

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI MATERYALLERDE ANTİOKSİDAN TAYİNLERİ

Kimyager Sibel EKEN

FBE Kimya Anabilim Dalı Anorganik Kimya Programında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR (YTÜ)

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BÖLÜM.....	4
2.1 Antioksidanların Sağlık Açısından Önemi	4
2.2 Antioksidanların Etki Mekanizması	6
2.3 Antioksidanların Sınıflandırılması	9
2.3.1 Doğal Antioksidanlar	9
2.3.1.1 Tokoferoller.....	9
2.3.1.2 Askorbik Asit ve Tuzları.....	11
2.3.1.3 Askorbil Palmitat ve Askorbil Stearat	11
2.3.1.4 Glukoz Oksidaz	12
2.3.1.5 Sülfidler	12
2.3.2 Sentetik Antioksidanlar.....	13
2.3.2.1 Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat.....	13
2.3.2.2 Gallatlar.....	13
2.3.2.3 Butillendirilmiş Hidroksianisol (BHA)	14
2.3.2.4 Butillendirilmiş Hidroksitoluen (BHT)	15
2.3.2.5 Tersiyer Butilhidrokinon (TBHQ).....	16
2.3.2.6 Nordihidroguairatik Asit (NDGA)	17
2.4 Antioksidanların Gıdalarda Kullanım Alanları	18
2.4.1 Eritilmiş Hayvansal Yağlar	18
2.4.2 Bitkisel Yağlar.....	19
2.4.3 Yüksek Oranda Katı Yağ İçeren Yağlar	19
2.4.4 Düşük Oranda Katı Yağ İçeren Gıda Ürünleri.....	20
2.4.5 Şekerlemeler.....	21
2.4.6 Et Ürünleri.....	21
2.4.7 Balık ve Balık Ürünleri	22
2.4.8 Esansiyel Yağlar	24
2.4.9 Çiklet Hamuru	24
2.4.10 Kızartma İşlemlerinin Uygulandığı Gıdalar.....	24
2.4.11 Fırında Pişirme İşleminin Uygulandığı Gıdalar	24
2.4.12 Fındık,Fıstık Türü Ürünler	25
2.4.13 Hububatlar.....	25
2.4.14 Ham Bitkisel Yağlar	25

2.4.15	Gıda Ambalajları	26
2.5	Antioksidanlarla İlgili Yasal Düzenlemeler	30
2.6	Kalitatif ve Kantitatif Tayin Yöntemleri	34
2.7	UV – Vis Spektrofotometrisi ve Türev Spektrofotometrisi	41
2.7.1	Analitik Bantların Türevlendirilmesi	43
2.7.2	Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları	45
2.8	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	46
2.8.1	Genel Bilgi	46
2.8.1.1	Pompalar	46
2.8.1.2	Örnek Giriş Sistemleri (Enjektörler)	46
2.8.1.3	Kolonlar	47
2.8.1.4	Detektörler	47
2.8.2	HPLC’de Ayırma Teknikleri	49
2.8.2.1	Kolon Dolgu Materyalleri	49
2.8.2.2	Moleküler Etkileşimler	50
2.8.2.3	Adsorpsiyon Kromatografisi (Sıvı-Katı Kromatografisi)	50
2.8.2.4	Bağıl Faz Kromatografisi	51
2.8.2.5	Eleme Kromatografisi	51
2.8.3	HPLC’de Kullanılan Özel Teknikler	52
2.8.3.1	Gradient Elüsyon	52
2.8.3.2	Türevlendirme	52
2.8.4	HPLC’de Çalışma Koşullarının Saptanması	53
2.8.4.1	Üstünlükleri	55
3.	DENEYSEL BÖLÜM	56
3.1	Maddeler ve Çözücüler	56
3.2	Çözeltiler	56
3.3	Aletler ve Diğer Gereçler	56
3.4	Çalışma Yöntemi	57
3.4.1	Uygun Çözücünün Saptanması	57
3.4.2	Ekstraksiyon Süresinin Tayini	57
3.4.3	Spektrumların Çizilmesi	57
3.4.4	BHA Tayini İçin Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	57
3.4.5	BHT Tayini İçin Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	58
3.4.6	HPLC Yöntemi İçin Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	59
3.4.7	Geliştirilen Yöntemin Örneğe Uygulanması	59
3.4.8	Kıyas Yöntemi (HPLC)	59
3.4.9	Geri Kazanma Çalışmaları	59
4.	SONUÇLAR	60
4.1	Uygun Koşulların saptanması	60
4.2	Ölçü Eğrileri	64
4.3	Geri Kazanma Testi	75
4.4	Sakız (First White Şekersiz Sakız) Örneğinin Analizi	75
5.	TARTIŞMA	77
	KAYNAKLAR	79
	ÖZGEÇMİŞ	84

I.1.1.1.1 SİMGE LİSTESİ

A	Absorbans
c	Konsantrasyon
⁰ C	Celsius derecesi
l	Işık yolu
g	Gram
[]	Konsantrasyon miktarı
L	Litre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
ppm	Milyonda kısım
ε	Molar absorptivite katsayısı
S	Standart sapma
%	Yüzde
% S	Varyans katsayısı
d ⁿ	n. Türev

I.1.1.1.2 KISALTMA LİSTESİ

Abs	Absorbans
BHA	Butillendirilmiş hidroksi anisol
BHT	Butillendirilmiş hidroksi toluen
CA	Sitrik asit
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
DMSO	Dimetilsülfoksit
EC	Avrupa Gıda Kodeks Komisyonu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
NDGA	Nordihidroguairatik asit
PG	Propil gallat
TBHQ	Tersiye butil hidrokinon
TGKY	Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
Vis	Görünür
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Fenolik yapılardan serbest radikal oluşumu.....	7
Şekil 2.2 Tokoferollerin kimyasal yapıları	9
Şekil 2.3 Askorbik asidin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.4 Gallatların kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.5 BHA'nın kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.6 BHT'nin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.7 TBHQ'nun kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.8 Nordihidroguairatik asidin kimyasal yapısı	17
Şekil 2.9 p_n - P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu pik – pik yöntemi	42
Şekil 2.10 t_n - P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı pik – tanjant yöntemi	43
Şekil 2.11 z_n , P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı pik – sıfır yöntemi.....	43
Şekil 2.12 İki bandın üst üste geldiği bir eğri.....	44
Şekil 2.13 1-4 arası türevleri.....	44
Şekil 2.14 Bir HPLC cihazının şeması.....	48
Şekil 4.1 BHA (15 µg/ml) , BHT(50 µg/ml) ve karışımlarının(15:50) absorpsiyon spektrumları.....	62
Şekil 4.2 BHA (15 µg/ml) , BHT(50 µg/ml) ve (15:50) karışımlarının metanoldeki 1.derece türev spektrumları.....	62
Şekil 4.3 BHA (15 µg/ml) , BHT(50 µg/ml), karışımlarının(15:50) ve sakız örneğinin (20 µg/ml) absorpsiyon spektrumları.....	63
Şekil 4.4 BHA (15 µg/ml), BHT(50 µg/ml), karışımlarının(15:50) ve sakız örneğinin (20 µg/ml) 1. derece türev spektrumları.....	63
Şekil 4.5 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait absorpsiyon spektrumları.....	66
Şekil 4.6 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 1.derece türev spektrumları.....	66
Şekil 4.7 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları.....	68
Şekil 4.8 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları.....	69
Şekil 4.9 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları.....	70
Şekil 4.10 BHT tayini için ölçü eğrisinin absorpsiyon spektrumları.....	71
Şekil 4.11 BHT tayini için ölçü eğrisinin 1.derece türev spektrumları	71
Şekil 4.12 BHA ve BHT'ye ait ölçü eğrilerinin absorpsiyon spektrumlarının üst üste karşılaştırılması	73
Şekil 4.13 BHA ve BHT'ye ait ölçü eğrilerinin 1.derece türev spektrumlarının üst üste karşılaştırılması	73
Şekil 4.14 Sakız örneğine ait HPLC kromatogramı	74

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Kullanılmasına izin verilen antioksidanlar ve kullanım alanları.....	27
Çizelge 2.2 Kullanımı yasal olarak düzenlenmiş antioksidan çeşit ve miktarları.....	30
Çizelge 2.3 CAC ve EC'ye göre gıdalarda kullanımına izin verilen antioksidanlar	33
Çizelge 2.4 Doğal antioksidanların tayin yöntemleri	39
Çizelge 2.5 Sentetik antioksidanların tayin yöntemleri	40
Çizelge 4.1 Uygun çözücünün saptanması için bulunan absorbans değerleri.....	60
Çizelge 4.2 Karıştırma süresi(t) tayini için $^1D_{304}$ 'deki türev absorbans değerleri	60
Çizelge 4.3 BHA ve BHT çözeltilerinin dayanıklılığının araştırılmasına ait çalışma sonuçları.....	61
Çizelge 4.4 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri.....	67
Çizelge 4.5 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler	67
Çizelge 4.6 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri	68
Çizelge 4.7 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler.....	68
Çizelge 4.8 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri.....	69
Çizelge 4.9 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler.....	69
Çizelge 4.10 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri	70
Çizelge 4.11 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler.....	70
Çizelge 4.12 BHT tayini için ölçü eğrisinin 292 nm'deki $^1D_{292}$ değerleri	72
Çizelge 4.13 BHT tayini için ölçü eğrisine ait parametreler.....	72
Çizelge 4.14 BHA çözeltilerinde geri kazanmaya ait çalışma sonuçları	75
Çizelge 4.15 Sakız numunesinde bulunan BHA tayini için elde edilen sonuçlar	76

ÖNSÖZ

Aylar süren bu zorlu süreç boyunca her türlü hoşgörüsü ve yardımseverliğiyle her zaman yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Mahmure Üstün Özgür'e ,

Çalışmalarım boyunca ve zor anlarımda beni yalnız bırakmayan ve manevi desteğini esirgemeyen sayın hocam Arş.Gör Gülşah Gümrükçü'ye,

Çalışmalarıma verdiği destek için Arş.Gör. Dr. Bürge Aşçı'ya,

Hayatım boyunca her zaman aldığım kararlarda beni destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve bu yolda sonuna kadar devam etme cesareti veren biricik Ailem'e,

Attığım her adımda manevi desteğini içimde hissettiğim canım arkadaşım Kerem Korkut'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, 2007

Sibel EKEN

ÖZET

Antioksidanlar; gıdalarda oksidatif bozulmayı önleyen veya geciktiren bileşiklerdir. Doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır. BHA ve BHT günlük hayatta gıdalarda kullanılan sentetik antioksidanlardır. Bu çalışmada BHA ve BHT'nin tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirildi. Elde edilen bulgular HPLC yöntemi ile karşılaştırıldı.

BHA ve BHT'nin birarada bulunduğu sakızlarda bu maddelerin ön ayırma yapmaksızın kantitatif analizi için türev spektrofotometrik bir yöntem geliştirildi ve First White şekeriz sakız örneğine uygulandı. BHA ve BHT'nin absorpsiyon pikleri çakışmaktadır. Bu nedenle üst üste çizilen absorpsiyon piklerinde BHA ve BHT'nin absorpsiyon değerlerinden faydalanarak tayinleri yapılamamaktadır. Yapılan literatür araştırması sonucunda bu iki antioksidanın birarada tayini için spektrofotometrik bir yönteme rastlanmadı.

Spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesi amacıyla BHA ve BHT'nin metanolde hazırlanan çözeltilerinin absorpsiyon ve birinci derece türev spektrumları alındı. Bunlar arasında birinci derece türev spektrumunun bu iki antioksidanın birarada tayini için uygun spektrum olduğu saptandı. Bu spektrumda BHA'nın 292 nm'de, BHT'nin ise 304 nm'de birinci derece türev absorbansı 0'dır. Bu bakımdan bu iki antioksidanı içeren karışımın metanoldeki çözeltisinin bu dalga boylarındaki birinci derece türev absorbans değerleri (¹D) ölçülerek her birinin miktarı diğerinin etkisi olmaksızın tayin edildi.

BHA için 5-25 µg/ml , BHT için ise 20-100 µg/ml konsantrasyon aralıklarında hazırlanan standart çözeltilerin ¹D değerleri ölçülerek her iki antioksidan için ölçü eğrileri oluşturuldu. Bu eğrilere ait doğru denklemleri en küçük kareler yöntemiyle hesaplandı. Geliştirilen yöntem First White şekeriz sakız örneğine uygulandı.

