarabın stabilizasyonunda ve kapların dezenfeksiyonunda kullanıldığı bilinmektedir [4].

Üzümün şaraba dönüşmesinde şarabın, olgunlaştırılmasında, şarap hastalık ve kusurlarının önlenmesinde kükürt dioksitin çok büyük rolü vardır [5].

Şarap teknolojisinde sağlam, kusursuz, kaliteli bir şarap üretimi için şıradan başlayıp tüketime hazır oluncaya kadar her aşamada uygun ve yeterli miktarda kükürt dioksitin kullanılması gerekir. Öte yandan şarapçılıkta kükürt dioksitin yerine geçebilecek başka bir madde henüz bulunamamıştır. İndirgen bir madde olan

askorbik asit (C vitamini) ancak kükürt dioksitin etkisini destekleyici bir rol oynar ve yalnız başına kükürt dioksitin yerini tutamaz [4].

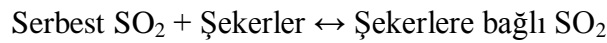
Şıra veya şaraba ilave edilen kükürt dioksit olduğu gibi yani SO<sub>2</sub> halinde kalmamaktadır. Bir kısmı serbest halde bir kısmı da şıra veya şaraptaki bazı maddelere bağlanmaktadır. SO<sub>2</sub> sulu ortamda çözüldüğünde çeşitli haller arasında bir denge oluşmaktadır [4].



Öncelikle SO<sub>2</sub> su içerisine sülfüroz asit (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) halindedir. Sülfüroz asit dissosiyasyon olarak, bir H<sup>+</sup> verip, bisülfid (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) haline dönüşmektedir. Bisülfid de bir H<sup>+</sup> vererek sülfid iyonlarına (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) dissosiyasyon olmaktadır. Bu eşitliklerde SO<sub>2</sub>'in tüm formları serbest kükürt dioksit olarak bilinir.

Öte yandan kükürt dioksit ortamda bulunan aldehit, şekerler, pektik maddeler, dekstrin, protein ve ketonlarla reaksiyona girerek bağlanmaktadır. Kükürt dioksitin bu durumuna da bağlı kükürt dioksit adı verilmektedir [6].

Şekerlere bağlı olanlar: şeker miktarı arttıkça bu haldeki SO<sub>2</sub> miktarı da artar. Tepkime geri dönüşümlüdür. Şeker miktarı azaldıkça SO<sub>2</sub> serbest hale geçebilir.

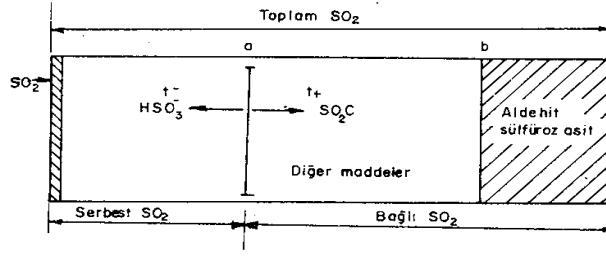


Asetaldehide bağlı olanlar: Tepkime geri dönüşümsüzdür. Tepkime sonucu aldehit sülfüroz asit oluşur.



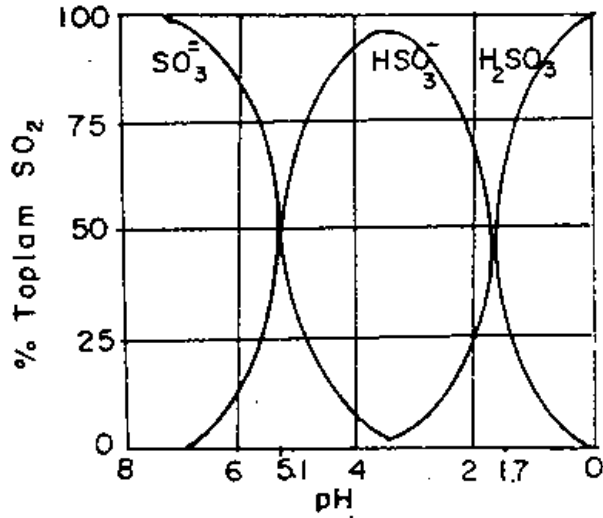
Toplam kükürt dioksit, serbest ve bağlı haldeki kısımlardan oluşur. Kükürt dioksitin şaraptaki değişik durumları Şekil 1'de görüldüğü gibi şematize edilmiştir. Sağdaki taraflı kısım asetaldehide bağlı SO<sub>2</sub> oranını göstermektedir. SO<sub>2</sub>'nin serbest aldehide bağlanmasıyla dissosiyasyon sabiti daha düşük olan ve stabil özellik gösteren aldehit sülfüroz asit oluşur. Aynı tip şaraplar için "b" değeri sabittir. SO<sub>2</sub>'in diğer maddelere (şekerler, ketonlar) bağlanmasıyla dissosiyasyon sabiti yüksek ve daha az stabil olan bileşikler oluşmaktadır. Soldaki taraflı kısım sülfüroz asit oranını

göstermektedir. Aynı tip şaraplar için ‘‘a’’ değeri sıcaklığa bağlı olarak azalır veya çoğalır.



Şekil 2.1: Şarapta kükürt dioksit değişik durumları.

Kükürt dioksit ilave edilen şarapta bağlı ve serbest hallerdeki SO<sub>2</sub> oranları pH'ın etkisi Şekil 2'de gösterilmiştir [4].



Şekil 2.2: Kükürt dioksit üzerine pH'nın etkisi (25° C).

Şekilde görüldüğü gibi pH 1,7'ye kadar ortamda dissosiyeye olmamış sülfüroz asit (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) çoğunluktadır. pH 1,7-5,1 arasında ise bisülfid (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonları fazladır. Bu üç haldeki kükürt dioksit arasında mikrobiyel etkisi en çok olanı dissosiyeye olmamış haldeki sülfüroz asit (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) tir. Bisülfid halindeki kükürt dioksit kısmen etkilidir. Sülfid iyonları ise etkisizdir. Dissosiyeye olmayan kısım pH düşüştükçe artmaktadır. Bu nedenle, asitliği yüksek olan şaraplarda kükürt dioksit daha etkilidir. Cibre fermantasyonu sırasında şıraya ilave edilen kükürt dioksit miktarı arttıkça toplam fenol bileşikleri lökoantosiyen miktarının artması kükürt dioksitin bu maddelerin çözünmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Kükürt dioksitin bu etkisi kabuk, çekirdek ve çöp gibi üzümün katı kısımlarındaki hücreleri öldürüp, bunları daha

geçirgen hale getirmesinin sonucudur. Bu konuda yapılan araştırmalarda kükürt dioksitin toplam fenol bileşikleri ve lökoantosiyanlar yanında antosiyon miktarında arttırdığı ve böylece renk yoğunluğunu etkilediği belirtilmektedir [7].

## **2.1.2 Kükürt dioksitin şıra ve şaraptaki etkileri**

### **2.1.2.1 Mikroorganizmalar üzerine etkisi**

Kükürt dioksitin en önemli etkisi mikroorganizmalar üzerine yaptığı antiseptik etkidir. Kükürt dioksit her türlü bakteri ve küf mantarlarıyla *Mycoderma vini* gibi yabancı mayaların mayaların çoğalma ve çalışmalarına engel olur. Kükürt dioksitin etkisi doğrudan mikroorganizmaların enzim sistemleri üzerinde olmaktadır. Mayalar kükürt dioksite karşı fazla duyarlı olmamalarına karşın, özellikle şarabı hastalandıran asetik asit bakterileri ve laktik asit bakterileri daha duyarlıdır [8]. Katılan kükürt dioksit miktarı arttıkça önce en duyarlı olan bakteriler ölür, daha sonra sivri mayalar (*Kloeckera apiculata*) ve en sonunda eliptik mayalar (*Sacch.ellipsoides*) etkisiz hale gelir [9]. Bakteriler 40-50 mg/L kükürt dioksit karşısında inaktif hale gelirken şarap mayaları 150-400 mg/L kadar dayanabilir. Kükürt dioksit malik asiti parçalayan mikroorganizmaları da etkileyerek malolaktik fermantasyonu geciktirir veya önler [10].

### **2.1.2.2 İndirgeyici etkisi**

İlave edilen kükürt dioksit şırada sülfite veya sülfüroz asit haline geçer ve bunlar da okside olarak sülfat ve sülfirik asit verir. Bu bileşikler diğerlerinden önce ortamdaki kullanılabilir oksijeni bağlar ve böylece şaraptaki oksidasyonu önler [8]. Ortamdaki oksijenin bağlanmasıyla oksidoredüksiyon potansiyeli düşer ve sonuçta ortam indirgeyici bir özellik taşır [11]. Bu etki sonucu şarapların oksidasyonu, oksidazlara bağlı kırılmalar ve asetaldehit tadı önlenir. Oksidasyonun hem tat hem de şarabın rengi bakımından çok büyük önemi vardır. Oksidasyona uğrayan şarabın kendine özgü rengi değişir. Kükürt dioksit renk değişmelerini önlediği gibi oluşan renk kusurlarını da giderir [8]. şarabın renk değiştirmesinin nedeni ise polifenollerin polifenol oksidaz(tirozinaz) ve lakkaz enzimleri tarafından oksidasyona uğratılmasıdır. Bunun sonucunda renk değişir ve şarap kaba bir tat alır. Kükürt dioksit ise bu enzimleri etkisiz hale getirerek oksidasyonu önlemektedir. Bu etkiye antioksidazik etki denir [12].

### **2.1.2.3 Durultucu ve çözüldürücü etkisi**

Kükürt dioksit, fermantasyonu geciktirerek şıradada süspansiyon halinde bulunan maddelerin kendiliğinden çökmesine yardımcı olur. Kükürt dioksitin bu özelliğinden, beyaz şarap yapımında, tortu alma işleminde yararlanılır. Bu işlem sonucunda gerek kaba tortu maddeleri gerekse kükürt dioksitin etkisiyle ölen mikroorganizmalar dibe çöker ve bunlar aktarmayla uzaklaştırılır [4].

### **2.1.2.4 Toksik etkisi**

Kükürt dioksitin şaraplarda bulunmasına izin verilen miktarlarının insan sağlığı üzerine etkisi uzun yıllardan beri tartışma konusu olmuştur. Günümüzde hala içkilerde ve besin maddelerinde bulunan kükürt dioksit miktarının insan organizmasına olan olumsuz etkileri ayrıntılı bir şekilde belirlenememiştir. Bununla birlikte insan organizmasının kükürt dioksite karşı tepkisi kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bazı insanlar günde 4 g sülfite karşı (yaklaşık 50 mg/kg/VA) herhangi bir tepki göstermedikleri halde bazılarında çok düşük dozlarda dahi başağrısı, mide bulantısı, ishal belirtileri görülmektedir [8]. Farelerde LD<sub>50</sub> 3 g/kg'a kadar çıkmıştır. Kükürt dioksitin ADI'si standartlarda 0,7 mg/kg/VA olarak verilmiştir. Bu değere göre kükürt dioksit etkisi düşük toksik maddeler arasında yer almaktadır [4].

### **2.1.3 Şıra ve şarapta kullanılan kükürt dioksit miktarları**

Katılacak kükürt dioksitin ne zaman ve hangi miktarda uygulanacağı konusu büyük önem taşımaktadır. Kükürtlemeyi gelişigüzel değil zamanında yapmak ve aşırıya kaçmadan uygun bir kullanımla amaca ulaşmak gerekir. Şıraya katılacak kükürt dioksit miktarı hammaddenin bileşimine (şeker, asit), olgunluk durumuna ve sağlamlığına (ezik, çürük ve zarar görmüş olup olmadığına) göre değişir. Şaraba katılacaksa şarabın tipine, esmerleşmeye olan eğilimine, bileşimine, yaşma, içerdiği asit miktarına, kabın boyutlarına, depolama sıcaklığına ve diğer çeşitli faktörlere bağlı olarak değişir [4].

Ortamın şeker ve asit içerikleri ve sıcaklığı katılacak SO<sub>2</sub> miktarının etkiler. Şeker içeriği ne kadar yüksek olursa bağlı SO<sub>2</sub> miktarı o ölçüde artar. Sıcaklık yükseldikçe şekerlere bağlanan SO<sub>2</sub> miktarı artar ve aktif haldeki SO<sub>2</sub> miktarı azalır. Asit içeriği arttıkça aktif haldeki SO<sub>2</sub> miktarı artar ve dolaylı olarak etkili olabilecek SO<sub>2</sub> miktarı azalır. Kırmızı şarap yapımında; üzümler sağlam ve sıcaklık düşük ise 30 mg/L,

üzümler oldukça iyi bir durumda ise 50 mg/L, üzümler zarar görmüş ve bozulmuş ise 60-80 mg/L SO<sub>2</sub> katılır. Beyaz ve pembe şarap yapımında 30 mg/L, tatlı şarap yapımında ise 30-50 mg/L SO<sub>2</sub> katılır [8].

Genel olarak şaraplar fermantasyondan sonra birinci aktarmada kuvvetli diğer aktarmalarda daha az kükürtlenir [13].

Şarabın olgunlaşması büyük ölçüde şarapta bulunan serbest SO<sub>2</sub> miktarına bağlıdır. Miktar fazla olursa degüstasyonda algılanır. Az olduğunda ise etkisi olmaz. Genel olarak kırmızı şaraplarda 20-30 mg/L beyaz şaraplarda 30-40 mg/L, tatlı ve likör şaraplarında 60-80 mg/L düzeylerinde serbest SO<sub>2</sub> bulunması önerilir. Olgunlaşma sırasında şaraptaki serbest SO<sub>2</sub> miktarı değişir. Bu nedenle serbest SO<sub>2</sub> miktarının sürekli olarak izlenmesi gerekir. Şişelenmiş şarapların görünüş ve karakterinin korunmasında SO<sub>2</sub>'in büyük rolü vardır. Bu nedenle şişelenecek şarapta belli miktarda SO<sub>2</sub>'in bulunmasına her zaman önem verilmelidir. Şişelenecek şaraplarda dolum sırasında 20-40 mg/L serbest SO<sub>2</sub> bulunması önerilir. Beyaz şaraplarda 20-30 mg/L, kırmızı şaraplarda ise 10-20 mg/L serbest SO<sub>2</sub> yeterlidir. Bir-iki yıl dinlendirilecek şişelerde litrede 40-50 mg, daha uzun yıllar saklanacak olanlarda ise litrede 50-60 mg kadar serbest SO<sub>2</sub> olmalıdır [8].

#### **2.1.4 Kükürt dioksit yerine kullanılabilir maddeler**

Şarapla ilgili yasal düzenlemelerde, şarapta bulunulabilecek kükürt dioksit miktarı giderek azaltılmaktadır. Bu nedenle kükürt dioksitin yerine geçebilecek veya etkisini artırabilecek diğer maddeler önem kazanmaktadır. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda kükürt dioksitin yerine geçebilecek bir maddenin bulunması mümkün olmamıştır. Kullanımına izin verilen maddeler, kükürt dioksitin yerini almaktan çok şarapçılıkta etkisini arttırma ve kullanılan miktarını azaltmaya yöneliktir. Bu maddeler arasında en önemlileri sorbik asit ve askorbik asittir [4]. Sorbik asit toksik değildir ve mayalar üzerine etkili olur. Bunları öldürmez, ancak fermantasyon yeteneklerini bloke eder. Bakteriler üzerinde etkili değildir. Antioksidan özelliği yoktur. Kullanımına izin verilen miktar 200 mg/L'dir. Askorbik asit (C vitamini) ise antioksidan etkisi ile renk ve aroma maddelerini korur ve demirin oksidasyonunu önler. Kullanımına izin verilen miktar 150 mg/L düzeyindedir [13].



## 2.2 Kükürt Dioksit Analizi ile İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar

Sulu çözeltilerde ve atmosferdeki SO<sub>2</sub> tayini için birçok analitik teknikler vardır. Bu yöntemleri spektrofotometrik, kemilüminesans, iyon kromatografi, spektrofotometrik ve potansiyometrik yöntemler olarak sıralayabiliriz [14].

Ripper yönteminde örnek nişasta indikatörlüğünde H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile asitlendirilir ve ardından iyot çözeltisi ile hızla titre edilir. Mavi-siyah renk oluşmasıyla titrasyon sonlandırılır. Ripper metodu az da olsa hatalı sonuçlar verir. Bunun nedeni iyodun şarabın içinde oksitlenebilen (fenol, askorbik asit gibi) maddelerle reaksiyona girmesi iyot tüketiminin artması ve yüksek SO<sub>2</sub> miktarının tayin edilmesine neden olur [15].

Havalandırma/Oksidasyon metodunda ise kükürt dioksit içeren örnek önce asitlendirilir. Daha sonra nitrojen gazı veya hava geçirilerek peroksit içerisine sülfürik asit formunda toplanır. Oluşan sülfürik asit ayarlı sodyum hidroksit ile titre edilerek SO<sub>2</sub> miktarı tayin edilir. Bu metot da Ripper metodunda oluşan iyot-fenol bağlanması gerçekleşmez. Ama yine de çözeltinin asitliği bisülfid, antosiyoninler ve SO<sub>2</sub> bağlı antosiyoninler arasındaki dengeyi bozar. Bu dengenin bozulması antosiyonin bağlı SO<sub>2</sub> lerden serbest SO<sub>2</sub> lerin oluşmasına neden olacağından dolayı SO<sub>2</sub> değerinin normalinden yüksek tayin edilmesine neden olur.

Şarapta akış enjeksiyon sistemi yardımıyla voltametri ile kükürt dioksit tayininde yapılır. Tüm sülfidleri SO<sub>2</sub> ye dönüştürmek için şarap örneği ilk önce asitlendirilir. Örnek ve asit akışı karıştırmaya yarayan Y şeklinde bir dizayn kullanılarak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile asitlendirme gerçekleştirilir. SO<sub>2</sub> nin voltametrik analizinde sulu çözeltide damlayan civa elektrodu ile SO<sub>2</sub> nin elektrokimyasal ayırımında asidik ortamda iki dalga görülmesine rağmen hafif bazik ve nötr ortamda dalga olmadığı gözlenmiştir. Bu yöntemin diğer iyodometrik yöntemlere göre avantajı SO<sub>2</sub> nin doğrudan analiz edilebilmesi ve iyi bir tekrarlanabilirliğinin olmasıdır. (RSD %6 dan daha düşük). Ayrıca bu yöntem 10 mg/L-250 mg/L aralığında iyi bir doğruluk gösterir. Çok yönlü bir yöntem olan bu yöntem meyve suyu ve bira örnekleri için de uygulanabilir [16].

Ametal elementlerin tayini için AAS ile ölçülen moleküler absorpsiyon metodu literatürde yer almaktadır. Bu elementlerin rezonans çizgileri vakum ultraviyole bölgesinde kaldığı için geleneksel AAS metodları ile tayin etmek zordur. 1 cm x 273

cm Vycor tube içeren özel absorpsiyon küveti kullanılarak kükürtü SO<sub>2</sub> olarak tayin edilebilmektedir. Hidrojen boşalım lambası ışık kaynağı olarak kullanılır. SO<sub>2</sub> ultraviole absorpsiyon spektrumunda 320.0-260.9 nm, 230.0-180.0 nm, 158-152 nm arası ve 135.0 nm aşağısı dört banda sahiptir. Yukarıda anlatılan metod'ta alevdeki ölçümler için 207 nm de güçlü absorpsiyon bandı kullanılır. Sonuç olarak SO<sub>2</sub> 200-220 nm arası güçlü moleküler absorpsiyon spektrumuna sahiptir [17].

Bu tez kapsamında kükürt dioksidin AAS ile ölçülen moleküler absorpsiyonuna dayanan tayininde, P.Parvinen, L.H.J.Lajunen and K.Wieczorek-Ciurowa'nın yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır [17]. Grafit fırın kullanarak kükürt dioksitin (SO<sub>2</sub>) moleküler absorpsiyonunun ölçülümünde birçok katod lambasıyla çalışarak (Mo, Ni, Ag, As) en uygun olan As (206,98) katod lambasını kullanmışlar. Bu tezde kükürt dioksitin GFAAS ile ölçülen (SO<sub>2</sub>) moleküler absorpsiyonu için bir çok oyuk katod lamba (Mg, Se, Sb, As) denendikten sonra en uygun olan Se katod lambası analizde kullanıldı.

### **2.3 Antioksidanlar**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan denir [18]. Bu özellikleriyle hücrelerin anormalleşme ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir yaşam sağlarlar. Antioksidan özelliği keşfedilen birçok farklı madde vardır. Bu maddelerin bir kısmını bitkilerden alırken, bir kısmını vücut kendisi, serbest radikallere karşı bir savunma sistemi olarak üretir. Vücudun serbest radikallere karşı savunma olarak ürettiği antioksidanlar; katalaz, glutatyon peroksidaz, ve SOD (süperoksit dismutaz) gibi enzimlerdir [19].

Antioksidanlar gıdalarda lipit oksidasyonunu önleyen veya geciktiren yapıda bileşiklerdir. Bunlar, serbest radikal yakalayıcısı, oksijen tutucu ve şelat ajanı olarak görev yaparlar. Gıdalarda lipit oksidasyonunun tümüyle önlenmesi mümkün olmamakla birlikte raf ömrünü uzatırlar ve besin maddelerinden oksidasyona duyarlı olanları da koruduklarından gıda kalitesinde bir anlamda yükselmiş olmaktadır. İdeal bir antioksidanın sahip olması gereken özellikler şunlardır:

- Kullanımda sağlık açısından bir sakınca olmamalıdır.

- Gıdanın tat, koku veya lezzetini değiştirmemelidir.
- Düşük derişimlerde dahi etkili olmalıdır.
- Gıdaya kolaylıkla karıştırlabilmelidir.
- Fırınlama veya pişirme işlemleri sonrasında dahi aktivitesini sürdürmelidir.
- Fiyatı ucuz olmalıdır.

Antioksidanların yağlarda lezzet ve kaliteyi geliştirdikleri, ilerlemiş düzeydeki oksidatif acılaşmayı veya herhangi bir nedenle oluşmuş tat bozukluklarını giderebildikleri, mikrobiyal bozulmayı, ketonik ve hidrolitik acılaşmayı önledikleri gibi yanılırlara düşmemek gerekmektedir. Ayrıca antioksidanın etkisini tam olarak gösterebilmesi için mümkün olduğunca acılaşmanın ilk kademesinde hatta acılaşma başlamadan önce ilave edilmeleri gereklidir.

Doğal kaynaklı veya sentetik olarak üretilmiş antioksidanlar kimyasal yapılarına göre primer ve sekonder antioksidanlar olarak 2'ye ayrılır. Primer antioksidanlar serbest radikalleri yakalayarak antioksidatif etki sağlarlar. Bunlardan sentetik olanlara BHA, BHT, TBHQ, örnek verilebilir. Doğal antioksidanlardan ise tokoferoller, baharat ekstraktları (karnosik asit), flavanoidler 'Radikal yakalayıcısı' olarak primer antioksidatif aktiviteyi sağlarlar. Askorbatlar ise oksijen yakalayıcısıdır.