Bulunan değerlerin kıyaslanması amacıyla HPLC yöntemi de örneğe uygulandı. HPLC yönteminde BHA için 20-100 µg/ml, BHT için ise 5-25 µg/ml konsantrasyon aralıklarında hazırlanan standart çözeltileri kullanılarak her iki antioksidan için ölçü eğrileri oluşturuldu. Bu eğrilere ait doğru denklemleri en küçük kareler yöntemiyle hesaplandı.

Elde edilen bulgular doğruluk ve presizyon yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenilirlik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Presizyon arasındaki fark anlamlı değildir. Standart Eğri 1 yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar ile HPLC yöntemi arasındaki sonuçların ortalamaları arasında anlamlı derecede fark olmadığı görüldü. Bu yöntem sakızlarda BHA tayininde laboratuarda tercihen kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: BHA, BHT, 1. derece türev spektroskopisi, standart katma yöntemi, HPLC

ABSTRACT

Antioxidants play important roles like preventing the oxidative degradation and delaying action components. They can be classified of natural and synthetic. BHA and BHT are synthetic antioxidants that they are widely used in food industry. In this study, one analytical method was proposed to determine the BHA and BHT which is spectrophotometric method and acquired results were compared with HPLC method.

A derivative spectrophotometric method is developed for quantitative analysis without pre-separation for chewing gums which include BHA and BHT together. And, it was applied at "First White" gum. The BHA and BHT absorption peaks are overlapped. For this reason, BHA and BHT analysis were not determined by using absorption values. In literature research, there is no a spectrophotometric method which two antioxidants are analyzed together.

To develop the spectrophotometric method, BHA and BHT's solutions were prepared in methanol. Then, the absorption spectra were taken and first derivative spectra measured of the solutions. The best spectra is "first order derivative spectra" to measure these antioxidants together. The absorption peak of BHA was 292 nm, for BHT was 304 nm and first order derivative absorbance was "0". From this point, the quantity of each antioxidants was determined together without other as measuring the first order derivative absorbance values on these wavelengths.

Some calibration curve was formed by using 1^{st} D values on these concentration intervals of BHA in 20-100 $\mu\text{g/ml}$ and BHT in 5-25 $\mu\text{g/ml}$. The equations of these curves were calculated by "least squares method". And, this developed method was applied for "First White" gum sample. Standard addition method and HPLC method were also applied for sample.

HPLC method was used to compare these values. For each antioxidants, some calibration curves were formed on standard interval concentration for BHA in 20-100 $\mu\text{g/ml}$ and BHT in 5-25 $\mu\text{g/ml}$.

The obtained results by these methods were statistically compared at 95% confidence level using t and F tests. There was no significant difference between the mean precisions. It has seen that results between which were had using Standard Curve 1 method and HPLC method average was not meanly different. This method can preferably use in laboratory for BHA determination in gum.

Key Words: BHA, BHT, first order derivative spectroscopy, standart addition method, HPLC

1. GİRİŞ

Havadaki oksijen, gıda maddesini meydana getiren karbonhidrat, yağ ve proteinlere etki ederek, tadının ve kokusunun bozulmasına neden olur. Antioksidan kullanımı yağ ve yağlı gıdaların yükseltgenmesini geciktirmek için en etkili yöntemlerden biridir. Antioksidanlar kendileri de genellikle yükseltgenebilen maddeler olup, radikal zincir tepkimesini kesintiye uğraticı rol oynamaktadır.

Yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar yüksek kararlılığa sahip olup etkili ve ucuzdur. Fakat zehirliliği ve yan etki yaratmaları konusunda bazı şüpheler vardır. Tüm diğer sentetik gıda katkı maddeleri gibi, antioksidanların da doğal kaynaklardan elde edilmiş olanlarının kullanılması şeklinde bir eğilim gösterir.

Antioksidanlar doğal olarak, pek çok yağlı tohumda, ot ve baharatta bulunur. Baharatlar ve otlar lezzet katmanının dışında koruyucu özellikleri nedeniyle de yıllar boyunca kullanılmışlardır. Doğal kaynaklardan antioksidan maddelerin ekstraksiyonu, izolasyonu ve bunların aktivitesinin ölçülmesi amacıyla yapılan çalışmalardan önemli sonuçlar elde edilmiştir. Canlılarda kimyasal prosesler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ yaparak) hücrelere zarar vermelerini önlerler. Bu özellikleriyle hücrelerin anomalileşme, sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azalttıkları için, daha sağlıklı ve yaşlılık etkilerinin minimum olduğu bir yaşam ile yaşama şansımızı yükseltirler.

Oksidasyon; ‘vücudun paslanması’ anlamına gelir. Oksidasyonun en önemli nedeni ise, vücudumuzda oluşan veya dışarıdan aldığımız serbest radikallerdir. İşte bu noktada antioksidanlara tanım olarak değinebiliriz. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmemesini veya kendini yenilemesini sağlar. Geniş ifadeyle antioksidanlar, oksijen ile reaksiyona girerek gıdalar içindeki olumsuz etkilerini engelleyen maddeler olarak tanımlanabilirler. Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)’nın tanımında ise antioksidanlar gıdada yağın acılaşması ve renk değişimleri gibi oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bozulmaları önleyerek raf ömrünü uzatan maddeler olarak ifade edilmektedir.

Pek çok gıda maddesinin bozulmasının önemli bir kaynağının oksijen olduğu bilinmektedir. İstenilmeyen lezzet ve koku oluşumlarına neden olan oksidatif acılaşma reaksiyonu; nem, ısı, bazı metaller, metal içeren bileşikler, hava ve enzimler ile katalizlenebilmektedir. Bekletilmeleri sırasında bu etkiler altında yağlar ‘yağ bozulması’ veya ‘acılaşma’ olarak adlandırılan çok yönlü kimyasal değişimlere uğrarlar. Yükseltgenme, yağ ve yağlı gıdalardaki bozulmaların en önemli nedenidir. Yağ yükseltgenmesi sonucu gıdanın organoleptik özelliklerine bağlı olarak kalitesi olumsuz yönde etkilenir. Antioksidan kullanımı yağ ve yağlı gıdaların yükseltgenmesini geciktirmek için en etkili yöntemlerden biridir. Antioksidan kullanımı için esas neden, antioksidanların gıdanın raf ömrünü uzatırken besin ögesi kayıplarını (yağda çözünür vitaminlerin kaybı) azaltmalarıdır. Antioksidanların kullanımı yağların kararlılıkları arasındaki farkları giderir ve içerik bakımından gıda ürününün daha özgün olmasını sağlar. Fakat düşük kaliteli veya sıradan ürünlerin kalitesini iyileştirmezler.

Gıda yükseltgenmesinin birçok sorunu teknolojik müdahaleler ile gıda üreticisi tarafından çözümlenebilir veya kontrol altına alınabilir. Uygun işleme şartlarının seçimi, doğru paketlenme malzemesi kullanımı, inert atmosfer kullanımı, uygun depolama koşulları, iyi hammadde, antioksidanların daha etkili olmasını sağlayarak, gıdaların yükseltgenerek bozulmasını önlemede faydalı olur. Bu işlemler acılaşmayı geciktirmekte ancak bunu engelleyememektedir. Antioksidanlar, gıdalarda oksidasyonun başlangıcından önce ilave edildiklerinde reaksiyonu önleyebilmekte veya azaltabilmektedir. Örneğin ürünün karakteristik özelliklerinin tam olarak bilinmemesi, üretim tekniklerinin değiştirilmemesi veya ekonomik nedenler engelleyici roller üstlenebilmektedirler.

Canlı dokularda doymamış yağlar nispeten daha karardır. Çünkü hayvanlar ve bitkiler, lipid yükseltgenmesini önlemek için doğal antioksidanlar ve enzimler içerirler. Tüm doğal yağlarda özgün antioksidanlar bulunur. Bitkisel yağlarda, bu maddeler meyva veya tohumda bulunan yağın bozulmasını önler. Ayrıca Maillard tepkimesini doğal antioksidanların oluşturduğu bilinmektedir.

Antioksidanlar, elektron aldıklarında bu elektronları verebilecekleri başka reseptörlerinde yanlarında bulunması gerekir. Belki bu nedenle doğal olarak alınan, birbirine benzer ve bir arada bulunan antioksidanlar ilaç gibi alınan saf ve bir tip antioksidanlardan daha değerlidir. 1930’lu yılların başlarında kullanımına yasal olarak izin verilen antioksidan maddenin gam guagik olduğu ve bunun da özellikle hayvansal yağlarda ölçülebilir antioksidatif etkisinin bulunduğu belirtilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde ise bu madde 1940 yılında et

yağlarında kullanılmak üzere kabul edilmiştir. 1940'lı yılların başlarında ise gallik asidin alkil esterlerinin kullanımına izin verilmiş olup 1942'de nordihidroguairetik asit (NDGA), 1948'de butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), 1954'de butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve 1972'de tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)'un gıdalarda kullanımı yasal hale gelmiştir.

Yağlarda ve yağ içeren gıdalarda kullanılan antioksidanlarda bulunması gereken özellikler aşağıdaki şekilde özetlenebilmektedir:

- Gıdalarda kullanıldıkları dozlarda toksik etkileri bulunmamalıdır.
- Düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmelidir.
- Kolaylıkla temin edilebilmelidir.
- Kızartma gibi ısı işlemlerde etkisini kaybetmemelidir.
- Gıdada istenilmeyen renk veya lezzet değişimlerine neden olmamalıdır.
- Maliyeti düşük olmalıdır.

Bununla birlikte antioksidanların bozulmaya başlayan veya bozulmuş olan bir yağın lezzetini değiştiremeyecekleri ve hidroliz veya mikrobiyal yollarla oluşabilecek bozulmayı engelleyemedikleri de ifade edilmektedir. Ancak BHA gibi bazı fenolik antioksidanların antimikrobiyal etkilerinin bulunduğu ve küflere karşı etkili oldukları belirtilmektedir. Spesifik bir uygulama için en uygun antioksidanın seçiminde;

- Antioksidan katılacak gıdanın tipi (hayvansal yada bitkisel yağlar)
- Antioksidanın katıldığı yağın kullanıldığı gıdada etkisini gösterebilmesi
- Antioksidanın çözünürlüğü veya dağılımı
- Renk bozma eğilimi
- Gıdaya uygulanacak işlemin tipi (kızartma, fırında pişirme, püskürtmeli kurutma)
- Lezzetin nötral olması
- Gıdanın pH'ı

gibi faktörlerin göz önüne alınması gerekmektedir (Gür, E. ve Altuğ, T., 2001; <http://www.sagligim.com>; <http://www.naturabesinsel.com>)

Bu çalışmanın amacı türev spektrofotometrisinin gıda maddelerine antioksidan olarak ilave edilen BHA ve BHT'nin herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmadan bir arada tayinine uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

Çalışmamızda sakız, domates çorbası, içkembe çorbası, tavuk çorbası, et suyu, cips gibi gıda ve güneş yağı, gece bakım kremi gibi kozmetik ürünler çalışma materyali olarak seçilmiştir.

2. GENEL BÖLÜM

2.1 ANTİOKSİDANLARIN SAĞLIK AÇISINDAN ÖNEMİ

Antioksidanlara verilen önem genel sağlığa olumlu katkıları nedeniyle giderek artıyor. Son dönemin en popüler takviyelerinden olan antioksidanlar, genel yaşam süresini uzatan, kanser, kalp hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltan ve yaşlanmanın etkilerini geciktiren etkileriyle biliniyor.

Hava ve su kirliliği, hazır yiyecekler, yaşam tarzı, stres gibi etkenler sürekli olarak sağlık üzerine tehdit oluşturuyorlar. Bu etkenler sonucunda normal metabolizma faaliyetlerinin yanı sıra serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin 80 farklı hastalığa neden olabileceği söylenmekte, enfeksiyon dışı olan bu hastalıkların başında kalp ve beyin damarlarının tıkanmasına bağlı hastalıklar, kanserler ve artirit gelmektedir. Serbest radikaller, hücre içinde yapıları bozan, DNA hücredeki biyokimyasal bileşiklerde bozulmalara yol açan maddelerdir. Bilim adamları bu bozulmaların kanser, kalp hastalıkları, akciğer hastalıkları ve katarakta yol açan en önemli faktörler olduğunu düşünüyorlar.