Sekonder antioksidanlar olarak bilinen asit şelatları metalleri veya pro-oksidatif etki gösteren metalloproteinleri yakalayarak birincil antioksidanların fonksiyonlarını yerine getirmelerine ve serbest radikalleri yakalamalarına olanak sağlarlar. Bunlardan gıdada kullanımına izin verilen antioksidanlara örnek olarak askorbik, sitrik, tartarik, malik, süksinik asitler ve sodyum trifosfat, pirofosfat verilebilir. Asit şelatı olarak fitik asitin de lipid oksidasyonunu önlediği bilinmektedir. Lesitin ile aminoasitlerin de gıda içerisinde aynı görevi yaptıkları bilinmektedir.

Sebzelerde bulunan en önemli doğal antioksidanlar, C vitamini, E vitamini, karotenoidler, flavanoidlerdir. Doğal antioksidan kaynakları olarak, çay yapraklarının (flavanoidler ve kateşinler), yağlı tohumların (susam), tahılların (pirinç, yulaf), meyve ve sebzeler, yapraklardaki mumsu maddelerin (okaliptüs bitkisinin yaprakları), bitki köklerinin, fıstık kabuğu gibi meyve kabukların, baharatların, deniz yosunlarının, hayvansal ürünlerin, fermente ürünlerin, maillard reaksiyonu ürünlerin, porfirin yapısındaki maddelerin oksidasyonu yavaşlattığı bilinmektedir. Baharatların

esansiyel yağlarından ise antioksidatif özelliğinden daha çok antimikrobiyal etkilerinden yararlanılmaktadır. Yukarıda genel şekilde anlatılmış olan antioksidan özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Başlıca reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki,
- Oksijen uzaklaştırıcı veya derişimini azaltıcı etki,
- Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırıcı etki,
- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi,
- Süpürücü (scavenging) etki: ROS'lerini etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle çevirme (Örneğin: Enzimler.)
- Bastırıcı (quencher) etki: ROS'leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olma (Flavonoidler, vitaminler.)
- Onarıcı (repair) etki,
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: ROS'lerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki [20-32].

## **2.4 Literatürde Yer Alan, Toplam Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler**

### **2.4.1 TEAC (trolox eşdeğer antioksidan kapasite) yöntemi**

TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş daha sonra Re ve arkadaşları tarafından bu yöntem biraz daha geliştirilmiştir [33-35]. Miller'in geliştirmiş olduğu TEAC yönteminde metilmiyoglobinin  $H_2O_2$  ile reaksiyonu sonucu oluşan ferrilmiyoglobin radikallerinin ABTS ile etkileşimi sonucu oluşan  $ABTS^+$  radikallerinin 660 nm, 734 nm ve 820 nm'deki maksimum absorbans değerleri ölçülür.  $ABTS^+$  radikal katyonunun absorbansındaki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi trolox cinsinden bulunur. TEAC; 1mM deneysel örneğin derişimine eşdeğer miktardaki mM trolox derişimine denir

Bu yöntemin dezavantajı, numuneler içindeki antioksidan maddelerin  $ABTS^+$  radikallerini indirgemesi yanında ferrilmiyoglobin radikallerini de indirgeyebilmesidir. Re ve arkadaşları tarafından geliştirilen TEAC yönteminde ise  $ABTS^+$  radikal katyonu,  $ABTS$ 'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu

oluşmaktadır. Bu şekilde hazırlanan ABTS<sup>+</sup> radikali, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda muhafaza edilerek 2 gün boyunca kullanılabilir.

#### **2.4.2 FRAP ( Fe<sup>3+</sup> indirgeyici antioksidan kapasite ) yöntemi**

Benzei ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde düşük pH ortamında Fe<sup>3+</sup>- tripridilazin (Fe<sup>3+</sup>- TPTZ) kompleksi antioksidanların etkisi ile Fe<sup>2+</sup>- tripridilazin (Fe<sup>2+</sup>- TPTZ) kompleksine indirgenir. Oluşan bu kompleksin 593 nm deki absorbansı ölçülür ve örnekler içindeki toplam antioksidan kapasitesi direkt olarak bulunur. FRAP yönteminde prooksidan moleküller veya yükseltgenebilir substratlar kullanılmamıştır.

Canlı metabolizmalarındaki antioksidan kapasitelerinin FRAP yöntemi ile ölçülmesi durumunda, Fe<sup>2+</sup> iyonlarının ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> iyonları ile etkileşmesi (OH) hidroksi radikallerinin oluşmasına sebep olur. Bu nedenle örnek numuneler içindeki antioksidanların Fe<sup>3+</sup>- tripridilazin (Fe<sup>3+</sup>- TPTZ) kompleksini indirgemesi yanında ortamda hidroksi radikalleri ile de etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesi direkt olarak değil indirek olarak ölçülebilir. FRAP yöntemi, prooksidan içermeyen ortamlarda yapılan toplam antioksidan gücünün tayinin de direkt bir yöntem olmasına karşın genel olarak düşünüldüğünde indirekt bir yöntemdir [36].

#### **2.4.3 CUPRAC ( Cu<sup>2+</sup> indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi**

Cu<sup>2+</sup> redüksiyon kapasitesine dayalı toplam antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinden biride CUPRAC yöntemidir. Kromojenik bir redoks reaktifi olan bis(neokuproin)-bakır(II) klorürü kullanan CUPRAC yöntemi ile hem hidrofilik hem de lipofilik toplam antioksidan miktarı kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Bu yöntemde sırasıyla Cu(II) klorür çözeltisi, % 96'lık etil alkolde hazırlanmış neokuproin çözeltisi, amonyum asetat tamponu (pH 7) ve analiz çözeltileri son çözelti hacmi 4,1 mL olacak şekilde ilave edilir. Oda sıcaklığında yarım saat süre sonunda 450 nm'de reaktif körüne karşı absorbans değerleri ölçülür. Tepkime sonunda 2 proton açığa çıkmakta ve Ar(OH)<sub>n</sub> grubu antioksidan bileşikler kinon formlarına dönüşmektedir. Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum gösteren şiddetli renk oluşumuyla birlikte Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Bu reaksiyonda, n-OH grubu içeren antioksidan karakterli bileşikler, 2n-e donör olarak hareket etmektedir [37].

#### 2.4.4 DPPH yöntemi

Bu yöntemde DPPH'nin indirgenmesi ile çözeltinin radikal süpürücü aktivitesi (radical scavenging activity) ölçülür [38]. Bazı saf bileşikler ve buna benzeyen ekstraktların elektron verme yeteneği DPPH'nin metanoldeki mor renkli çözeltisinin renginin kaybolması ile ölçülür. Bu spektrofotometrik metotta DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) radikal olarak kullanılır. Bu radikalın antioksidanlarla reaksiyonu sonucu 517 nm'de azalan absorbansı ölçülerek radikal süpürücü aktivite ölçülür.

DPPH radikal süpürücü aktivitesi örnek derişiminin bir fonksiyonu olarak çizilir. Örnek derişimi arttıkça DPPH radikal süpürücü aktivite artar. Yüksek derişimlerde DPPH radikal süpürücü aktivite bir doygunluk noktasına ulaşır ve bundan sonra aktivite artan derişimle azalmaya başlar. Bu durum ekstraksiyon çözeltisindeki başka maddelerin varlığından kaynaklanmaktadır.

#### 2.4.5 CERAC (Seryum iyonunu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

CERAC yönteminin temelini, Ce(IV) ile antioksidanlar arasındaki redoks reaksiyonu oluşturmaktadır. Sülfat asitli ortamda başlangıçtaki maksimum soğurma dalgaboyundaki (320 nm) absorbans değeri, antioksidanlar ile reaksiyon sonucu azalmaktadır. Absorbsiyonundaki bu azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan miktarı hesaplanmıştır [39].

$$\text{TAC (mmol Troloks/g)} : ((A_0 - A_1)/\epsilon_{\text{Troloks}}) \times V_s / V_0 \times \text{SF} \times V_E / m \quad (2.1)$$

$A_0$ : Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorbansı 320 nm de

$A_1$  : Ölçülen absorbans

$\epsilon_{\text{Troloks}}$  : Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ )

$V_s$  : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

$V_0$  : Örnek hacmi (mL)

SF : Seyreltme faktörü

$V_E$  : Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)

$m$  : Örnek ağırlığı (g)

CERAC yönteminde gıda maddelerine katkı maddesi olarak katılan sitrik asidin Ce(IV) ile reaksiyona girerek Ce(III) oluşumuna neden olarak girişim yaptığı tespit edilmiştir. Bu amaçla Ce(IV)'ün hidroliz ve sülfat kompleksleri oluşturulup redoks potansiyelini düşürmek amacıyla modifiye CERAC yöntemi geliştirilmiştir [40].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1 Kullanılan Araç Gereç ve Kimyasal Maddeler

Troloks, Seryum(IV)sülfattetrahidrat ( $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ ), Sülfürik asit ( $H_2SO_4$ ), Hidroklorik asit (HCl), NitrikAsit ( $HNO_3$ ), Etilalkol ( $C_2H_5OH$ ), Neocuproin (2,9dimethyl,10phenanthroline), Amonyum Asetat ( $NH_4CH_3COO$ ), Bakır(II)Klorür ( $CuCl_2 \cdot xH_2O$ ), Sodyum Sülfat ( $Na_2SO_3$ ), Sodyum Hidroksit (NaOH), Bakır Sülfat ( $CuSO_4$ ), DOWEX 4 CI formunda anyonik reçine kullanıldı. UV-VIS ölçümleri için Varian Cary 100 spektrofotometre ve moleküler absorpsiyon metodu için Varian grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresi kullanıldı.

#### 3.2 Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması

$2,0 \times 10^{-3}$  mol/L ceryum(IV) sulfat çözeltisi; Yaklaşık 0,08086 g  $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$  tartılıp, üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 100 mL'lik balonjojeye aktarıldı. Daha sonra üzerine 16 mL %98 lik  $H_2SO_4$  eklendi ve 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

1,0 mol/L  $Na_2SO_4$  çözeltisi; 71 g  $Na_2SO_4$  tartılıp saf suda çözüldü ve 500 mL balonjojeye aktarılarak saf su ile 500 mL tamamlandı.

$1,0 \times 10^{-3}$  mol/L Troloks; 0,0062 g troloks ( $C_{14}H_{18}O_4$ ) tartılıp 25 mL'lik balonjojeye etanol ile tamamlandı.

$1,0 \times 10^{-2}$  mol/L  $CuCl_2 \cdot H_2O$ ; 0,4262 g  $CuCl_2$  tartılıp suda çözüldü ve 250 mL'lik balonjojeye aktarılarak saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

$7,5 \times 10^{-3}$  mol/L Neokuproin; 0,078 g Nc tartılıp bir miktar etanol ile çözüldükten sonra 50 mL'lik balonjojede etanol ile 50 mL'ye tamamlandı.

1,0 mol/L  $CH_3COONH_4$ ; 19,27 g  $CH_3COONH_4$  tartılıp bir miktar saf su ile çözüldü ve 250 mL'lik balonjojeye aktarılarak saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

1,0 mol/L HCl; 4,6 mL derişik HCl çözeltisinden alınıp saf suyla 50 mL'ye tamamlandı.

0,1 mol/L NaOH; 0,4 gr NaOH tartılıp bir miktar saf su ile çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jodede saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,05 mol/L HNO<sub>3</sub>'lü Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; 0,098 gr Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> tartılıp 2 mL HNO<sub>3</sub> konularak 50 mL'lik balon jodede saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

### 3.3 Şarap Örneklerinin Hazırlanması

Öküzgözü, Boğazkere, Sultaniye ve Öküzgözü-Boğazkere gibi üzüm çeşitlerinden yapılmış şaraplar CERAC ve CUPRAC yöntemleri için 1:20 oranında, reçine için 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.

### 3.4 Örneklerden Kükürt Dioksitin Uzaklaştırılması

DOWEX X4 (20-40 mesh) Cl formunda anyonik reçine yaklaşık 10 cm olacak şekilde 50 mL'lik bürete dolduruldu. Şarap örneklerinin pH'ı 1,0 mol/L HCl ile 3'e ayarlandı. Akış hızı dakikada 1,6 mL olacak şekilde hazırlanan kolondan geçirildi. Alınan eluat kolondan tekrar geçirildi. Bu işlem üç kere tekrarlandı. HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> anyonu şeklinde reçinede tutulan kükürt dioksit 25 mL 0,1 mol/L NaOH ile reçineden geri alındı [41].

### 3.5 Uygulanan Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

#### 3.5.1 Modifiye CERAC ( seryum indirgeme antioksidan kapasite ) yöntemi

1,0×10<sup>-3</sup> mol/L Troloks çözeltilerinden 0,2 mL – 0,7 mL arasında alınıp 1,0 mL Ce(IV) (2,0×10<sup>-3</sup> mol/L) ve 7,0 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,0 mol/L) çözeltilerinden eklenerek toplam hacim 10 mL olacak şekilde saf su ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Ce(IV)'ün maksimum absorbanstaki yaptığı 320 nm dalga boyunda absorbanstaki ölçümleri saf su çözeltilerine karşı alındı. Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorbanstaki şarap örnekleri ile etkileşimi sonrasında azaldığından dolayı Ce(IV)'ün başlangıç ve reaksiyon sonrası ölçülen absorbanstaki arasındaki fark, bitkilerdeki toplam antioksidan miktarının bir ölçüsüdür. Şarap örneklerinin toplam antioksidan kapasitesinin (TAC) hesaplanmasında kullanılan denklem aşağıda belirtilmiştir.

$$TAC: ((A_0 - A_1)/\epsilon_{Troloks}) \times V_s / V_0 \times SF \quad (3.1)$$

A<sub>0</sub>: Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorbanstaki 320 nm de

A<sub>1</sub> : Ölçülen absorbanstaki



$\epsilon_{\text{Troloks}}$  : Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ )

$V_s$  : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

$V_0$  : Örnek hacmi (mL)

SF : Seyreltme faktörü

### 3.5.2 CUPRAC ( $\text{Cu}^{2+}$ indirgeyici antioksidan kapasite ) yöntemi

1,0 mL  $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{CuCl}_2$  + 1,0 mL  $7,5 \times 10^{-3}$  mol/L neokuprain ve 1,0 mL 1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  çözeltisi üzerine 0,1-1,0 mL Troloks eklendi ve son hacim 4,1 mL olacak şekilde saf su ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Cu(I) neokuprain kelatının maksimum absorbans yaptığı 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri alındı. Bu spektrofotometrik metot, antioksidan çözeltisinin, bakır(II)klorür çözeltisi, neokuprainin alkoldeki çözeltisi ve pH 7,0 amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile karıştırılması ve ardından oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının absorbansının 450 nm dalga boyunda okunmasını içerir. TAC değerinin hesaplanmasında kullanılan denklem aşağıda gösterilmiştir.

$$\text{TAC} : ((A)/\epsilon_{\text{Troloks}}) \times V_s / V_0 \times \text{SF} \quad (3.2)$$

A : Cu ( II) - neokuproin çözeltisine örnek ilave edildikten sonra ölçülen absorbans

( $\lambda=450$  nm )

$\epsilon_{\text{Troloks}}$  : Troloksun molar absorpsiyon katsayısı ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ )

$V_s$  : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)

$V_0$  : Örnek hacmi (mL)

SF : Seyreltme faktörü

## 3.6 $\text{SO}_2$ Tayin Yöntemleri

### 3.6.1 Moleküler absorpsiyon metodu (GFAAS) ile

Moleküler absorpsiyon metodunda P.Parvinen, L.H.J.Lajunen ve K.Wieczorek-Ciurowa'nın yapmış olduğu çalışma referans alınmıştır [17]. Bu çalışmada grafit fırın kullanarak kükürt dioksitin ( $\text{SO}_2$ ) moleküler absorpsiyonu, As (206,98) katod lambası kullanılarak ölçülmüştür. Bu tez çalışmasında ise kükürt dioksitin ( $\text{SO}_2$ ) moleküler absorpsiyonu için bir çok lamba (Mg, Se, Sb, As) denendikten sonra Se

katod lambası en uygun lamba olarak seçilmiş ve ölçümlerde bu lamba kullanılmıştır.

**Çizelge 3.1** GFAAS ile kükürt dioksit analizi için deneysel koşullar (Se katot lambası,  $\lambda = 204$  nm, 0,05 M HNO<sub>3</sub>).

<b>Fırın Programı</b>	<b>Sıcaklık (°C)</b>	<b>Süre (sn)</b>
<b>Ön toplama</b>	85 – 110	55
<b>Kurutma</b>	130 – 200	8
<b>Atomlaşma ve Ölçüm</b>	1600	9

### **3.6.2 TAC yöntemleri ile**

Gıda ürünlerinde etiketlerinde koruyucu olarak yer alan SO<sub>2</sub>, bu ürünlere katılan sodyumsülfite ile sağlanır. Sodyumsülfite'in sulu çözeltisi indirgen özellik gösterdiğinden bulunduğu ortamda antioksidan gibi davranır ve toplam antioksidan tayinlerinde pozitif hataya sebep olur. Bu hatanın düzeltilmesi (doğru TAC değerinin belirlenmesi) ve ortamdaki miktarının tayini için yukarıda kullanılan antioksidan tayin yöntemleriyle (CERAC ve CUPRAC) SO<sub>2</sub> analizi yapılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Troloks'un TAC Yöntemleri İle Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi

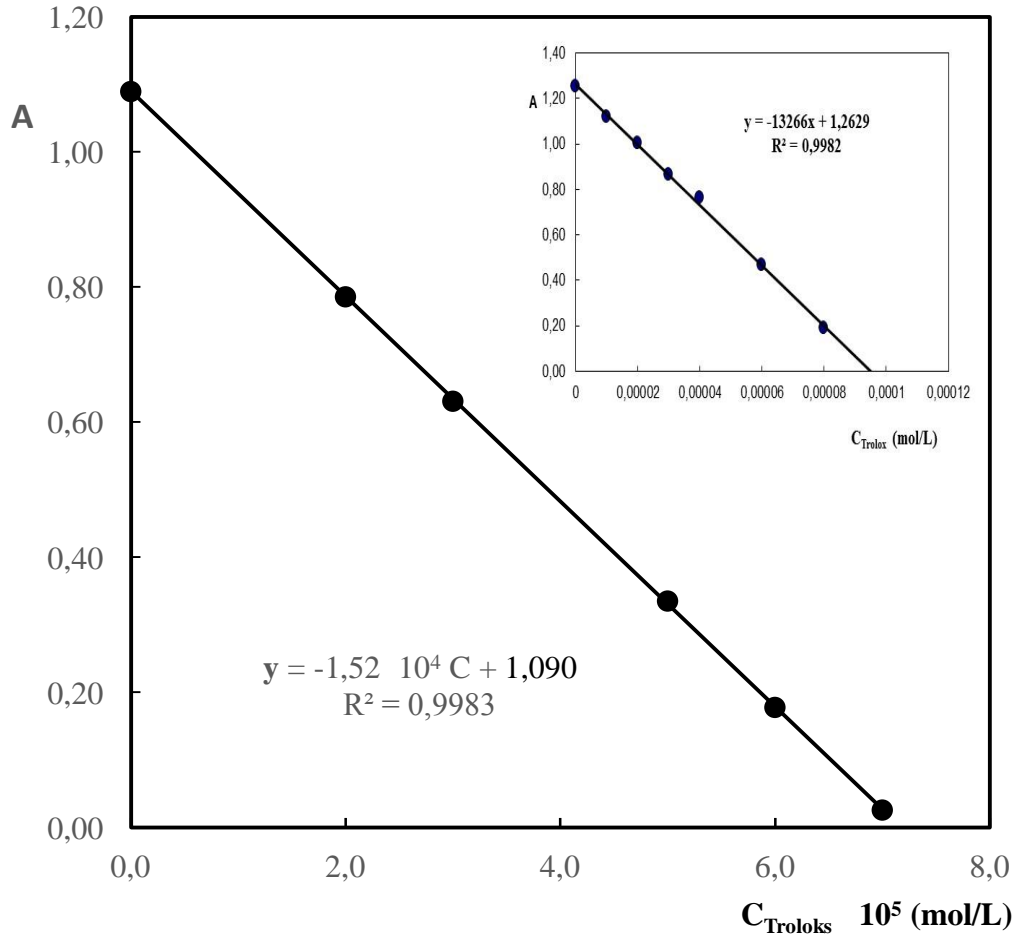
Şaraptaki toplam antioksidan kapasite miktarları TEAC (troloks eşdeğeri) katsayısı ile verileceğinden CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile troloksun kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.

#### 4.1.1 CERAC yöntemi

Hazırlanan  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L seryum (IV) sülfat çözeltisinden 1,0 mL alıp,  $2,0 \times 10^{-5}$  –  $7,0 \times 10^{-5}$  mol/L arasında lineer olan troloks çözeltileri ile reaksiyona sokuldu. 30 dakika sonra 320 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Ölçülen değerler ile kalibrasyon grafiği çizildi (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Bu eğrinin eğiminden troloks için molar absorpsiyon katsayısı  $1,52 \times 10^4$  ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı. Aynı derişimdeki troloks çözeltileri modifiye CERAC yöntemiyle ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 'lı ortam) çalışılmıştır (Şekil 4.1). Bu eğrinin eğiminden troloks için molar absorpsiyon katsayısı  $1,33 \times 10^4$  ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.1:** CERAC yöntemi ile troloks için elde edilen absorbans değerleri.

Derişim, (mol/L)	CERAC	Modifiye CERAC
	Absorbans, ( $\lambda_{320}$ )	Absorbans, ( $\lambda_{320}$ )
0	1,0900	1,252
$2,0 \times 10^{-5}$	0,7860	1,004
$3,0 \times 10^{-5}$	0,6314	0,8640
$5,0 \times 10^{-5}$	0,3355	0,5996
$6,0 \times 10^{-5}$	0,1780	0,4650
$7,0 \times 10^{-5}$	0,0260	0,3342



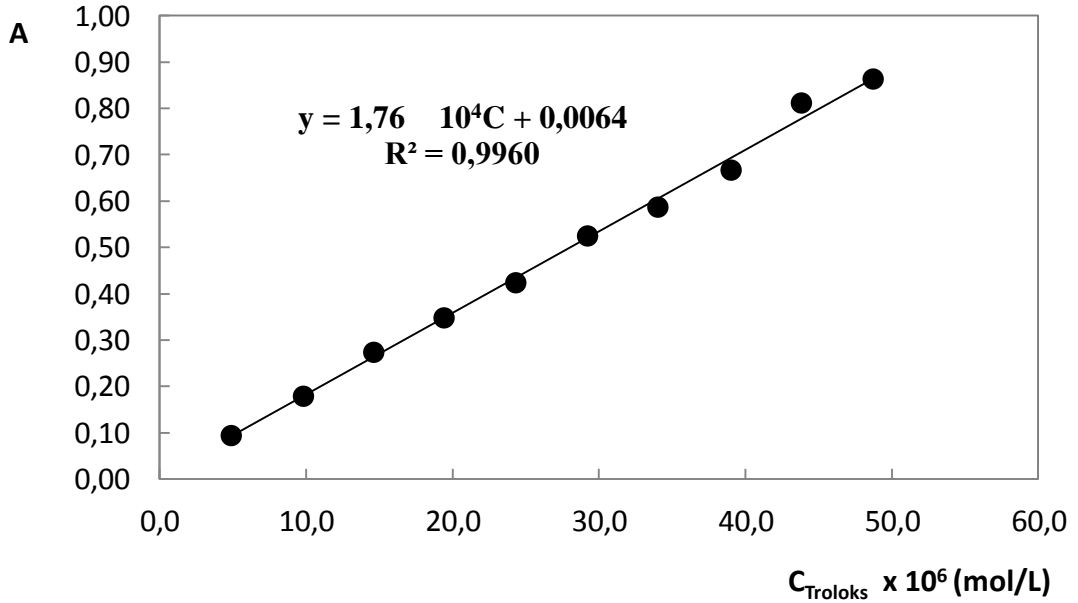
**Şekil 4.1:** CERAC yöntemi ile çizilen troloksun kalibrasyon grafikleri. \*küçük grafik modifiye CERAC yöntemine aittir.