Özellikle sigara tiryakileri tehlike altındadır. Sigara dumanındaki serbest radikaller, vücudun antioksidan savunma sistemini çok yıpratırlar. Çeşitli çalışmalarda sigara tiryakilerinde antioksidan etkili vitamin ve mineral seviyelerinde önemli azalmalar olduğu bulundu.

Serbest radikallere karşın etkin koruma sağlayabilecek takviyeler antioksidanlardır. Antioksidan etkileri en yüksek olan maddeler vitamin A, C, E, selenyum, pycnogenol gibi maddelerdir. UCLA School of Public Health'den Dr. James Enstrom'a göre düzenli vitamin C alımı yaşam süresini uzatıyor. Enstrom'un çalışmasının sonuçlarına göre günde en az 300 mg vitamin C alımı yaşam süresini 6 yıl uzatabiliyor (Eröztürk, N., 2000).

Antioksidanların özellikle ileri yaşlarda sağlığa çok daha yararlı olduğu biliniyor. İtalya'da 70-99 yaş arası sağlıklı bireylerde yapılan ölçümlerde plazmadaki vitamin C ve E düzeyleri aynı yaşlardaki sağlıklı bireylerden daha yüksek bulundu. Antioksidanların ilerleyen yaşlarda vücudun savunma mekanizmasını güçlendirdiği, yaşlanmaya bağlı sağlık sorunlarında koruma sağladığı ve bunun yanında cildi ve saçları da beslediği yapılan araştırmalarla ortaya çıkıyor (Eröztürk, N., 2000).

Antioksidanlar açısından zengin olan beslenme alışkanlıklarında bazı hastalıkların az görülmesi söz konusudur. Fransız'larda kalp hastalığının, Güneydoğu Asya'da yaşayanlarda meme kanserinin az bulunması gibi. Ancak bu kişilerin kanlarında bazı flavonoidlerin veya vitaminlerin yüksek bulunması, yalnızca antioksidanları almakla aynı etkilerin bizde görüleceği anlamına gelmemektedir. Bütün dünyada yüzlerce milyar dolarlık piyasası olan antioksidan ilaç kullanımından beklentileri aşağıdaki gibidir.

Risklerin azalması beklenen hastalıklar;

Kalp hastalıkları(damar darlığı kökenli),
Kanser,
Hızlı yaşlanma,
Artirit,
Kronik yorgunluk sendromudur.

Antioksidanların pozitif etkileri;

Damarların güçlenmesi,
Morarmaların azalması,
Toplayıcı kan damarların güçlenmesi ve dolayısıyla varislerin ve ödemlerin azalması,
Deri sağlığının artması,
Elastikiyetin artması,
Dış etkenlere (rüzgar, güneş) karşı direncin artması,
İnflamasyona karşı etkileri,
İnflamasyonla (enfeksiyon dışı) mücadeleyi arttırması,
Eklem ağrısını azaltması,
İmmun sistemi güçlendirmesi, soğuk algınlığının sıklığını azaltması,
Seks gücünü arttırmasıdır.

Bütün bu etkileri tam olarak her antioksidandan bekleyemeyiz. Antioksidanların kan seviyesinde devamlı olarak yüksek tutulması ilaçla mümkün olacak gibi görünmemektedir. Yüksek antioksidan seviyesi ancak; her öğünde antioksidanlar açısından zengin gıdalarla beslenerek yani taze, mevsimlik ve mümkünse haşere ilacı kullanılmamış sebze ve meyve yiyerek; önemli antioksidan etkisini elde edilişi esnasında kaybetmemiş bitkisel yağlar, özellikle zeytinyağı kullanarak sağlanabilir. Antioksidan kullanmak veya antioksidanlar açısından zengin gıda ile beslenmekten daha önemli olan serbest radikal üretimine sebep olacak etkenlerden kaçınmaktır. Mevsiminde olmayan bir meyve veya sebzenin yetiştirilebilmesi için onu haşerelelerden koruyacak ilaçların kullanıldığı ve bunların direkt veya indirekt (içme sularına karıştırarak) bizi etkilediği unutulmamalıdır. Mevsimlik meyve

yiyecek bundan kurtulmamız mümkündür. Çok önemli bir antioksidan olan zeytinyağının hava ile temasını azaltıp antioksidan kapasitesini kaybettirmemek için küçük hacimlere ayrılması ve mümkün olduğu kadar serin ve karanlıkta saklanması dikkat edilmesi gereken bir başka önemli noktadır. Unutulmamalıdır ki bugün ilave olarak almamız önerilen askorbik asit (C vitamini), asetil salisilik asit (aspirin), bitki ve meyvelerin haşerelerle, enfeksiyonlarla mücadele silahlarıdır. Uzun senelerdir bu tip dış etkenlerde yetişmiş meyve ve sebzelerin C vitamini ve aspirin düzeylerinin yüz yıl evvelkilere nazaran daha düşük olması doğaldır. Bu nedenle önceki dönemlerde yaşamış olan insanların hem daha fazla bitki kökenli besinlerle beslenmiş olmaları hem de bu ürünlerin daha fazla antioksidan ihtiva ediyor olması, günümüz insanının antioksidan açığının kaynağı olabilir.

Tavsiyeler;

- Taze sebze ve meyve ağırlıklı dengeli beslenme,
- Muntazam egzersiz,
- Yeterli istirahat,
- Toksinlerden uzak kalmak,

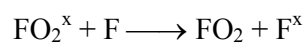
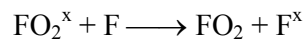
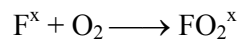
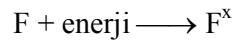
Kısıtlı alkol, minimal protein kullanmaktır (Müftüoğlu,O.,2003; <http://www.sagligim.com>)

2.2 Antioksidanların Etki Mekanizması

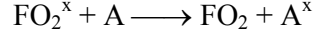
Lipid yükseltgenmesinin serbest radikal zincir mekanizmasını bir inhibitör dört şekilde durdurabilir:

- 1) Antioksidanın hidrojen vermesi
- 2) Antioksidanın elektron vermesi
- 3) Lipidin antioksidanın aromatik halkasına eklenmesi
- 4) Lipid ile antioksidanın aromatik halkasının kompleks oluşturması

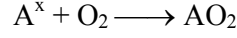
Bir antioksidan molekülünün araya girmesi ile okside olabilen maddenin birçok molekülleri yükseltgenmekten kurtulur, böylece yükseltgenme yavaşlamış olur. Yağın aktive edilmiş molekülü F^x ile gösterilirse, bu F^x oksijenle aktive olmuş FO_2^x peroksidini verir, bu da enerjisini diğer yağ molekülleri F' 'ye geçirerek zincirleme tepkimeyi başlatır.



Antioksidanlar (A) ile birlikte bazı etkin peroksitler (FO_2^x) enerjilerini yağ moleküllerine vermek yerine antioksidana vererek zincirleme tepkimenin dışında kalır:



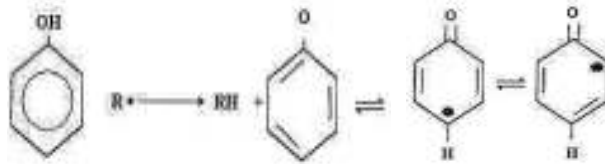
Antioksidanın etkin molekülü (A^x) enerjisini yağ moleküllerine aktarmaz, genellikle etkin olmayan moleküllere yükseltgenir:



Antioksidanların kendileri de yükseltgenerek bozundukları için yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi bu olaydan koruyabilir ve tüm antioksidan molekülleri kaybolunca madde de hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Eğer yağda peroksitler zaten yeteri kadar oluşmuşsa bundan sonra katılacak antioksidanın yararı olmaz, zira bu az miktardaki antioksidan var olan peroksitler tarafından çabucak yükseltgenir. Metal katalizörler de antioksidanın etkisini, onu yükseltgemek suretiyle azaltır. Antioksidanlar lipid peroksidasyonunu önlemeleri sırasında kendileri de radikaller oluştururlar. Söz konusu fenoksil radikalleri (A^x) aşağıda belirtilen reaksiyonlara girmektedirler:

1. Radikal daha fazla okside olarak stabil kinon oluşturmaktadır.
2. Ana radikal indirgeme ajanları ile rejenere olmaktadır.
3. Dimerizasyon oluşarak oligomerler meydana gelmektedir.
4. Radikal lipid peroksil radikalleri ile birleşip çeşitli radikal olmayan maddeler oluşmaktadır.

Gıdalarda kullanılan antioksidanların temelini oluşturan fenolik yapılar, rezonans hibritleri vasıtası ile düşük enerjili serbest radikaller oluşturmalarına imkan tanımaktadır. Şekil2.1 de bu reaksiyon kimyasal olarak görülmektedir



Şekil 2.1 Fenolik yapılardan serbest radikal oluşumu (Buck, 1991)

Belli bir sınır içinde antioksidanın miktarı arttıkça koruma özelliği de artmaktadır. Bununla birlikte belirli bir noktadan sonra katılan antioksidanın etkisi azalmaya başlar. Bu belki de

antioksidanın kendisinin zincirleme tepkimeye girmeksizin yükseltgenebilmesinden ileri gelmektedir.

Otoksidasyonun metal ve serbest radikallerle katalizlenmesini önlemek için, ışık (özellikle UV ışık) koruyucu bazı kimyasal maddeler tarafından soğurulmalıdır. Bazı antioksidanlar, radikal oluşturmada radyasyonu soğurabilir. Aktif karbon, fenil salisilat ve hidroksibenzofenon UV deaktivatörlerine örnektir .

İki veya daha fazla sayıda antioksidanın bir arada kullanılması ile elde edilen daha kuvvetli etki *sinerjizm* olarak ifade edilmektedir. Söz konusu etki iki antioksidan arasında oluşabileceği gibi, bir antioksidan ile antioksidan niteliği olmayan diğer bir madde arasında da gerçekleşebilmektedir. Sinerjizm ile ilgili iki ana mekanizma aşağıda açıklanmaktadır:

1. Sinerjist etki gösteren madde, ana antioksidan molekülü (A)'nü koruma işlemi sırasında oluşan fenoksil radikali (A^x)'nden rejenere etmektedir. Askorbik asit, askorbat veya askorbil palmitat ile tokoferoller arasında oluşan sinerjistik etkinin bu reaksiyona dayandığı belirtilmektedir. BHA ve BHT'nin arasındaki sinerjistik etkinin tersiyer butil peroksitten hazırlanan bir model sistem üzerinde araştırılması sonucunda, BHA fenoksil radikalının BHT'den hidrojen alarak BHA'yı rejenere ettiği ve bu arada BHT'nin kinon metid'e yükseltgendiği saptanmıştır.

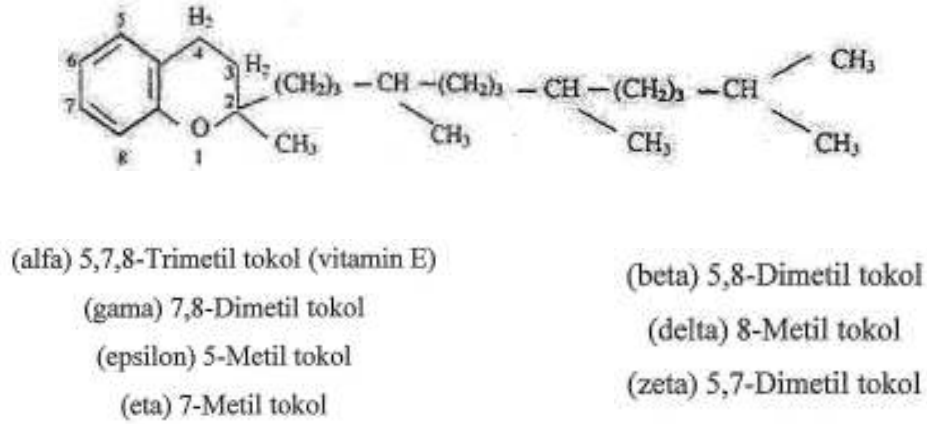
2. Fenolik antioksidanlarla sitrik asit, fosforik asit veya etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi şelat ajanları arasında sinerjistik etki oluşmaktadır. Söz konusu etki oksidasyonun başlaması ve hidroperoksit parçalanma işleminin oluşmasında katalizör görevi yapan metal iyonlarının şelat ajanları tarafından bağlanması yolu ile oluşmaktadır. Bu nedenle de pek çok antioksidan formülasyonunda şelat ajanları bulunmaktadır. Sinerjistik etkiyi optimize etmek amacıyla iki antioksidanın veya kullanılacak olan şelat ajanlarının uygun oranları deneysel olarak saptanmalıdır. Antioksidanların istenilen etkiyi oluşturmaları belirli dozlarda kullanımları ile mümkündür. Aşırı kullanımları sonucunda prooksidan gibi davrandıkları da gözlenebilmektedir. En iyi etkinin elde edilebilmesi için ise antioksidanların yağlara ve yağ içeren gıdalara işlemin mümkün olduğu kadar erken safhalarında, örneğin rafinasyonda önce ilave edilmeleri gerekmektedir. Bitmiş üründe bulunan yağların korunması amaçlandığında ise antioksidan işlemden sonra katılmalıdır. Genel anlamda antioksidanlar, oksijeni tutarak oksijene gereksinim duyulan enzimatik reaksiyonları da engelleyebilmekte ve bu reaksiyonlarda yer alan polifenol oksidaz gibi enzimlerin aktivitesini de azaltabilmektedirler (Gür, E. ve Altuğ, T., 2001; Öner, Y., Tuz, U., Güleç, S., 2004).