#### 4.1.2 CUPRAC yöntemi

Hazırlanan  $2,0 \times 10^{-4}$  mol/L troloks çözeltisinden 0,1-1,0 mL arasında alınarak CUPRAC reaktifi ile reaksiyona sokuldu. 30 dakika sonra 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Ölçülen değerler ile kalibrasyon grafiği çizildi (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). Bu eğrinin eğiminden troloks için molar absorpsiyon katsayısı  $1,76 \times 10^4$  ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.2:** CUPRAC yöntemi ile troloks için elde edilen derişeme bağı absorbands değerleri.

Derişim, (mol/L)	Absorbans, ( $\lambda_{450}$ )
$4,90 \times 10^{-6}$	0,0943
$9,80 \times 10^{-6}$	0,1792
$14,6 \times 10^{-6}$	0,2740
$19,4 \times 10^{-6}$	0,3483
$24,3 \times 10^{-6}$	0,4241
$29,2 \times 10^{-6}$	0,5251
$34,0 \times 10^{-6}$	0,5873
$39,0 \times 10^{-6}$	0,6671
$43,8 \times 10^{-6}$	0,8120
$48,7 \times 10^{-6}$	0,8637



**Şekil 4.2:** CUPRAC yöntemi ile çizilen troloksun kalibrasyon grafiği.

#### 4.2 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 'in TAC yöntemleri ile kalibrasyon grafiklerinin çizimi

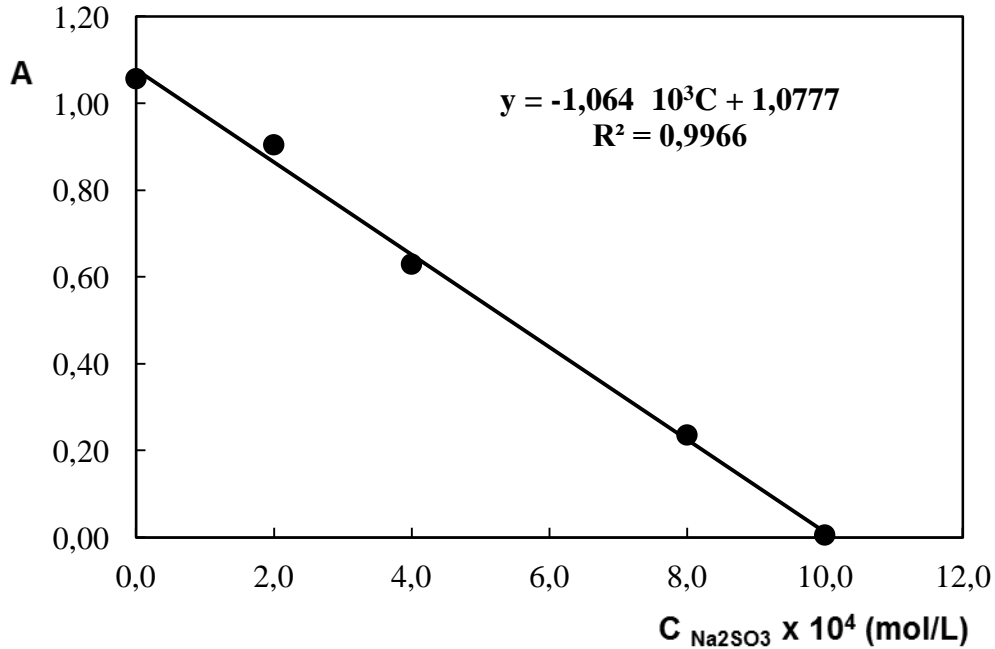
Sodyumsülfite'in sulu çözeltisi indirgen özellik gösterdiğinden bulunduğu ortamda antioksidan gibi davranır. Bu nedenle birçok gıda maddesine koruyucu olarak katılır ve toplam antioksidan tayinlerinde pozitif hataya sebep olur. Bu hatanın düzeltilmesi (doğru TAC değerinin belirlenmesi) ve aynı anda ortamdaki  $\text{SO}_2$  miktarının tayini için, kullanılan antioksidan tayin yöntemleriyle kalibrasyon grafikleri çizildi.

#### 4.2.1 CERAC yöntemi

3,0 mol/L sülfirik asit içerecek şekilde hazırlanan  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L seryum(IV) sülfat çözeltisinden 1,0 mL alınarak üzerine  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L sodyum sülfid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) çözeltisinden 0,2 – 1,0 mL arasında alınarak son hacmi 10 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanır. Hazırlanan çözeltilerin 320 nm de UV-VIS spektrofotometrede ölçümleri alındı. Ölçülen değerler ile kalibrasyon grafiği çizildi (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Bu eğrinin eğiminden  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  için molar absorpsiyon katsayısı  $1,064 \times 10^3$  ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.3:** CERAC yöntemi ile  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  için elde edilen absorbans değerleri.

Derişim, (mol / L)	Absorbans, ( $\lambda_{320}$ )
0	1,0570
$2,0 \times 10^{-4}$	0,9048
$4,0 \times 10^{-4}$	0,6299
$8,0 \times 10^{-4}$	0,2364
$10,0 \times 10^{-4}$	0,0060



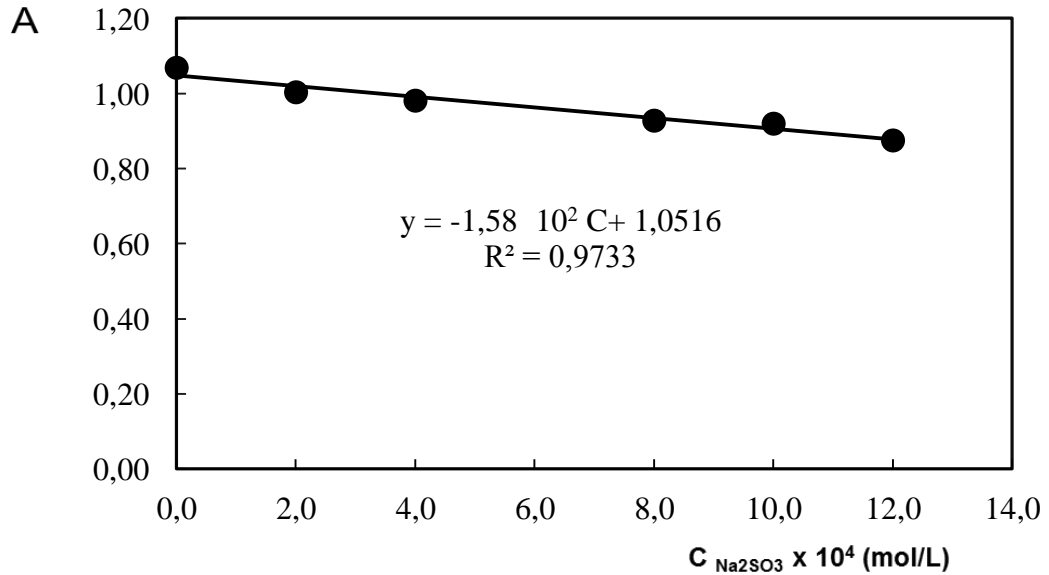
**Şekil 4.3:** CERAC yöntemi ile çizilen  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 'ün kalibrasyon reaksiyon grafiği.

#### 4.2.2 Modifiye CERAC yöntemi ile

50 mL  $1,0 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  ve 1,0 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisi hazırlandı. 3,0 mol/L sülfirik asit içerecek şekilde hazırlanan  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L seryum(IV) sülfat çözeltisinden 1,0 mL alınarak üzerine hazırlanan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisinden 7 mL eklendi. Bu çözeltilerin üzerine  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  çözeltisinden 0,2 – 1,0 mL eklenerek çözeltilerin son hacmi 10 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözeltilerin 320 nm de UV-VIS spektrofotometrede ölçümleri alındı. Ölçülen değerler ile kalibrasyon grafiği çizildi (Çizelge 4.4, Şekil 4.4). Bu eğrinin eğiminden  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  için molar absorpsiyon katsayısı  $1,98 \times 10^2$  ( $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.4:** Modifiye CERAC yöntemi ile  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  için elde edilen absorbans değerleri.

Derişim, (mol / L)	Absorbans, ( $\lambda_{320}$ )
0	1,0689
$2,0 \times 10^{-4}$	1,0037
$4,0 \times 10^{-4}$	0,9814
$8,0 \times 10^{-4}$	0,9281
$1,0 \times 10^{-3}$	0,9201
$1,2 \times 10^{-3}$	0,8754



**Şekil 4.4:** Modifiye CERAC yöntemi ile çizilen  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 'in kalibrasyon grafiği.

CERAC ve Modifiye CERAC yöntemlerine göre çizilen kalibrasyon grafiklerinden sülfatla tamponlanmış CERAC yönteminde sülfid iyonlarının indirgeme özelliğinin büyük ölçüde engellendiği görüldü. Bu durumda SO<sub>2</sub> bulunan gıda örneklerinde modifiye CERAC yönteminin kullanılması başka ayırma ve uzaklaştırma işlemleri yapılmadan toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesine olanak sağlar (Çizelge 4.5) .

**Çizelge 4.5:** Modifiye CERAC yönteminde SO<sub>2</sub> 'nin etkisi (C<sub>Ce</sub>= 2×10<sup>-4</sup> mol/L).

İlave edilen SO <sub>2</sub> (ppm)	Bulunan C <sub>Ce</sub> (mol/L)	% Hata
12,8	1,88×10 <sup>-4</sup>	6
25,6	1,84×10 <sup>-4</sup>	8
51,2	1,74×10 <sup>-4</sup>	13
64,0	1,72×10 <sup>-4</sup>	14
77,0	1,64×10 <sup>-4</sup>	18

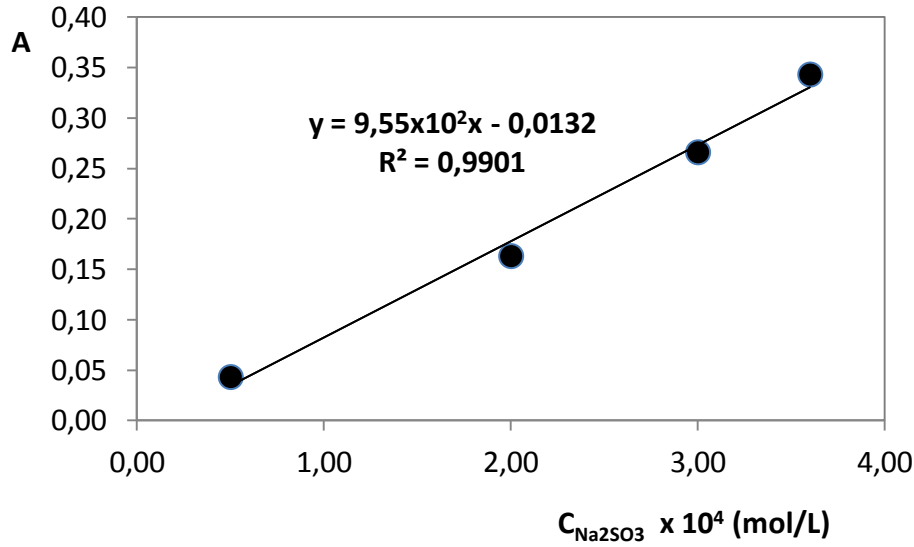
#### 4.2.3 CUPRAC yöntemi

50 mL 1,0×10<sup>-2</sup> mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> hazırlandı. Hazırlanan 1,0×10<sup>-2</sup> mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> çözeltisinden 0,02 - 0,15 mL arasında alınarak CUPRAC reaktifi ile reaksiyona sokuldu. 30 dakika sonra 450 nm dalga boyunda absorban değerleri okundu. Ölçülen değerler ile kalibrasyon grafiği çizildi (Çizelge 4.6 - Şekil 4.5). Bu eğrinin eğiminden Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> için molar absorpsiyon katsayısı 9,55×10<sup>2</sup> (mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.6:** CUPRAC yöntemi ile Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> için elde edilen absorban değerleri.