2.3 ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

2.3.1 Doğal Antioksidanlar

2.3.1.1 Tokoferoller

Tokoferoller bitkilerde sıkça rastlanan ancak hayvansal dokularda oldukça az bulunan antioksidan türevleri olup ilk kez 1930'lu yıllarda vitamin aktiviteleri ile fark edilmişlerdir. Bu maddeler Şekil 2.2'den de görüldüğü gibi kroman'dan elde edilen tokollerin türevleridir.



Şekil 2.2 Tokoferollerin kimyasal yapıları (Patterson, 1989)

Doğal kaynaklı antioksidanlar içinde en geniş kullanım alanına sahip olanlar tokoferollerdir. Tokoferoller bitkisel yağlarda bulunmakta olup temel ticari kaynaklarının soya fasulyesi olduğu belirtilmektedir. Söz konusu maddeler genellikle, bitkisel yağların son işlem basamağında buhar yıkaması ile elde edilen yan ürünler olan, deodorizasyon destillatlarından elde edilirler. İlk olarak E vitamini kaynağı olarak kullanılan α -tokoferol (dl- α -tokoferol) veya (2,5,7,8,-tetra-metil-2-4',8',12'-trimetildesil), ($C_{29}H_{50}O_2$); doğal kaynaklardan izole edilebildiği gibi laboratuarda doğala özdeş formu da (dl- α -tokoferol) sentezlenebilmektedir. α -tokoferol belirli miktarda antioksidan potansiyeli gösterirken, γ - ve δ - tokoferol epimerlerinin daha etkili antioksidanlar olduğu belirtilmektedir. Antioksidan olarak kullanılacak olan ürünlerin toplam tokoferol konsantrasyonlarının minimum %80'i genellikle γ - ve δ - tokoferollerden meydana gelmektedir. Doğal kaynaklı antioksidanların tercih edildiği veya sentetik formlarının kullanımına izin verildiği durumlarda karışım halindeki tokoferol konsantrasyonlarının önemi artmaktadır.

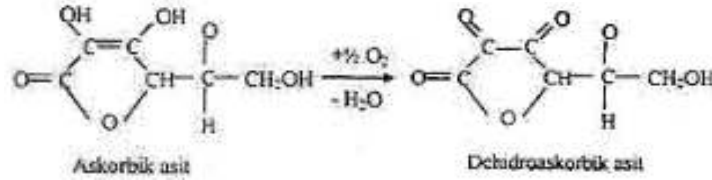
Tokoferollerde antioksidatif etki için genel olarak kabul edilen sıralama $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ şeklinde olmaktadır. Ancak başta sıcaklık olmak üzere bazı faktörlerden dolayı söz konusu türevlerin antioksidan aktiviteleri etkilenmekte ve birbirleri ile kıyaslandığı zaman verimlilikleri değişebilmektedir. Tokoferoller, karanlık ortamlarda, aydınlık ortamlara göre daha fazla etkilidirler. Saf hallerinde ise berrak, viskoz, sarımsı, hemen hemen hiç kokusuz yağ formunda olup süksinat, palmitat gibi kristalize türevler verebilmektedir. Yağların indüksiyon periyodları sırasında doğal veya sentetik dl- α -tokoferollerde kayıplar oluşmaktadır.

Tokoferollerin oksidasyon ürünlerinin farklı özellikleri, bu gruba ait değişik türevlerin aktivitelerindeki değişimleri açıklamaktadır. Hafif atmosferik oksidasyon koşulları, bazı tokoferollerin heteroksiklik zincirlerini açmakta, bu da antioksidan aktivite göstermeyen α -tokokinon gibi bileşiklerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Aynı koşullarda γ -tokoferol kısmi olarak kromon 5,6-kinona dönüşmektedir. Tokoferollerin kinonlara kadar okside olmasını engellemektedir. Zayıf antioksidan aktivitesine ve koyu kırmızı renge sahip olan kromon 5,6-kinon; bulunduğu bitkisel yağlarda kısmi oksidasyon sonucu koyukırmızı renge neden olmaktadır. İndüksiyon periyodunun bitmesi ile ise kromon 5,6-kinona okside olmakta ve rengi açılmaktadır. Bu da rafine pamuk tohumu yağının renginin oksidasyon reaksiyonlarının başlangıcında koyulaşıp, reaksiyonun ilerlemesiyle tekrar açılma nedenini açıklamakta, ancak oksidasyon reaksiyonunun gelişmesi nedeni ile bu renk açılması üreticilere bir avantaj sağlamamaktadır.

Hayvansal kaynaklı gıda ürünleri, tokoferol ve askorbik asit gibi doğal antioksidanları çok ya da hiç içermemektedirler. Domuz yağı ve kümes hayvanlarından elde edilen katı yağlar buna örnek olarak verilebilmektedir. Bu ürünlerde tokoferoller antioksidan olarak yaygın biçimde kullanılabilir. Bitkisel kaynaklı sıvı yağlar ve gıda ürünleri etkin oksidatif stabilite için yeterli tokoferol içerdiklerinden, bu ürünlere rafinasyon gibi ısısal işlemler uygulanmadığı sürece tokoferol ilavesine gerek kalmamaktadır. Diğer birçok doğal veya sentetik antioksidan gibi tokoferoller de, belirli bir oranın üzerinde ilave edildiklerinde, artan doza bağlı olarak aktivitelerinde bir azalma meydana gelmekte ve prooksidan etki meydana getirebilmektedirler. Bu maddelerin antioksidatif etki gösterdikleri optimum konsantrasyonlarının doğal olarak bitkilerde bulunma oranlarına benzer olduğu ifade edilmektedir.

2.3.1.2 Askorbik Asit ve Tuzları

Doğal olarak meyvelerde ve sebzelerde yer alan bir vitamin (C vitamini) olan L-askorbik asit (3-keto-L-gulofuranolakton), ($C_6H_8O_6$)₅ beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz kristalimsi yapıda bir maddedir. Erime noktası 190⁰ civarında olan askorbik asit, suda tamamen çözünürken, etanolde biraz, dietil eter çözeltisi içinde ise hiç çözünmemektedir. Askorbik asit, özellikle konserve veya şişelenmiş ürünler gibi tepe boşluğu olan gıdalarda oksijen tutucu olarak kullanılmaktadır. 1 cm³ tepe boşluğunda bulunan oksijeni tutabilmek için yaklaşık olarak 3.5 mg askorbik asit kullanılması gerekmektedir. Havadan veya gıdadan oksijenin uzaklaştırılması sırasında askorbik asit, dehidroaskorbik asit formuna dönüşmekte ve böylece antioksidatif etkisini göstermektedir. Şekil2.3’de askorbik asidin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.3 Askorbik asidin kimyasal yapısı (Patterson,1989)

Askorbik asidin tuzları olan sodyum askorbat ($C_6H_7O_6Na$) ve potasyum askorbat ($C_6H_7O_6K$) da çeşitli gıdalarda oksijen tutucu özellikleri nedeniyle oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmaktadırlar.

2.3.1.3 Askorbil Palmitat ve Askorbil Stearat

Askorbik asit sodyum ve potasyum tuzları şeklinde gıdaya katılabildiği gibi askorbil palmitat ($C_{22}H_{38}O_7$) ve askorbil stearat ($C_{24}H_{42}O_7$) şeklindeki yağ asidi esterleri de kullanılabilir. Askorbik asit, içeceklere kolaylıkla ilave edilebilmekte ancak yağlarda kullanımı söz konusu olduğunda yağ asidi esterlerinin kullanılmaları gerekmektedir. Bu esterler, beyaz veya sarımsı beyaz kristal toz halde, turuncu kokusuna benzer hafif kokulu ve gıdalarda oksijen tutucu etkisi bulunan maddelerdir. % 0.01 oranında kullanılan askorbil palmitatın özellikle bitkisel yağlarda %0.02 oranındaki sentetik antioksidanlardan butillendirilmiş hidroksianisol (BHA) ve butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT)’e göre acılaşmayı engellemede daha etkin olduğu belirtilmektedir. Diğer antioksidanlar ile aynı anda kullanımı bitkisel yağlarda ve bu yağlar kullanılarak kızartılan patates cipslerinde stabiliteyi arttırmaktadır. α - ve γ -tokoferoller ile birlikte kullanıldığında sinerjist etki meydana

gelmektedir. Askorbil palmitat, doğal olarak bulunmadığı halde, her ikisi de doğal olan palmitik asit ve askorbik asit formlarına hidroliz olabilmektedir.

2.3.1.4 Glukoz Oksidaz

Glukoz oksidaz enzim niteliğinde bir madde olup, birçok organizmadan elde edilebileceği gibi en önemli ticari kaynağının *Aspergillus Niger*'in bir türevi olduğu belirtilmektedir. Bu madde gıdalarda çözünmüş haldeki ya da tepe boşluğunda oksijeni tutarak acılaşmayı engellemektedir. Bu enzim glukoz ve oksijen arasındaki reaksiyonu katalizleyerek D-glukonik asit ve hidrojen peroksit oluşturmaktadır. Ticari glukoz oksidaz sistemlerini meydana getiren katalaz, su ve oksijeni parçalayarak gıdalarda hidrojen peroksidin, birikmesini engellemektedir. Bu reaksiyon ortamdaki glukoz veya oksijen bitinceye kadar devam etmektedir.

Glukoz oksidaz genelde toz haldeki yumurta ürünlerinin üretiminde glukozu uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Glukoz oksidaz, glukoz ve protein arasında oluşan Maillard tipi esmerleşme reaksiyonlarını engelleyerek, kurutulmuş yumurta ürünlerine ek bir dayanıklılık kazandırmaktadır. Turunçgillerden elde edilen meyve sularında kullanılan glukoz oksidaz, kolalı içecekler, gazlı içecekler, bira, şarap, mayonez ve salata soslarına da katılmaktadır. Genel olarak bu enzimin pH 2.5-7.0'de ve buzdolabı sıcaklığından 50⁰ C'a kadar aktivitesini koruduğu bildirilmektedir. Yüksek maliyeti ve üreticilerin tatlılık özelliği bulunmayan gıdalara glukoz ilave etmek istememeleri gibi nedenlerden dolayı glukoz oksidaz yaygın bir kullanım alanına sahip değildir.

2.3.1.5 Sülfidler

Kükürt dioksit (SO₂), sodyum sülfid (Na₂SO₃), sodyum ve potasyum bisülfid (NaHSO₃, KHSO₃) ve metabisülfid (Na₂S₂O₅, K₂S₂O₅) gibi maddeler değişik gıdalarda zayıf antioksidan olarak kullanılmaktadır. Örneğin, SO₂ bir araya depolama sırasında, tat bozulmalarını engellemek için ilave edilmektedir. Sülfidler, enzimlerin katalizlediği reaksiyonların yanısıra enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarını da kontrol ederler. Örneğin, kesilmiş meyve ve sebzelerin tazeliğini korumak amacıyla sülfitleme ajanları kullanılmaktadır. ABD'deki bir yasaya göre 10 ppm'den fazla kükürt içeren gıdaların etiketlerinde 'Kükürtle muamele edilmiştir' yazısının yer alması gerekmektedir. Bu yasa ile kükürde duyarlı olan kişilerin korunması amaçlanmaktadır.

2.3.2 Sentetik Antioksidanlar

Yağların oksidasyon mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte oksidasyonu önlemek amacıyla antioksidan üretimi konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğal özdeş formları veya türevleri laboratuarda sentezlendiği gibi doğal yapı ile ilgisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine karşın, bunların ancak az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır.

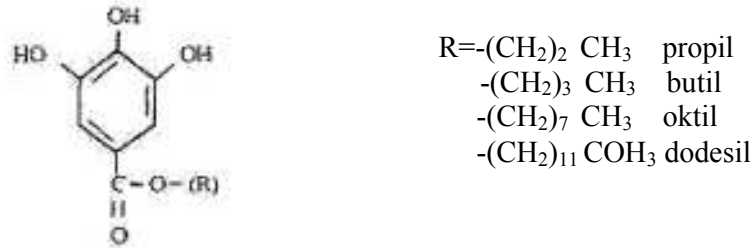
2.3.2.1 Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat

Diğer adı 'izoaskorbik asit' olan eritorbik asit ($C_6H_8O_6$) ve tuzu olan sodyum eritorbat ($C_6H_7O_6Na.H_2O$)'ın antioksidatif etkileri oksijen bağlama yolu ile gerçekleşmektedir. Güçlü bir indirgen ajan olan eritorbik asit, oksijen tutucu ve moleküler oksijeni indirgeyici rol oynamaktadır. Eritorbik asidin, asidik ortamlardan nötr ortamlara göre daha stabil olduğu belirtilmektedir. % 0.5-1 oranlarında kullanılan sodyum klorür bu koruyucunun oksidasyonunu engelleyebilmektedir.

Eritorbik asit, sitrik asit ile birlikte süflitlere alternatif olarak kullanılabilir. Bu kombinasyon, özellikle donmuş deniz ürünleri, salatalar ve elmalardan meydana gelen renk kaybını ve acılaşmayı engellemek amacıyla uygulanmaktadır. Eritorbik asit ve sodyum eritorbat ($C_6H_8O_6Na$) 150-200 ppm düzeylerinde donmuş meyvelerde oksidatif bozulmayı engellemek amacı ile kullanılabilirler.

2.3.2.2 Gallatlar

Bu antioksidanlar kimyasal olarak 3,4,5-trihidroksi-benzoik asidin propanol esteri olarak ifade edilmektedir.



Şekil 2.4 Gallatların kimyasal yapısı (Patterson,1989)

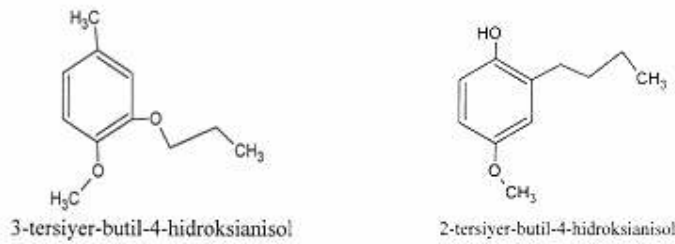
1940'lı yılların başında, gallik asidin alkil esterlerinin antioksidan etkileri belirtilmiş ve kısa bir süre içerisinde de birçok ülkede gıdalarda kullanımına izin verilmiştir. Fenolik tipteki antioksidanların oksidasyonu önleme mekanizmasında da belirtildiği gibi hidroksil grupları

doymamış gliserid molekülünün serbest radikal oksidasyonunun engellenmesinde etkili bir rol oynamaktadır. Gallatlar, trihidroksi yapılarına bağlı olarak yüksek antioksidan potansiyeline sahiptirler. Ancak gallat esterlerinin su varlığında demir kalıntıları ile kompleks oluşturarak mavi-siyah renk bozulmalarına neden olmaları, söz konusu maddelerin bitkisel yağlarda kullanımlarını çok düşük bir düzeye indirmiştir. Oktil gallat ($C_{15}H_{22}O_5$) ve dodesil gallat ($C_{19}H_{30}O_5$) katı ve sıvı yağlarda yüksek çözünürlüğe sahip iken propil gallat ($C_{10}H_{12}O_5$) suda daha iyi çözünürlük göstermektedir. Bütün gallatlar, özellikle alkali ortamlarda ısıya karşı oldukça dirençli olup ateş, fırında pişirme ve kızartma sırasında gallatlarda farkedilebilir derecede kayıplar olmaktadır.

Gallatlar içerisinde dodesil esterinin en dayanıklı, propil esterinin ise en dayanıksız antioksidan özelliğini gösterdiği belirtilmektedir. Beyaz kristaller şeklinde katı halde bulunan propil gallat, İngiltere’de hayvansal ve bitkisel yağlarda en çok kullanılan antioksidandır. Gallat esterlerinin BHT ve BHA ile beraber kullanılmaları ile sinerjistik etki oluşturmaktadır. Gallatların ısıya duyarlılıkları oldukça az olup erime noktaları olan $148^{\circ}C$ ’de dekompoze olmaktadır.

2.3.2.3. Butillendirilmiş Hidroksianisol (BHA)

Butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), ($C_{11}H_{16}O_2$); ticari olarak 3-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%85) ile 2-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halinde bulunmaktadır.



Şekil 2.5 BHA’nın kimyasal yapısı (Patterson,1989)

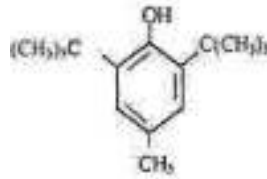
BHA beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, erime noktası yaklaşık $48-63^{\circ}C$ olan ve hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilen ancak suda çözünemeyen bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Bu antioksidanın gıdalarda kullanımına ilk olarak 1948 yılında ABD’de izin verilmiş olup günümüzde pek çok ülkede gıda olarak tüketilen katı ve sıvı yağlarda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda terciyer butil grubun, fenolik hidroksil (-OH)

grubu üzerinde koruma meydana getirdiği ileri sürülmektedir. Bu durum molekülü dış reaksiyonlardan korumakta ve daha az uçucu ve daha çok yağda çözünür forma dönüştürmektedir. Yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda yer alan tersiyer butil grup nedeni ile BHA'ya 'engelleyici fenol' adı verilmektedir. Bu sterik engellenmenin, tersiyer butil grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu neden ile BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu öne sürülmektedir.

BHA, bitkisel yağlarda etkin bir antioksidan olmamasına karşın, genellikle diğer antioksidanlar ile (gallatlar) beraber kullanıldığında hem fenolik yapıda bulunan antioksidanların bir arada kullanılması ile elde edilen sinerjistik etkiden, hem de BHA'nın yağın kullanıldığı ürünü koruyucu etkisinden faydalanılmaktadır. BHA fırınlama veya kızartma gibi yüksek sıcaklık işlemleri uygulanan yağlarda kullanıldığında kolaylıkla algılanabilen keskin bir fenolik koku oluşturmaktadır.

2.3.2.4 Butillendirilmiş Hidroksitoluen (BHT)

Butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), ($C_{15}H_{24}O$); 2,6-ditersiyer butil-4-metil fenol'un, 1954 yılında gliseridler üzerinde etkili ve koruyucu bir antioksidan olduğunun belirlenmesi sonucunda gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır.

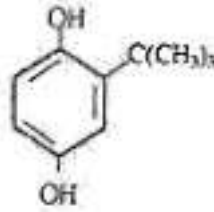


Şekil 2.6 BHT'nin kimyasal yapısı (Patterson,1989)

BHT, yağlarda iyi çözünebilen ancak suda çözünmeyen, beyaz renkli ve kristal yapıda bir madde olup 760 mm Hg basıncında, kaynama noktası $265^{\circ}C$ 'dir. Erime noktası $69.7^{\circ}C$ 'dir. Bu madde BHA gibi bitkisel yağlarda düşük aktiviteye sahip olmasına karşın diğer antioksidanlar ile beraber kullanıldığında yağın ilave edildiği gıdayı koruma özelliğinden yararlanılmaktadır. BHT, BHA ile sinerjistik etki gösterirken, gallatlar ile sinerjisi etki meydana getirmemektedir.

2.3.2.5 Tersiyer Butilhidrokinon (TBHQ)

ABD Gıda ve İlaç İdaresinin (FDA) yaptığı çalışmalar sonucunda etkili bir antioksidan olduğu belirlenen tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)'un kullanımına ilk kez 1972 yılında izin verilmiştir. Mono-tersiyer-butilhidrokinon ($C_{10}H_{14}O_2$) yapısında olan bu antioksidan; beyaz, kristalimsi ve karakteristik kokusu olan bir maddedir. Son yıllarda özellikle gıdaların işlenmesinde ve insan beslenmesinde yer alan bitkisel yağlar oksidasyona karşı oldukça duyarlı oldukları için kuvvetli antioksidanlara olan gereksinimleri artmıştır. Günümüzde tersiyer butil hidrokinon (TBHQ)'un bitkisel yağlarda stabiliteyi arttırmak amacı ile kullanımına birçok ülke tarafından izin verilmektedir. TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi diğer antioksidanlara göre daha fazladır.



Şekil 2.7 TBHQ'nun kimyasal yapısı (Patterson,1989)

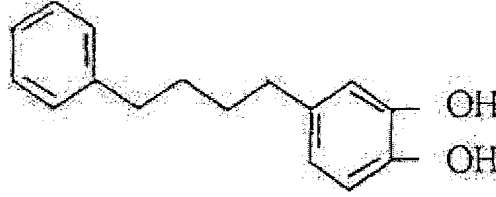
TBHQ yağlarda orta derecede, suda ise çok az çözünebilir, beyaz ile sarımsı kahverengi arası renkte, kristal yapıda bir madde olup erime noktasının $127^{\circ}C$ olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, çoklu doymamış bitkisel yağlardaki koruyucu etkisinden dolayı kısmen de olsa tercih edilmektedir. En iyi etkiyi ise sitrik asitle birlikte kullanıldığında vermektedir.

TBHQ'nun gallatlardan farklı olarak ortamda demir varlığında renk bozulmasına neden olmadığı, ayrıca BHT ve BHA'dan daha az uçucu, yüksek sıcaklığa dayanıklı ve katıldığı yağın ilave edildiği gıdada da etkisini gösterme özelliğinin iyi olduğu ifade edilmektedir. Birçok uygulamada bu antioksidanın diğer yapay antioksidanlara kıyasla en iyi etkiyi gösterdiği belirtilmektedir. Bunun ilk örneklerinden birisinin de Malezya'dan Avrupa'ya taşınan ham hurma yağı olduğu belirtilmektedir. Ham hurma yağını gemiye yüklemeye önce çok yüksek olmayan sıcaklıklarda, düşük nemde ve sıvı olarak tutmak oksidasyonu engellemede iyi bir etki sağlamaktadır. Taşınma sırasında gemi tanklarının azot gazı ile doldurulması ise oksidasyon derecesini büyük ölçüde düşürmekle, aynı zamanda TBHQ kullanımı da avantaj sağlamaktadır. Bu uygulamada TBHQ ile sitrik asidin kombine olarak kullanımının, bu maddelerin ayrı ayrı kullanımından daha iyi sonuç verdiği ve optimum doz olan 110 ppm TBHQ ve 365 ppm sitrik asidin hurma meyvesinden yağ elde edildikten hemen sonra katılması gerektiği belirtilmektedir. Bu şekilde elde edilen rafine hurma yağının istenilen

renk standartlarında üretmenin yanı sıra, okside ham yağ miktarı azaldığı için gerekli olan ağartma toprağı maliyetinin de düştüğü bildirilmiştir. Pilot tesis ve laboratuvar bazındaki denemelerde de TBHQ'nun oksidasyon reaksiyonunun hızını önemli ölçüde yavaşlattığı kanıtlanmış TBHQ'nun ayçiçek yağında da BHA ve BHT'den daha yararlı etki gösterdiği ifade edilmektedir. Ayçiçek yağının kısmi hidrolizasyonu sonucunda lezzet stabilitesinde de artış meydana gelmektedir. Böylece hem bu yağın hem de bu yağlarda kızartılan gıdaların oksidasyona dayanıklılığı artmaktadır.