Derişim, (mol/L)	Absorbans, (λ <sub>450</sub> )
5,0 × 10 <sup>-5</sup>	0,0434
2,0 × 10 <sup>-4</sup>	0,1633
3,0 × 10 <sup>-4</sup>	0,2662
3,6 × 10 <sup>-4</sup>	0,3433





**Şekil 4.5:** CUPRAC yöntemi ile çizilen  $Na_2SO_3$ 'in kalibrasyon grafiği.

### 4.3 Moleküler Absorpsiyon yöntemi (GFAAS ile)

#### 4.3.1 Optimum çalışma koşullarının belirlenmesi

##### 4.3.1.1 Moleküler absorpsiyon metodu için uygun lambanın bulunması

Sodyum sülfite ( $Na_2SO_3$ ) çözeltisi kullanarak, son asit derişimi 0,05 mol/L  $HNO_3$  olan ve 100 – 800 mg/L  $SO_2$  içerecek şekilde standart çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan standart  $SO_2$  çözeltilerinin, grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometrede farklı lamba (Mg, Se, Sb, As) ve çizelge 3.1 de verilen fırın programı kullanılarak, kalibrasyon grafikleri çizildi (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7:** GFAAS'de farklı oyuk katot lambaları kullanılarak kükürt dioksit için elde edilen kalibrasyon denklemleri.

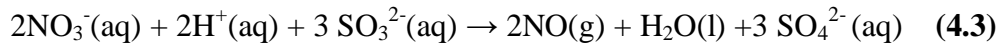
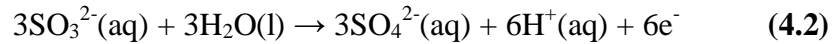
Katot Lambaları	$\lambda_{max}$ (nm)	Slit Genişliği, (nm)	Lineer kalibrasyon denklemleri,	$R^2$
Magnezyum	202.6	0.5	$A = 6 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0546$	0.9793
Arsenik	207.0	0.5	$A = 5 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0172$	0.9847
Antimon	217.6	0.5	$A = 4 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0438$	0.9999
Selenyum	204.0	0.5	$A = 8 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0271$	0.9924

Çizelge 4.7'te görüldüğü üzere Selenyum lambası kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinin regresyon katsayısının bir daha yakın olması ve absorplama katsayısının diğer lambalarla elde edilen değerlere göre daha yüksek olması daha duyarlı sonuçlar

elde etmemizi sağlayacağından kükürt dioksit analizi için selenyumun (Se) oyuk katot lambası ile çalışılmıştır.

#### 4.3.1.2 Asit etkisi

GFAAS ile SO<sub>2</sub> tayininde de hidroklorik asitli ortamda yapılan absorban ölçümlerinde asit derişiminin artmasının absorban artışına etki etmediği başka araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır [17]. Literatürdeki çalışmalarda nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) konsatrasyonu 0,02 mol/L'dan yüksek olduğu durumlarda etkili bir şekilde absorbanı artmaya başladığı görölmüş ve ölçümler 0,02-0,2 mol/L nitrik asitli ortamda yapılarak girişimlerin engellendiği rapor edilmiştir [17]. Bu tez kapsamında Se oyuk katot lambası kullanılarak grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrometresinde yapılan nitrat asidi derişiminin belirlenmesi denemelerinde üsteki çalışmadan farklı olarak absorban değerlerinde önce artış, daha sonra düşüş gözlenmiştir. Absorbanstaki bu azalmanın nitrat asidinin 0,05 mol/L değerinden itibaren SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> iyonlarının SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> iyonlarına dönüştürmesi ile açıklanabilir. Bulunan sonuçlar çizelge 4.8 'da verilmiştir.



**Çizelge 4.8:** HNO<sub>3</sub> derişiminin SO<sub>2</sub> nin moleküler absorpsiyonuna etkisi (Se katot lambası, λ=204,0 nm, Slit Genişliği= 0,50 nm, C<sub>Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></sub>=600 mg/L ).

HNO <sub>3</sub> derişimi (mol/L)	0,025	0,050	0,100	0,200
Absorbans	0,2321	0,3970	0,1884	0,1881

#### 4.3.1.3 Sıcaklık etkisi

GFAAS ile SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>'ün moleküler absorpsiyonunun ölçümünde değişik fırın programları ile çalışılmıştır. Buna bağlı olarak SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>'ün 100-600 mg/L derişimlerinde hazırlanan çözeltilerinin (0,05 mol/L HNO<sub>3</sub>) Se lambası (204 nm) kullanılarak ölçülen absorban değerleri ile kalibrasyon grafikleri çizilmiştir (Çizelge 4.9). Bu kalibrasyon doğrularından en yüksek eğimi veren fırın programı seçilerek çalışılmaları kullanılmıştır.

**Çizelge 4.9:** GFAAS ölçümleri için farklı sıcaklıklarda uygulanan fırın programı (Se katot lambası,  $\lambda=204,0$  nm, 0,05 mol/L HNO<sub>3</sub> ).

	Süre (sn)	FIRIN PROGRAMI (°C)					
		I	II	III	IV	V	VI
Ön toplama sıcaklığı	5	85	85	85	85	85	85
	40	95	95	95	95	95	95
	10	110	110	110	110	110	110
Kurutma sıcaklığı	5	130	130	130	130	130	130
	1	130	130	130	130	130	130
	2	200	200	200	200	200	200
Atomlaşma sıcaklığı	3	1600	800	800	600	600	600
	3	1600	1600	1400	1600	1400	1100
	3	1600	1600	1400	1600	1400	1100
<b>Kalibrasyon Denklemleri</b>		$A = 8,0 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0271$	$A = 3,0 \times 10^{-4} C_{SO_2} - 0,0267$	$A = 1,0 \times 10^{-4} C_{SO_2} + 0,0060$	$A = -6,0 \times 10^{-5} C_{SO_2} + 0,0087$	$A = 6,0 \times 10^{-5} C_{SO_2} - 0,0017$	$A = 4,0 \times 10^{-5} C_{SO_2} + 0,006$
<b>R<sup>2</sup></b>		0,9924	0,9800	0,9271	0,9940	0,3529	0,9971

### 4.3.2 Kalibrasyon grafiğinin çizilmesi

Sodyum sülfid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) çözeltisi kullanarak, son asit derişimi 0,05 mol/L  $\text{HNO}_3$  olan ve 100 – 800 mg/L  $\text{SO}_2$  içerecek şekilde (5 farklı derişimde) standart çözeltiler hazırlandı. Yukarıda belirlenen optimum deney koşullarında hazırlanan çözeltilerinin moleküler absorpsiyonu ölçüldü. Absorbans ve  $\text{SO}_2$  derişimleri arasında kalibrasyon grafiğı çizildi (Şekil 4.6, Çizelge 4.10). Şekilde görüldüğü gibi elde edilen lineer kalibrasyon grafiğinin denklemi aşağıda verilmiştir.

$$A_{204 \text{ nm}} = 8,00 \times 10^{-4} C_{\text{SO}_2} - 0,0271$$

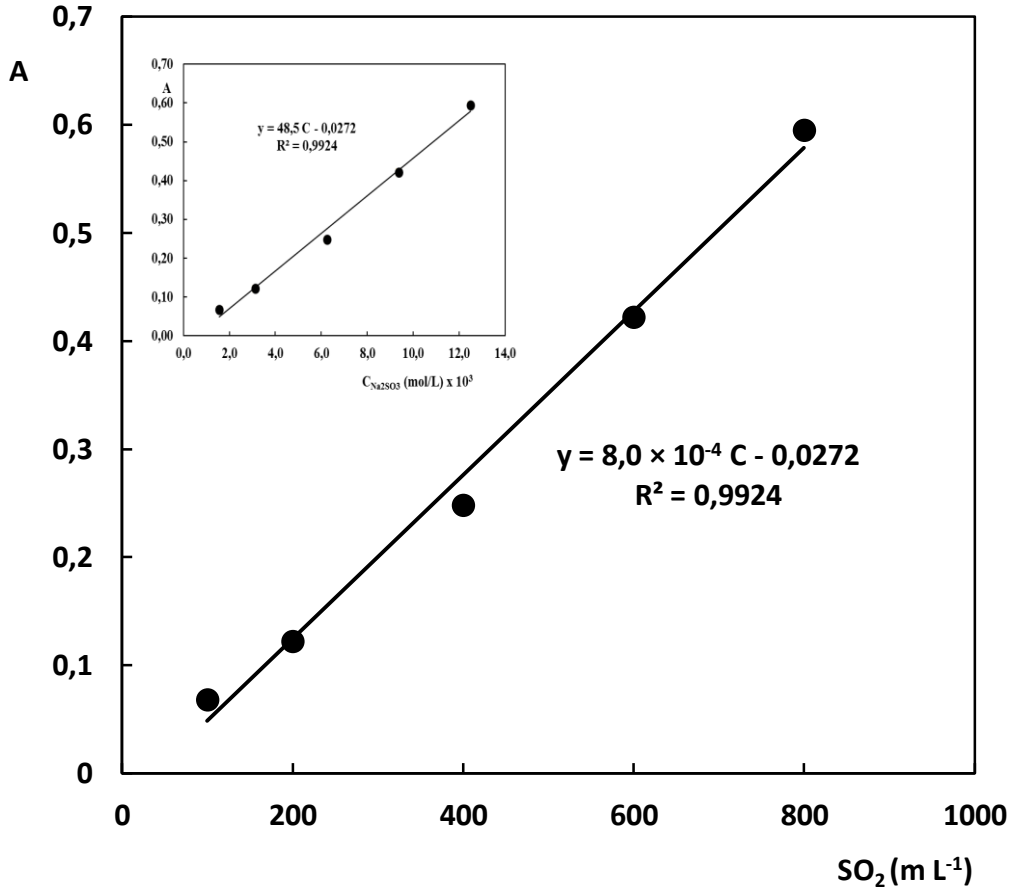
$$R^2 = 0,9924$$

$$a_{\text{SO}_2} = 8,00 \times 10^{-4}$$

$C_{\text{SO}_2}$ ,  $\text{SO}_2$  başlangıç çözeltisinin mg/L cinsinden derişimidir. Bu eğrinin eğiminden  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  için absorpsiyon katsayısı ( $\text{mg}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) olarak hesaplandı.

**Çizelge 4.10:**  $\text{SO}_2$  derişimlerine karşılık okunan absorbans değerleri (Se katot lambası, 0,05 M  $\text{HNO}_3$ ).

Derişim, (mg/L)	Absorbans
100	0,068
200	0,122
400	0,248
600	0,422
800	0,595



Şekil 4.6: SO<sub>2</sub>'nin GFAAS kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği.