2.3.2.6. Nordihidroguairatik Asit (NDGA)

Nordihidroguairatik Asit (NDGA), ilk olarak 1942 yılında kuvvetli antioksidan özelliği gösteren bir madde olarak laboratuvarla sentezlenmiştir. 4,4'-(2,3-dimetiltetrametilen) dipirokateşol ($C_{18}H_{22}O_4$) yapısındaki NDGA, beyaz veya grimsi beyaz kristalimsi bir maddedir.



Şekil 2.8 Nordihidroguairatik asidin kimyasal yapısı (Patterson,1989)

Nordihidroguairatik asit (NDGA)'in en önemli özellikleri gallatlarda olduğu gibi ısıya karşı duyarlı olması ve kalıntı demir ile renk bozulmasına neden olabilmesidir. Bu maddenin gıdalarda kullanımına ülkemiz de dahil olmak üzere pek çok ülkede izin verilmemektedir (Gür, E. ve Altuğ, T., 2001; Öner, Y., Tuz, U., Güleç, S., 2004;<http://www.bitkisel-tedavi.com>)

2.4 ANTİOKSİDANLARIN GIDALARDA KULLANIM ALANLARI

2.4.1 Eritilmiş Hayvansal Yağlar

Yenilebilen ve yenilemeyen katı yağlar ile yüksek oranda hayvansal yağ içeren şorteningler olarak tanımlanan bu yağlar düşük doymamışlıklarının yanı sıra, minimum doğal stabiliteye sahiptirler. Bu yağlar genellikle fırınlanmış ürünlere katılmakta ve antioksidan kullanılabilir. Yağların kullanıldıkları üründe maksimum koruma gerektiğinde yüksek oranda BHA içeren karışımlar kullanmak gerekmektedir. Bu tip yağlarda sitrik asit (CA) metallere karşı şelat ajanı olarak kullanılmaktadır. Ticari uygulamalarda kullanılan en uygun antioksidan kombinasyonunun %20 BHA + %6 propil galat + %4 sitrik asit içeren karışım olduğu belirtilmektedir. Bu karışım hem raf ömrü, hem de yağın kullanıldığı üründe oluşturulan stabilite açısından oldukça etkili olup %10 BHA + %10 BHT + %6 propil galat(PG) + %6 CA içeren karışımlarda hem hayvansal hem de bitkisel yağlar kullanılarak elde edilen şorteninglerde de kullanılabilir. Hayvansal katı yağlar bünyelerinde çok az miktarda antioksidan içerdiklerinden bunlara yapılan tokoferol ilavesi oksidatif stabiliteyi oldukça arttırmaktadır. Hayvansal katı yağlarda antioksidanların etkinlikleri; TBHQ>PG>BHA>BHT>Tokoferol şeklinde sıralanmaktadır.

Antioksidan çözeltilerinin hayvansal yağlara ilave edilmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Yöntem seçiminde işletme ortamı, eritilecek katı yağ miktarı, kullanılacak ekipmanlar gibi faktörler etkili olabilmektedir. Büyük uygulamalarda antioksidan karışımları sıcak katı yağ akışkan olduğu sırada boru hattına bir pompa yardımı ile enjekte edilerek katılmaktadır. Bu tekniğin başarılı olması antioksidan – katı yağ karışımının birlikte dolaştığı süre ve dolaşımı sağlayan pompanın yarattığı türbülansa bağlıdır. Depolama tanklarında bekletilen az miktardaki hayvansal yağlara antioksidan direkt olarak ilave edilebilmektedir. Bu teknikte yağ, 63-79 ° C ye ısıtılmakta ve bütün yağın hareket edebileceği uygun bir karıştırıcı ile karıştırılmaktadır. Karıştırma çok kuvvetli olmamalı ancak yağdaki artık havayı çıkartmaya yetecek şekilde ayarlanmalıdır. Karıştırma ile bütün yağ harekete başladığı sürede antioksidan yavaş olarak (1 galon/ 5-10 dk) ilave edilmektedir. Homojen bir karışımın sağlanması için karıştırma yaklaşık olarak 20 dk daha devam etmelidir. Bazı durumlarda da antioksidanlar yüksek konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra ürünlere konsantre edilmiş olarak katılmaktadır (% 10 antioksidan içeren yağ karışımları gibi). Sıcak haldeki konsantre edilmiş materyal boru hattına ya da direkt ilave şeklinde katı yağlara katılabilmektedirler.

2.4.2 Bitkisel Yağlar

Bu gruba yenilebilen ve yenilemeyen sıvı yağlar ile yüksek oranda katı yağ içeren şorteningler girmektedir. Bu tip yağlar çok yüksek orandaki kimyasal doymamışlıklarının yanında genellikle bir miktar doğal antioksidan içermektedirler. Yüksek doymamışlıklarından ötürü bitkisel yağları normal miktarlardaki antioksidanlar ile stabilize etmenin güçlüğüne yanı sıra bazen çok yüksek antioksidan konsantrasyonları daha etkili olmaktadır. Bu tip çoklu doymamış yağlar için PG ve NDGA gibi çok sayıda hidroksil (OH) grubu içeren antioksidanların uygun olduğu ve maksimum stabiliteyi sağlamak amacıyla bunların izin verilen en yüksek oranlarında kullanılmaları gerektiği belirtilmektedir. Hidrojene rafine yağ kullanılan hamur işleri diğer fırınlanmış ürünlerde ve şorteninglerde maksimum raf ömrünü sağlamak için BHA, BHT, PG ve CA' nın birlikte kullanıldığı kombinasyonların etkili olduğunun kanıtlandığı ifade edilmektedir.

%20 PG ve %10 sitrik asit içeren antioksidan karışımları kızartmalık yağların stabilizasyonunda veya raf ömrünün yağın stabilizasyonu için tek bir kriter olduğu durumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hem başlangıç hemde yağda hazırlanmış ürün stabilitesinin istenildiği durumlarda %10 BHA + %10 BHT + %6 PG+ %6 sitrik asit karışımlarının izin verilen maksimum sınırlarda kullanılması gerekmektedir. TBHQ' nun ise bitkisel yağlarda çok etkili olduğu belirtilmektedir. Yapay antioksidanların etkileri konusunda yapılan çalışmalar sonucunda bunların etkilerinin TBHQ>PG>BHT>BHA şeklinde sıralanabileceği belirlenmiştir.

Antioksidan karışımları bitkisel yağlara birçok uygulamada boru hattına pompa yardımı ile deodorizasyondan hemen sonra enjekte edilmektedir. Deodorizasyondan önce bekletilmesi gereken yağlara antioksidan karışımları bu aşamalarda ilave edilerek depolama sırasında oluşabilecek parçalanmalar önlenebilmektedir. Deodorizasyon aşamasında bunlar ortamdaki uzaklaştığı için maksimum stabilitenin sağlanması amacı ile deodorizasyondan hemen sonra ortama tekrar antioksidan katılması gerekmektedir. Birçok metalin katalitik etkisini azaltmak için askorbik asit ve diğer şelat ajanları işlemler sırasında bitkisel yağlara ilave edilmektedir.

2.4.3 Yüksek oranda katı yağ içeren yağlar

Patates cipsleri, fındık ezmesi gibi bu kategoriye giren ürünler genellikle yağda kızartılarak elde edildikleri için %50'ye kadar katı ve sıvı yağ içerebilmektedirler. Bu kızartma işlemlerinde bitkisel yağlar ve şorteningler kullanılmaktadır. Hamur işleri, pastalar ve tatlılar

gibi %8-%10 yağ içeren gıdalarda bu gruba dahil edilmektedir. Ancak bu tip durumlarda hazırlama aşamasında hayvani yağ şorteninglerinin kullanılması gerekmektedir.

Bu tip gıdalarda antioksidan seçiminde kullanılan katı yağın cinsi ve ürünün yapılma hazırlanma aşamasındaki işlem şartlarının da dikkate alınması gerekmektedir. Yağda kızartma işleminde kullanılan bitkisel yağlarda veya şorteninglerde %10 BHA + %10 BHT+ %6 PG + %6 sitrik asit içeren antioksidan karışımının en fazla etkiyi gösterdiği ifade edilmektedir. Hayvansal katı yağlar veya hayvansal şorteringler kullanıldığında ve özellikle alkali ortamlarda (değişik hamur işleri ve fırınlanmış ürünler), BHA+PG+CA karışımları uygulanmaktadır. Antioksidan karışımlarının bitkisel veya hayvansal yağlara kızartma işleminden önce katılması gerekmektedir. Kızartma işlemlerinde antioksidan kullanarak, yağın bu işlemde oluşabilecek yüksek sıcaklıklarda oksidasyonu engellenebilmektedir. Fenolik tipteki antioksidanlar buharla destile olabildiklerinden, derin yağda kızartma işlemleri sırasında sürekli olarak antioksidan ilavesi gerekmektedir. Modern tip kızartıcılarda gıda ve yağ oranı çok yüksek olduğu için taze yağın kızartma işleminde sürekli olarak ilave edilmesi önerilmektedir. Bu şekilde ortama sürekli olarak taze antioksidan da katılabilmektedir.

2.4.4 Düşük oranda katı yağ içeren gıda ürünleri

Kahvaltılık hububatlar, dehidre patatesler ve bazı kek karışımları bu tip gıdalara örnek olarak verilmektedir. Bunlar yağ içerdikler %1-2 veya daha az olan bitkisel kaynaklı ürünlerdir ve BHA ve BHT gibi antioksidanlar ile stabilize edilebilmektedirler. Bu tip gıdalarda karşılaşılan en önemli problem düşük miktarlardaki antioksidanın yağ ile temas ettirilme zorunluluğudur. Bu yağlar gıdaların ana komponentlerinden olan karbonhidratlara disperse olmuş fosfolipidlerdir.

Kahvaltılık hububatlar ve dehidre patateslerde, önemli oranda doğal antioksidan bulunmaktadır. BHA ve BHT ikincil yada sinerjist antioksidan olarak işlev görmektedir ve CA gibi şelatlarla gereksinim duyulmamaktadır. Bu tip ürünlerde kristal halde BHA ve BHT kullanılmasına rağmen uygun bir çözgen içersinde %20 BHA ve %20 BHT kombinasyonlarında etkili olabilmektedir. PG nem oranı yüksek ortamlarda doğal olarak oluşabilen metallerle renkli metal kompleksleri meydana getiremedikleri için uygulanamamaktadır. Bazı durumlarda antioksidanlar pişirme ve dehidrasyona bağlı olarak patateslerde ve hububat karışımlarında buharlaşma ve buhar destilasyonu ile ürünlerin içine disperse olabilmektedir. Bu teknik ile diploma ve işlemler sırasında stabilize

kazandırılmaktadır. Bu Şekilde katı ve sıvı yağların içine yayılabilen çok az miktardaki antioksidan bile belirgin derecede koruma sağlayabilmektedir. Aksi takdirde ürünlerin korunması için ambalaj metaryaline yüksek oranda antioksidan ilave etmek gerekmektedir. Bu durumda antioksidan paketleme metaryelinin yüzeyine doğru hareket etmekte ve buharlaşmaktadır. Buhar fazında ise paketlenmiş ürünün içerisine dispers olmakta ve ürüne belirgin bir koruma sağlamaktadır. Bazı durumlarda bu iki teknikten kombinasyon durumunda yararlanılmaktadır. Bu konuda uygulanan bir diğer işlem ise , emilsüyon halindeki antioksidanın bitmiş ürüne paketleme işleminden hemen önce püskürtülmesidir. Ancak bu teknik; indirekt yöntem olmasına rağmen, çok az miktarlardaki antioksidanın geniş bir yüzey alanına sahip olan gıdanın üzerine homojen Şekilde disperse olması güçlüğü nedeni ile kalite kontrol açısından problem oluşturabilmektedir.

2.4.5 Şekerlemeler

Şekerlemelerde kullanılan birçok ingrediyeht kolaylıkla bozulabilmektedir. Örneğin süt tozu, süt, katı ve sıvı yağlar, fındık fıstık türü maddeler ve esansiyel yağlar tat ve kokunun kaybolmasına veya istenmeyen kötü koku oluşumuna neden olan değişik tipte bozulmalara maruz kalabilmektedir. Herhangi bir ingrediyehtin stabilitesindeki zayıflık bitmiş üründe bozulmaya neden olabilmektedir. Antioksidanlar değişik tip şekerlerde acılaşmayı engelleyici olarak kullanılmaktadır. Antioksidan uygulaması stabilize edilecek katı yağın tipine bağlı olarak değişmektedir. Örneğin değişik çeşit fıstıklar, şekere ilave edilmeden önce stabilize edilmelidirler. Tereyağının BHA ve BHT kombinasyonları kullanılarak stabilize edilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda şekerlerde lezzet arttırmak amacı ile kullanılacak olan esansiyel yağların da stabilize edilmeleri gerekmektedir.