#### 4.4 SO<sub>2</sub>'nin reçinede tutulması ve geri kazanımı

$2,0 \times 10^{-2}$  mol/L 25 mL Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> hazırlandı. Daha 1,0 M HCl ile pH 3,0 olacak şekilde ayarlandı ve bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi reçineden geçirilme işlemi uygulandı. Reçinede HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> formunda tutulan kükürt dioksit 25 mL 0,1 NaOH ile alındıktan sonra spektrofotometrik yöntemler olan CERAC ( $\epsilon_{\text{SO}_2}=1,064 \times 10^3$  mol<sup>-1</sup> L cm) ve CUPRAC ( $\epsilon_{\text{SO}_2}=9,55 \times 10^2$  mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) ve GFAAS moleküler absorpsiyon yöntemi ( $\epsilon_{\text{SO}_2}=48,497$  mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>) ile tayin edildi. CERAC yönteminde, 0,2 mL alınarak reaktifler ilave edildi ve absorbans ölçüldü (son hacim 10 mL). CUPRAC yönteminde reçineden elue edilen çözelti 1/10 oranında seyreltildikten sonra 0,6 mL alınarak reaktifler ilave edildi (son hacim 4,1 mL) ve absorbansı ölçüldü. GFAAS yönteminde ise çözelti 4/10 oranında seyreltildi ve ölçümler alındı. Ölçülen değerler çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.11:** Anyon değiştirici reçineden geri alınan sodyum sülfid ( $2,0 \times 10^{-2}$  mol/L).

	CERAC	CUPRAC	GFAAS
Okunan Ortalama Absorbans değerleri	0,613 ( $\pm 0,004$ )	0,257 ( $\pm 0,002$ )	0,350 ( $\pm 0,004$ )
Bulunan Derişim (mol/L)	$2,10 (\pm 0,09) \times 10^{-2}$	$1,93 (\pm 0,12) \times 10^{-2}$	$1,94 (\pm 0,36) \times 10^{-2}$
Geri kazanım (%)	105	96,5	97

#### 4.5 şarap Örneklelerinin TAC Tayini

SO<sub>2</sub> içerdikleri etiketlerinde belirtilen Kırmızı şarap I (Boğazkere üzüm çeşidi), kırmızı şarap II (Öküzgözü üzüm çeşidi) ve kırmızı şarap III (Boğazkere + öküzgözü üzüm çeşidi) örnekleri 1:20 ve beyaz şarap (Sultaniye üzüm çeşidi) örnekleri ise 1:10 oranında seyreltikten sonra modifiye CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile analizleri yapılmıştır. Bu aşamada SO<sub>2</sub> uzaklaştırılmamıştır.

##### 4.5.1 Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile analizi

Deney tüplerine 0,4 - 0,6 mL arasında değişen miktarlarda şarap örneklerinden koyup üzerlerine 1,0 mL  $2,0 \times 10^{-3}$  mol/L Ce (IV) çözeltilisi, 7,0 mL 1,0 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltilisi ekleyip 10 mL ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Absorbans değerleri 320 nm de saf suya karşı ölçüldü. Okunan absorban değerleri eşitlik (3.1)'de yerine konularak mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri hesaplandı (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12:** SO<sub>2</sub> uzaklaştırılmamış şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri.

Örnek	Örnek Hacmi (mL)	A <sub>0</sub> -A	TAC (mmol troloks/ ml örnek) $\times 10^{-2}$
Kırmızı şarap I	0,4	0,8283	3,122
Kırmızı şarap II	0,6	0,7950	1,997
Kırmızı şarap III	0,4	0,7771	2,928

Beyaz şarap	0,5	0,1034	0,156
-------------	-----	--------	-------

Çizelge 4.12’de görüldüğü gibi Boğazkere üzüm çeşidinden yapılan kırmızı şarap I örneğinin toplam antioksidan kapasite değerinin diğer şarap örneklerine göre daha yüksek değere sahip olduğu gözlemlendi.

#### 4.5.2 Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile analizi

1,0 mL  $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{CuCl}_2$  + 1,0 mL  $7,5 \times 10^{-3}$  mol/L neokuproin ve 1,0 mL 1,0 mol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$  çözeltisi üzerine 0,1 mL şarap örneklerinden eklendi ve son hacim 4,1 mL olacak şekilde saf su ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Cu(I) neokuproin kelatının maksimum absorbands yaptığı 450 nm dalga boyunda absorbands ölçümleri referans çözeltisine karşı alındı. Eşitlik (3.2)’den yararlanılarak mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri hesaplandı (Çizelge 4.13).

**Çizelge 4.13:**SO<sub>2</sub> uzaklaştırılmamış şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri.

Örnek	Örnek Hacmi (mL)	A	TAC (mmol troloks/ml örnek) $\times 10^{-2}$
Kırmızı şarap I	0,1	0,7710	3,592
Kırmızı şarap II	0,1	0,4715	2,196
Kırmızı şarap III	0,1	0,6950	3,238
Beyaz şarap	0,4	0,3327	0,194

Çizelge 4.13’de görüldüğü gibi Boğazkere üzüm çeşidinden yapılan kırmızı şarap I örneğinin toplam antioksidan kapasite değerinin diğer şarap örneklerine göre daha yüksek değere sahip olduğu gözlemlendi.

#### 4.6 Reçineden Geçirilmiş Şarap Örneklerinin TAC Tayini

1:50 oranında seyreltilen, 30,0 mL şarap örneğinin pH 3,0 olacak şekilde 1 mol/L HCl ile ayarlandı. Akış hızı dakikada yaklaşık 1,6 mL olacak şekilde örnek anyonik reçineden üç kere geçirildi. Daha sonra bu örneklere modifiye CERAC ve CUPRAC yöntemleri uygulandı.

#### 4.6.1 Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile analizi

1:50 oranında seyreltilen 30,0 mL şarap örneğinin pH 3 olacak şekilde 1 mol/L HCl ile ayarlandı. Akış hızı dakikada yaklaşık 1,6 mL olacak şekilde örnek anyonik reçineden üç kere geçirildi. Daha sonra deney tüplerine 0,5-2,0 mL miktarlarda şarap koyup üzerlerine 1,0 mL  $2 \times 10^{-3}$  mol/L Ce (IV) çözeltisi, 7,0 mL 1,0 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  çözeltisi ekleyip 10,0 mL ye saf su ile tamamlandı. Ağzı kapalı olarak yarım saat bekletildi. Absorban değerleri 320 nm de saf suya karşı ölçüldü ve mmol/mL troloks cinsinden hesaplanan toplam antioksidan kapasite değerleri Çizelge 4.14'de gösterildi.

**Çizelge 4.14:**  $\text{SO}_2$  uzaklaştırılmış şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri.

Örnek	Örnek Hacmi (mL)	$A_0-A$	TAC (mmol Troloks /mL örnek) ( $\times 10^{-2}$ )
Kırmızı şarap I	0,5	0,4134	3,116
Kırmızı şarap II	0,5	0,2640	1,990
Kırmızı şarap III	0,5	0,3873	2,920
Beyaz şarap	2,0	0,0791	0,149

Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi Boğazkere üzüm çeşidinden yapılan kırmızı şarap I örneğinin toplam antioksidan kapasite değerinin diğer şarap örneklerine göre daha yüksek değere sahip olduğu gözlemlendi.

#### 4.6.2 Kırmızı ve beyaz şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile analizi

1:50 oranında seyreltilen 30,0 mL şarap örneğinin pH 3,0 olacak şekilde 1,0 mol/L HCl ile ayarlandı. Akış hızı dakikada yaklaşık 1,6 mL olacak şekilde örnek anyonik reçineden üç kere geçirildi. Deney tüplerine 1 mL  $1 \times 10^{-2}$  mol/L  $\text{CuCl}_2$  + 1 mL  $7,5 \times 10^{-3}$  mol/L neokuprain ve 1,0 mL 1 mol/L  $\text{NH}_4\text{Ac}$  çözeltisi üzerine 0,1 mL 1:10 oranında seyreltilmiş şarap örneklerinden eklendi ve son hacim 4,1 mL olacak şekilde saf su ilave edilip reaksiyonun gerçekleşmesi için 30 dakika beklendi. Cu(I) neokuprain kelatının maksimum absorban yaptığı 450 nm dalga boyunda absorban ölçümleri referans çözeltisine karşı alındı. Çizelge 4.15'de mol/L troloks cinsinden toplam antioksidan değerleri hesaplandı.



**Çizelge 4.15:**SO<sub>2</sub> uzaklaştırılmış şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol troloks cinsinden toplam antioksidan kapasite değerleri.

Örnek	Örnek Hacmi (mL)	A	TAC (mmol Troloks /mL örnek) ( $\times 10^{-2}$ )
Kırmızı şarap I	0,1	0,3060	3,565
Kırmızı şarap II	0,1	0,1856	2,162
Kırmızı şarap III	0,1	0,2752	3,206
Beyaz şarap	0,5	0,0687	0,160

Çizelge 4.15’de görüldüğü gibi Boğazkere üzüm çeşidinden yapılan kırmızı şarap I örneğinin toplam antioksidan kapasite değerinin diğer şarap örneklerine göre daha yüksek değere sahip olduğu gözlemlendi.

#### 4.7 Şarap Örneklerinde Moleküler Absorpsiyon Yöntemi ile SO<sub>2</sub> Tayini

Şarap örnekleri nitrik asitle (HNO<sub>3</sub>) ile pH 1,28 olacak şekilde asitlendirilerek hazırlanan çözeltilerin GFAAS (Se katot lamba, 204 nm ) ile absorbanları ölçüldü (Çizelge 4.16).

**Çizelge 4.16:** Şarap örneklerinde GFAAS ile SO<sub>2</sub> analizi.

Örnek	A	SO <sub>2</sub> mg/L	SO <sub>2</sub> mol/L $\times 10^{-3}$
Kırmızı şarap I	0,2143	302	4,98
Kırmızı şarap II	0,2468	342	5,64
Kırmızı şarap III	0,2307	322	5,32
Beyaz şarap	0,2477	344	5,66



## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu tez kapsamında koruyucu olarak kükürt dioksit içeren gıda örneklerinde gerçek antioksidan kapasite değerlerini ölçmek üzere yöntemler geliştirildi. Elektron transfer esasına dayanan antioksidan tayin yöntemleri uygulaması kolay ve sık kullanılan yöntemlerdir. Bu nedenle antioksidan tayin yönteminde elektron transfer reaksiyonunu bozacak girişimlerin giderilmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda gıdalara katılan kükürt dioksitin antioksidan gibi davranarak pozitif hataya sebep olacağı öngörülerek deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu denemelerde elektron transfer esasına dayanan yöntemler olarak CERAC ve CUPRAC seçilmiş ve bu yöntemler ile kükürt dioksit için troloks eşdeğerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1).

**Çizelge 5.1 :** Kükürt dioksit için troloks eşdeğer katsayısı.

TAC Yöntemleri	$\epsilon_{\text{Troloks}}$ ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ )	$\epsilon_{\text{SO}_2}$ ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ )	Troloks eşdeğer katsayısı ( $\epsilon_{\text{SO}_2} / \epsilon_{\text{Troloks}}$ )
CERAC	$1,52 \times 10^4$	$1,06 \times 10^3$	0,0697
Modifiye CERAC	$1,33 \times 10^4$	$1,58 \times 10^2$	0,0119
CUPRAC	$1,76 \times 10^4$	$9,55 \times 10^2$	0,0542

Kükürt dioksiti uzaklaştırmak için anyon değiştirici reçine kullanıp reçineden geçirilen örneklerin toplam antioksidan kapasitesi hesaplanırken aradaki farktan kükürt dioksit miktarı troloks eşdeğer katsayıları kullanılarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.2- çizelge 5.3).

Çizelge 5.2 ve 5.3'te görüldüğü üzere kırmızı şarapların TAC'leri beyaz şaraptan daha yüksek bulunmuştur. Buna karşılık  $\text{SO}_2$  miktarları 312 – 398 mg /L arasında

değiştirdiği ve kırmızı ve beyaz şarapta önemli bir fark görülmemiştir. CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile hesaplanan hem TAC hem de kükürtdioksit miktarları uyumlu çıkmıştır.

**Çizelge 5.2:** İyon değiştiriciden geçirilmeden ve geçirilerek hazırlanan şarap örneklerinin CERAC yöntemi ile elde edilen molL<sup>-1</sup> troloks değerleri arasındaki farktan SO<sub>2</sub> miktarının hesaplanması.

Örnek	Direkt örnek Analizi	İyon değiştiriciden geçirilen örnekler	Fark	Hesaplanan
	TAC (mmol Troloks/mL örnek) (×10 <sup>-2</sup> )		SO <sub>2</sub> 'e eşdeğer (mmol Troloks/ mL örnek) (×10 <sup>-5</sup> )	SO <sub>2</sub> mgL <sup>-1</sup>
Kırmızı şarap I	3,122	3,116	5,806	312
Kırmızı şarap II	1,997	1,990	7,053	379
Kırmızı şarap III	2,928	2,920	7,164	385
Beyaz şarap	0,156	0,149	7,108	382

**Çizelge 5.3:** İyon değiştiriciden geçirilmeden ve geçirilerek hazırlanan şarap örneklerinin CUPRAC yöntemi ile elde edilen mmol/L troloks değerleri arasındaki farktan SO<sub>2</sub> miktarının hesaplanması.

Örnek	Direkt örnek Analizi	İyon değiştiriciden geçirilen örnekler	Fark	Hesaplanan
	TAC (mmol Troloks/ mL örnek) (×10 <sup>-2</sup> )		SO <sub>2</sub> 'e eşdeğer (mmol Troloks/ mL örnek) (×10 <sup>-4</sup> )	SO <sub>2</sub> mgL <sup>-1</sup>
Kırmızı şarap I	3,592	3,565	2,696	318
Kırmızı şarap II	2,196	2,162	3,374	398
Kırmızı şarap III	3,238	3,206	3,154	372
Beyaz şarap	0,194	0,160	3,340	394

Çalışmamızın ikinci kısmında kükürt dioksit tayinini karşılaştırmak için GFAAS ile moleküler absorpsiyon yöntemi seçilmiş ve bu yöntemle kükürt dioksiti tayin edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda literatürdeki yöntemlere alternatif olacak şekilde GFAAS yöntemi optimize edilmiştir. Optimize edilen yöntem ve toplam antioksidan tayin yöntemleri ile bulunan sonuçlar Çizelge 5.4'te verilmiştir.

**Çizelge 5.4:**Şarap örneklerindeki kükürt dioksitin GFAAS, CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile bulunan değerleri.

Örnek	SO <sub>2</sub> mg/L		
	GFAAS	CERAC	CUPRAC
Kırmızı şarap I	302	312	318
Kırmızı şarap II	342	379	398
Kırmızı şarap III	322	385	372
Beyaz şarap	344	382	394

Çizelge 5.4 te görüldüğü gibi GFAAS, CERAC ve CUPRAC yöntemleri ile bulunan sonuçlar uyumlu çıkmıştır. Ayrıca GFAAS yönteminin uyumlu sonuç vermesi nedeni ile iyon değiştirici reçine kullanılmadan da şarap örneklerinin TAC ve SO<sub>2</sub> analizlerinin yapılabileceği görülmüştür.



## KAYNAKLAR

- [1] **Temür, N.** (2006) “Çam, Kavak, Söğüt ve Armut Ağaçları Üzerinde Yetişen Ökse Otu (*Viscum album* L.) Bitkilerinin Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- [2] **Tunalı, Z.; Öztürk, N.; Koşar, M.; Baser, K. H. C.; Duman, H.; Kırmır, N.** (2002) “Bazı Sideritis Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*.
- [3] **Keleş, F.**, (1989) Kükürt dioksit ve Gıdalarda Kullanılması, GIDA 14(3):159-164s.
- [4] **Amerine, M.A., H.W.Berk., & W.V., Crues,** (1972) Technology of Wine making, Technology of Wine Making. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, 802s.
- [5] **Akman, A.**, (1985) Kükürt dioksitin Şaraptaki Rolü ve Önemi, Gıda Dergisi,10(3):185-189s.
- [6] **Bronislaw, LW.** (1988) Interactions Involving Sulphurdioxide in Foods,Elsever Applied Science Publishers,London.
- [7] **Canbaş, A.**, (1992) Fermantasyon Mikrobiyolojisi(yayınlanmamış ders notları)
- [8] **Cabaroğlu, T., & Canbaş, A.** (1993) Şarapçılıkta Kükürt Dioksit Kullanımı ve Önemi GIDA 18(1) 61-66s.
- [9] **Herraitz, T., Martín, J., Reglero, G., Herraitz, M., Cabezude, D.** (1989) Differences between Wines Fermented with and Without Sulphur Dioxide Using Various Selected yeasts. J. Sci. Food Agric., 49,249-258s.
- [10] **Jim-wen, RL., & Gallander, JF.** (1982) Effect of Insoluble Solids on the SO<sub>2</sub> Content and Rate of Molalactic Fermentation in White Table Wines, Amer. J. Enol. Vitic. 33 (4):194-197s.
- [11] **Keskin, H.**, (1975) Gıda Kimyası, İstanbul Üniversitesi Yayınları No:21.
- [12] **Ough, C.**, (1985) Some effects of Temperature and SO<sub>2</sub> on Wine during Simulated Transport or Storage. Amer. J. Enol.Vitic.(1) :18-22s.
- [13] **Akman, A., & Yazıcıoğlu, T.** (1960) Fermantasyon Teknolojisi Cilt 2. Şarap Kimyası ve Teknolojisi, A.Ü Ziraat Fakültesi Yayınları, No:160, Ankara, 604s.
- [14] **Chang, W., & Ono, Y.** (2005) On-line Determination of Trace Sulfur Dioxide in Air by Integrated Microchip Coupled with Fluorescence Detection. Talanta(67) 646-650s.

- [15] **Vahl, JM., & Converse, JE.** (1980) Ripper Procedure for Determining Sulfur Dioxide in wine. *J.Assoc off Anal.Chem.* 63(2):194-9s.
- [16] **Goncalves, ML., & Pacheco, JG.,** (2010) Determination of Free and Total Sulfités in wine using an automatic flow injection analysis system with voltammetric detection. *Food Additives and Contaminants* 175-180s.
- [17] **Parvinen, P., Lajunen, HJ., & Wiczorek, K.** (2011) The Measurement of The SO<sub>2</sub> Molecular Absorption in the Graphite Furnace for Possible Determination of Sulfur. *Spectroscopy Letters* 27:5 727-739s.
- [18] **Friedman.,** (1994) Improvement in the Safety of Food by SH-Containing Aminoacids and peptids. *Food Chem.* 42,3-20s.
- [19] **Demir, F., & Özcan, M.,** (2001) Chemical and technological properties of rosa (Rosa canina L.) fruits grown wild in Turkey. Research note. *Journal of Food Engineering*, 47, 333–336s.
- [20] **Özyurt, D.,** (2005) Toplam Flavonoid Miktarının Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem İle Tayini, *Yüksek Lisans Tezi* , İTÜ Kimya Bölümü, İstanbul.
- [21] **Özçelik, B .,** (2000) Biberiye ( Rosmarinus Officinalis ) antioksidanlarının fındık fûresinin raf ömrünü geciktirmedeki etkinliği , *Doktora Tezi* , İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü , İstanbul.
- [22] **Gökçe, D.,** (1998) Türkiye Kökenli Yeşil Çayın Antioksidan Kaynağı olarak değerlendirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi* , İstanbul Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- [23] **Chen, H., & Tappel, A.** (1996) Protection by multiple antioxidants against lipid peroxidation in rat liver homogenates. *Lipids* , 31, 47-50. 62s.
- [24] **Hart, D. J., & Scott, K. J.,** (1995) Development and evaluation of an HPLC Method for analysis of carotenoids in foods, and the measurement of carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54, 101- 111s.
- [25] **Ismail, A., Marjam, Z.M., & Foong, C.W.** (2004) Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87, 581-586s.
- [26] **Kurilich, A.C., Jeffery, E.H., Jovic, J.A., Wallig, M.A., Klein, B.P.,** 2002. Antioksidant capacity of different broccoli (Brassica oleracea) genotypes using the oxigen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5053- 5057s.
- [27] **Pellegrini Re. R., N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.,** (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay . *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231-1237s.
- [28] **Roberts, W.G., & Gordon, M.H.,** (2003) Determination od the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1486-1493s.



- [29] **Murakami, M ., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Matoba, T.** (2003) Effects of ascorbic acid and  $\beta$ -tokoferol on antioxidant activity of polyphenolic compounds. *Journal of Food Science*, 68(5), 1622-1625
- [30] **Ohr, L.M.** ( 2004) Dietary antioxidants. *Food Technology*, 58 (10), 6774s.
- [31] **Zhang, D., & Hamauzu, Y.,** (2004) Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry*, 88, 503-509s.
- [32] **Vinson, J. A., Dabbagh, Y.A., Serry, M.M., & Jang, J.** (1995) Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43,2800-2802s.
- [33] **Özyürek, M.,** (2005) Bazı İçeceklerin Antioksidan Aktivitelerinin Tayininde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi , *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi , Kimya Bölümü, İstanbul.
- [34] **Rice-Evans, C ., & Miller , N.J.,** (1994) Total antioxidants statusin plasma and body fluids. *Meth. Enzymol* , 234 , 279-293s.
- [35] **Miller, N.J, Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gpoinanthan, V.,Milner , A.**(1993) Anovel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidants status in premature neonates., *Clin. Science* ,84 , 407-412s.
- [36] **Prakash, D., & Singh, BN.** (2007) Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion. *Food Chemistry* 102, 1389–1393s.
- [37] **Apak , R., Güçlü , K., Özyürek , M., & Karademir , S.E.** (2004) Anovel tatola antioxidant capacity index for dietary polyphenols , vitamin C and E , using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine : CUPRAC method, *J. Agric. Food Chem.*, 52 , 7970-7981s.
- [38] **Kuljarachanan, T., Devahastin, S., & Chiewchan, N.** (2009) Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying, *Food Chemistry* 113, 944–949s.
- [39] **Özyurt, D.** (2005) Toplam Flavonoid Miktarının Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem İle Tayini, *Yüksek Lisans Tezi* , İTÜ Kimya Bölümü, İstanbul
- [40] **Özyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2010) Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with over citric acid and simple sugars. *Journal of Food Composition And Analysis* 23, 282-288s.
- [41] **Apak, R., Güçlü, K., Altun, M., Özyürek, M., Karademir, S.E** (2006) Antioxidant capacity of fresh, sun and sulphited-dried Malatya apricot assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (Supplement 1), 76–85s.



## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad** : Selda ALVAN  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Kırıkkale/ 1987  
**Adres** : Avcılar / İSTANBUL  
**E-Posta** : [seldaalvan@gmail.com](mailto:seldaalvan@gmail.com)

### ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : Trakya Üniversitesi

### TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Birsen Demirata Öztürk, Dilek Özyurt, Selda Alvan, Resat Apak, “Determination of sulphur dioxide and antioxidants in wine by spectroscopic methods” XXth SCSC, ESAS 2012, 7-12 October, 2012, Tatranska Lomnica, Slovakia, pp 123.