2.4.6 Et ürünleri

Et ve et ürünlerinde kalite bozulmalarının en belirgin şeklinin yapılarında bulunan lipidlerin veya yağ içeren kısımlarının oksidasyonu olduğu belirtilmektedir. Etin öğütülmesi, ezilmesi ve yapısındaki lipidlerin oksidasyona maruz kalması oksidasyona karşı eğilimin sebepleri arasında yer almaktadır. Ayrıca ette bulunan hem pigmenti lipidler ile etkileşmekte ve oksidasyonu katalizlemektedir. Özellikle yüksek oranlardaki tuz, dondurarak depolamada oksidasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda gıdalarda kullanılan antioksidanların sığır eti, domuz eti, kümes hayvanları ve balıkta oksidatif bozulmayı engelledikleri ifade edilmektedir.

Et ürünlerindeki uygulamalar, antioksidanın parçalanmış etlere disperse olması ilkesine dayanmaktadır. Ticari uygulamalarda bu işlem BHA ve CA içeren tuz kullanılarak, bu maddelerin kristallerinin yüzeyine disperse olmaları ile tamamlanmaktadır. Antioksidan ile muamele edilmiş tuz, et emülsiyonu içinde karışmakta ve böylece yağlı doku içinde çözünmektedir. Bu ürünlerde karşılaşılan problemlerden en önemlisinin antioksidan ile etin yağının temasının sağlanması olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle antioksidan kesilmiş, kıyma haline getirilmiş veya ezilmiş (öğütülmüş) ürünlerde daha etkin sonuçlar vermektedir.

ABD’de kurutulmuş etlerde, kuru ve taze domuz sosislerinde ve eritilmiş hayvansal katı yağlarla kombinasyonunda antioksidan kullanımına izin verilmektedir. Et ürünleri %50 civarında yağlı doku içerebilmektedir. Bunlar hemoglobin içermelerine rağmen antioksidan uygulamalarından olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Bu tip uygulamalar için; %20 BHA ve %10 CA içeren karışımların uygun olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. BHA’nın bir metal şelatlama ajanı olan CA ile beraber kullanılması sonucunda taze domuz sosislerinin oksidatif stabilitelerinin arttığı belirtilmektedir. Dondurularak kurutulmuş etlerin hızlı bozulmasına neden olan lipid oksidasyonunu engellemek amacı ile yapılan çalışmalarda ise antioksidanların özellikle dondurarak kurutulan jambonlarda etkili oldukları belirlenmiştir.

2.4.7 Balık ve balık ürünleri

Ticari uygulamalar açısından gıdalarda kullanımı uygun antioksidanların deniz ürünlerinde kullanımlarının başarılı olmadığı bilinmektedir. Bu durumun birçok balık yağının trigiliserid ve fosfolipidlerinin yüksek doymamışlığından, hem pigmentleri gibi doğal katalizörlerin varlığından ve uygun olmayan yöntemlerin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Doğal balık yağlarının A ve D vitaminlerinin en önemli bir kaynağı olması ve bu vitaminlerin bazı oksidatif yan ürünleri ile degrade olabilmeleri nedeni ile bu bozulmayı engellemek için antioksidanlar kullanılmaktadır. Vitamin A ve D’nin degradasyonunun engellenmesinde BHA, PG, ve CA içeren karışımların etkili olduğu belirtilmektedir. Eski yıllarda vitamin içeren yağların enkapsülasyon tekniği ile bir jel içerisinde korundukları ve bu teknik sayesinde, oksijen ile temasın kesilerek buna bağlı oluşan degradasyonların engellendiği ifade edilmektedir.

Yüksek oranda doymamış yağ asitleri içeren balık yağlarında, PG ve diğer galatların antioksidan olarak etkili olduğu bulunmuştur. Ancak söz konusu yağların şelatlanmayan

yüksek oranda demir içermeleri nedeniyle demirin galatlarla, mavimsi siyah galat kompleksini oluşturması sonucunda renk bozulmaları oluşturmaktadır. Bunlara bağlı olarak sadece bazı antioksidanlar ticari amaçla balık yağlarının stabilizasyonunda kullanılmaktadır. Balık ürünlerinde meydana gelen en önemli bozulmaların mikrobiyolojik kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Oksidasyonun büyük önemi olmamasına rağmen, bozulmanın ilk algılanışı oksidasyona bağlı acılaşma ve bunun sonucunda oluşan kötü lezzettir. Donmuş balıklarda acılaşma ve paslanma iki temel oksidatif bozulma olarak gerçekleşmektedir. Bu renk bozulmasının Maillard veya aldehit-amin tipi bir reaksiyona bağlı olduğu bilinmektedir. Ancak bu konudaki çalışmaların tamamlanmadığı ifade edilmektedir.

Donmuş balık filetolarına antioksidanların etkinliğinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Balık yağlarının yüzey tabakasının altında balığın iç kısımlarında olması nedeni ile filetonun antioksidan çözeltisine daldırılması veya bir emülsiyonun donmuş balığın dış yüzeyine püskürtülmesi sonucunda balık yağı ile antioksidan arasında çok az bir temas meydana geldiği düşünülmektedir. Kurutulmuş yağlı balıklarda ise antioksidan kullanabilmektedir. Antioksidanlar kurutma işleminden hemen sonra ilave edilmekte ve böylece depolama ve nakliye sırasında oksidasyon engellenmektedir. Antioksidan ilavesi kurutma işleminden hemen sonra vidalı konveyörlerde püskürtülerek yapılmakta ve burada antioksidan ile balık endüstrisinde üretim teknikleri kesikli sistemden sürekli hale dönüşmüştür.

İşlenmiş hayvansal dokularda, hem yağda çözünebilen (BHA, BHT) hem de suda çözünebilen (askorbik asit, sitrik asit) antioksidanlar oksidatif acılaşmayı engelleyebilmektedir. Ancak bu antioksidanlar özellikle bozulmaya ve raf ömrünün kısalmasına neden olan bakteriler üzerine çok fazla etkili olamamaktadır. Bunun yanısıra bakterilerin gelişmesini engellemek için kullanılan ajanlar, bakteri gelişimi ile oluşan indirgen maddelerin üremesini engellediklerinden oksidatif acılaşmayı kolaylaştırmaktadırlar. Bu nedenle az miktarda sorbik asit ve/veya onun suda çözünen tuzları, bir antioksidan ile beraber taze balık dokuları üzerine uygulandığında, buzdolabı sıcaklıklarında bozulmaya neden olan bakterilerin gelişimi engellenirken, antioksidan kullanımı ile oksidatif acılaşmayı önlemek de mümkün olabilmektedir.

2.4.8 Esansiyel yağlar

Portakal yağı, limon yağı ve terpen benzeri lezzet verici yağlar, fosfolipidler ve trigliseridler gibi serbest radikal oksidasyonuna uğramaktadırlar. Gıdalara katılan antioksidanlar, bu yağlarda kullanıldıklarında lezzet ve koku maddelerindeki bozulmaları azaltmakta etkili olmaktadır. Bu amaçla BHA'nın diğer antioksidanlar içerisinde en fazla etkiye sahip olduğu ve genellikle yağın cinsine bağlı olarak yaklaşık % 0.3 oranında kullanıldığı ifade edilmektedir. Antioksidanların oksidasyonu engellemek amacı ile esansiyel yağlara işlemden hemen sonra ve mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda ilave edilmeleri gerekmektedir.

2.4.9 Çiklet hamuru

Çiklet hamurları doymamış bileşenlere sahip polimerler ve petrol mumları içermekte ve bu maddeler sürekli oksidasyona maruz kaldıklarında, polimerlerin çapraz bağlanması ile ilişkili olarak oldukça kırılgan bir yapı oluşmaktadır. Bu şekilde istenilmeyen lezzet ve koku maddeleri oluşabilmekte ve ancak antioksidan kullanımı ile bu tip bozulmalar engellenebilmektedir. BHA ve BHT bu uygulamalarda kullanılan en önemli antioksidanlar olup çiklet hamurunun üretimi sırasında ilave edilmeleri gerekmektedir.

2.4.10 Kızartma işlemlerinin uygulandığı gıdalar

Patates ve mısır cipsleri gibi kızartma işlemi uygulanan gıda ürünleri yaklaşık %50 civarında yağ içermektedir. Bu tip gıdaların çok geniş yüzey alanları da bulunmakta olup acılaşıma nedeni ile kalitelerinde bozulmalar oluşmaktadır. TBHQ genellikle kızartmalık yağları oksidasyona karşı etkili bir şekilde korumakta ve kızarmış gıda ürününde de koruyucu etki meydana getirmektedir. TBHQ'nun kullanımına izin verilmediği durumlarda ise BHA, BHT ve PG'in değişik kombinasyonlarının sinerjistik etkilerinden yararlanılmaktadır. Hayvansal katı ve sıvı yağların kullanıldığı kızartma işlemlerinde tokoferoller ısıya dayanıklılıkları ve uçuculuğa karşı dirençlerinden dolayı oldukça etkili olmakta ve kızarmış gıdada mükemmel bir koruyucu etki meydana getirmektedirler.

2.4.11 Fırında pişirme işleminin uygulandığı gıdalar

BHA, BHT ve tokoferoller gibi antioksidanlar fırında pişirilen gıdalar üzerinde sürdürdükleri etkilerden dolayı fırında pişirme işlemlerinde kullanılacak yağlara ilave edilmektedir. Ancak fırınlama işlemindeki kullanımdan önce depolama sırasında da stabilite sağladıklarından TBHQ ve PG'in sıvı ve katı yağlarda kullanımları uygun olmaktadır. Bu nedenle, fırında

pişirme uygulamalarında kullanılacak katı ve sıvı yağlara BHA, BHT, PG ve TBHQ'nun karışımları katılarak sinerjistik etki oluşturulmaktadır.

2.4.12 Fındık, fıstık türü ürünler

Bu tip ürünler gıdalara, şekerlemelere veya hububattan elde edilen ürünlere bileşen olarak katılmaktadırlar. Antioksidanların fıstık çekirdeği ve parçaları üzerine de antioksidatif etkileri mevcut olup TBHQ'nun özellikle fıstıktan elde edilen katı yağların üzerinde daha fazla etkili olduğu belirtilmektedir.

2.4.13 Hububatlar

Hububatlar; kahvaltılık kuru gıdalar, şekerler, şekerlemeler ve gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hububatların lipid oranlarının oldukça düşük olmasına karşın içerdikleri lipidlerin doymamışlığı yüksek, dayanıklılığı ise oldukça azdır. Ekstrüzyon, kızartma ve fırında pişirme gibi ısı işlemleri de bu tip gıdaların stabiliteelerini azaltmaktadır. Kahvaltılık kuru gıdalarda kullanılan hububatlar genellikle ambalaj materyallerine katılan BHA ve BHT gibi antioksidanlarla stabilize edilmektedir. Uygun buhar basıncına sahip BHT buharlaşarak paketlenme materyalinden hububata geçmekte ve bu şekilde bir koruma sağlamaktadır.

2.4.14 Ham bitkisel yağlar

Her ne kadar birçok ham bitkisel yağ yapılarında bulunan tokoferol, fosfolipid ve karoten gibi doğal antioksidanlar tarafından korunabilmekte ise de, bunlarda özellikle depolama, taşıma ve rafinasyon sırasında önemli bozulmalar meydana gelebilmektedir. Bu tip ürünlere TBHQ ilavesiyle peroksit oluşumunun engellenmesi, karotenin ve doğal olarak bulunan tokoferollerin korunması sağlanmaktadır.

Bu antioksidatif etkilerin ekonomik yararlarına çevrilebilmesi sonucu oluşan avantajlar,

- Depolama süresinin artması,
- Rafinasyon kayıplarının azalması,
- Ağartma toprağının kullanımının azalması,
- Rafine yağın stabilizesinin artması olarak sıralanabilmektedir.

TBHQ ile muamele edilen ham yağlara rafinasyon işlemi uygulandığında, bu işlem sırasında TBHQ tamamen ortamdan uzaklaşmakta ve elde edilen rafine yağda antioksidan bulunmaktadır. Bu nedenle de rafinasyon sırasında depolanacak olan yağa tekrar antioksidan ilavesi gerekmektedir.

2.4.15 Gıda ambalajları

Ambalaj materyallerinin gıdalara antioksidan ilavesinde etkili bir yol oldukları ifade edilmektedir. Antioksidanlar, mum, parafin ve polimerler içinde veya emülsiyon halinde gıda ambalajlarına ilave edilmekle ve buharlaşma yolu ile de gıdaların içine geçiş sağlanmaktadır. Bu yöntemin etkin bir yol olmamasına rağmen oldukça yaygın olduğu belirtilmektedir. BHA ve BHT'nin paketleme uygulamalarında oldukça etkili oldukları ifade edilmektedir. Kullanılacak antioksidan miktarı ise paketleme materyalinin büyüklüğüne, tipine ve gerekli olan stabiliteye göre değişmektedir (Gür, E. ve Altuğ, T., 2001; Keskin, H., 1987).

Çizelge2.1 Kullanılmasına izin verilen antioksidanlar ve kullanım alanları

ANTIOKSİDANLAR		
Numara	İsim	Yorum
E300	Askorbik asit	Antioksidan. 'C vitamini'; sentetik olarak glukozdan sağlanabilir, doğal olarak sebze ve meyvelerde bulunur; et, unlu ürünler,dondurulmuş balık gibi ürünlerde kullanılır.
E301	Sodyum askorbat	Antioksidan. C vitamini'nin sodyum tuzu
E302	Kalsiyum askorbat	Antioksidan. C vitamini'nin kalsiyum tuzu, 'kalsiyum oksalat' taşlarının oluşumunu hızlandırabilir.
E303	Potasyum askorbat	Antioksidan. C vitamini'nin potasyum tuzu
E304*	Askorbil palmitat,	Antioksidan. Askorbik asitin yağlı esteri.
E306*, E307*, E308*, E309*	Tokoferoller	Antioksidan. 'E vitamini'; soya, buğday, pirinç, pamuk tohumu, mısır gibi birçok sebzenin ve hayvanların yağında bulunur; margarin ve salata soslarında, ilaç ve kozmetik ürünlerinde kullanılır.
E310	Propil gallat	Antioksidan. Gastrit ve cilt tahrişine neden olabilir, kandaki hemoglobine zarar verdiği için bebek ve küçük çocuk gıdalarında izin verilmemiştir; yağ, margarin ve salata sosunda kullanılır.
E311*	Oktil gallat	Bakınız: E310
E312*	Dodesil gallat	Bakınız: E310
E317	Eritorbik asit	Antioksidan. Sakkarozdan üretilir.
E318	Sodyum eritorbat	Antioksidan.
E319	Tert-Butilhidroquinon (TBHQ)	Antioksidan. Petrol kökenli; HACSG ¹ sakınılmasını öneriyor; bulantı, kusma ve sayıklamaya neden olabilir, 5 gramlık bir doz öldürücü sayılır; yağ ve margarinlerde kullanılır.

E320*	Butillenmiş hidroksi-anisol (BHA)	Antioksidan. Petrol kökenli; yenilebilen yağlarda, çiklet, margarin, fındık, patates ürünleri ve polietilen gıda ambalajlarında kullanılır, bebe mamalarında izin verilmemiştir, alerjik reaksiyon yapabilir, hiperaktiviteye, kanserojen, estrogen etkilere ve diğer olumsuzluklara sebep olabilir.
E321*	Butillenmişhidroksi-toluen (BHT)	Antioksidan. Bakınız: E320
E322*	Lesitin	Antioksidan. Emilgator.Soya fasulyesi, yumurta sarısı, yerfıstığı, mısır veya hayvani yağlardan elde edilir. margarin, çikolata, mayonez ve süt tozunda kullanılır; bitkisel tipi tercih edilmelidir.
E325*	Sodyum laktat	Antioksidan. Laktik asidin tuzu. Hayvani kökenli.
E326*	Potasyum laktat	Bakınız: E325
E327*	Kalsiyum laktat	Bakınız: E325
E328*	Amonyum laktat	Bakınız: E325
E329*	Magnezyum laktat	Bakınız: E325
E330	Sitrik asit	Antioksidan. Gıda asidi, doğal olarak turuncgillerden elde edilir, bisküvi, konserve balık, peynir ve peynir ürünleri, bebe maması, kek, çorba, çavdar ekmeği, içecekler ve mayalanmış et mamullerinde kullanılır.
E331	Sodyum sitratlar	Antioksidan. Gıda asidi.
E332	Potasyum sitratlar	Antioksidan. Gıda asidi.
E333	Kalsiyum sitratlar	Antioksidan. Gıda asidi.
E334	Tartarik asit	Antioksidan. Gıda asidi.
E335	Sodyum tartaratlar	Antioksidan. Gıda asidi.
E336	Potasyum tartaratlar	Antioksidan. Gıda asidi.
E337	Sodyum potasyum tartarat	Antioksidan. Gıda asidi.
E338	Fosforik asit	Antioksidan. Gıda asidi.
E339	Sodyum fosfatlar	Antioksidan. Mineral tuz; eczacılıkta müşhil olarak, yüksek dozlar vücuttaki kalsiyum-fosfor dengesini bozabilir
E340	Potasyum fosfatlar	Bakınız: E339
E341*	Kalsiyum fosfatlar	Antioksidan. Mineral tuz; kaya ve kemikte bulunur
E343	Magnezyum fosfatlar	Antioksidan. Mineral tuz.

Çizelge 2.1 devamı

E350	Sodyum malatlar	Antioksidan. Mineral tuz.
E351	Potasyum malat	Antioksidan. Mineral tuz.
E352	Kalsiyum malatlar	Antioksidan. Mineral tuz.
E353	Metatartarik asit	Antioksidan. Gıda asidi.
E354	Kalsiyum tartarat	Antioksidan. Mineral tuz.
E355*	Adipik asit	Antioksidan. Gıda asidi.
E357*	Potasyum adipat	Antioksidan. Mineral tuz
E363	Suksinik asit	Antioksidan. Gıda asidi. Bazı ülkelerde yasaklandı
E365	Sodyum fumarat	Antioksidan. Mineral tuz
E366	Potasyum fumarat	Antioksidan. Mineral tuz
E367	Kalsiyum fumarat	Antioksidan. Mineral tuz
E370	1,4-Heptonolakton	Antioksidan. Bazı ülkelerde yasaklandı
E375	Niasin	Antioksidan. B3 vitamini; doğal olarak fasulye, bezelye ve diğer baklagillerde, süt, yumurta, et, kümes hayvanları ve balıkta bulunur; doz aşımı halinde şeker hastalığı, gastrit, karaciğer ve göz zararları ve gut hastalığına yol açar, kandaki ürik asit seviyesinin yükselmesine neden olabilir; ciltte kızarıklıklar, özellikle aç karnına alınmış ise baş ve mide ağrısı yapabilir
E380	Tri-amonyum sitrat	Antioksidan. Mineral tuz.
E381	Amonyum ferrik sitratlar	Antioksidan. Mineral tuz.
E385	Kalsiyum disodyum etilen	Antioksidan. Bazı ülkelerde yasaklandı

* Bitkisel veya hayvansal kökenli olabilir. Bu sebeple şüpheli kabul edilen katkıları gösterir (<http://www.gidaraporu.com>).

2.5 ANTİOKSİDANLARLA İLGİLİ YASAL DÜZENLEMELER

Çizelge 2.2 Kullanımı yasal olarak düzenlenmiş antioksidan çeşit ve miktarları
(Resmi Gazete,1990)

E.C.	Maddenin Adı	Kullanılacağı Mamül	Maksimum Miktar	Açıklama
E 306	Doğal ve Sentetik α -Tokoferol ve tokoferol karışımları	Rafine zeytinyağı	200 mg/kg	
		Katı ve sıvı bitkisel yağlar	UTG (GMP)	
		Margarinler	UTG (GMP)	
		Mayonez	UTG (GMP)	
		Cikletler	UTG (GMP)	
		Soslar	UTG (GMP)	
		Alkolstüz içecekler	UTG (GMP)	
E 300	Askorbik Asit	Meyve konserveleri	550 mg/kg	Tek başına veya izo askorbik asit ve bunların tuzları ile kombine halde askorbik asit üzerinden hesaplanarak
		Mantar ürünleri	UTG (GMP)	
		Ekmek	75 mg/kg	
		İçecek tozları	UTG (GMP)	
		Mantar konserveleri	UTG (GMP)	
		Sofralık zeytinler	200 mg/kg	
		Reçel, jöle ve marmelatlar	500 mg/kg	
		Margarinler	UTG (GMP)	
		Alkolstüz içecekler	UTG (GMP)	
		Kakaolu mamüller	300 mg/kg	
		Et ürünleri	500 mg/kg	
		Bisküvi, gofret, kek, kurabiye, pasta vb.	100 mg/kg	
		Ketçap ve soslar	UTG (GMP)	
		Şekerlemeler	UTG (GMP)	
E304	Askorbil Palmitat ve Askorbil Stearat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	200 mg/kg	Tek başına veya karışım halinde
		Margarinler	200 mg/kg	
		Soslar	200 mg/kg	
E320	Butillendirilmiş Hidroksi Anisol (BHA)	Et suyu tabletleri	500 mg/kg	Yağdan gelen, tek başına veya BHT yada gallatlarla karışım halinde
		Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	
		Margarinler	100 mg/kg	Tek başına veya BHT yada gallatlarla karışım halinde yağ bazında
		Badem ezmesi vb.	100 mg/kg	
		Bisküvi, gofret, kek, kurabiye, pasta vb.	100 mg/kg	
		Patates cipsi	50 mg/kg	

Çizelge 2.2 Devamı

E320	Butilendirilmiş Hidroksi Anisöl (BHA)	Cikletler	750 mg/kg	Tek başına veya BHT yada gallatlarla karışım halinde yağ bazında
		Şekerli cikletler	300 mg/kg	
		Çerezler	50 mg/kg	
		Et suyu ve ekstraktı içeren kuru hazır çorbalar	50 mg/kg	
E321	Butilendirilmiş Hidroksi Toluen (BHT)	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	Tek başına veya BHT yada gallatlarla karışım halinde yağ bazında
		Margarinler	100 mg/kg	
		Kakao lu mamüller	100 mg/kg	
		Bisküvi, gofret, kek, kurabiye, pasta vb.	100 mg/kg	
		Cikletler	750 mg/kg	
		Şekerli cikletler	300 mg/kg	
		Hazır çorbalar	100 mg/kg	
		Çerezler	50 mg/kg	
		Et suyu tabletleri	50 mg/kg	
		Potates cipsi	50 mg/kg	
E312	Dodesil Gallat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	Tek başına veya propil ve oktil gallatlarla birlikte
		Margarinler	100 mg/kg	Tek başına veya gallatlarla BHT, BHA ile karışım halinde
		Cikletler	750 mg/kg	
		Şekerli cikletler	300 mg/kg	
E311	Oktil Gallat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	Tek başına veya propil, dodesil gallatlarla karışım halinde
		Cikletler	750 mg/kg	Tek başına veya gallatlarla BHT, BHA ile karışım halinde
		Şekerli cikletler	300 mg/kg	
		Margarinler	100 mg/kg	
E310	Propil gallat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	Tek başına veya diğer gallatlar birlikte
		Margarinler	100 mg/kg	Tek başına veya gallatlar BHT, BHA ile karışım halinde
		Cikletler	750 mg/kg	
		Şekerli cikletler	300 mg/kg	
		Potates cipsi	100 mg/kg	Yağdan gelen
		Bisküvi, gofret, kek, kurabiye, pasta vb.	100 mg/kg	
		Çerezler	100 mg/kg	
		Kakao lu mamüller	100 mg/kg	

Çizelge 2.2 Devamı

E310	İso askorbik asit ve sodyum iso askorbat	Meyve konserveeri	500 mg/kg	
		Sofralık zeytinler	UTG (GMP)	
		Et ürünleri	UTG (GMP)	
		Dondurulmuş balıklar	UTG (GMP)	
		Ketçap ve soslar	UTG (GMP)	
		Reçel, jöle ve marmelatlar	UTG (GMP)	
		Alkolstüz içecekler	UTG (GMP)	
	Monogliserid sitrat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	
E301	Sodyum askorbat	Et ürünleri	500 mg/kg	Tek başına veya asiti, isoaskorbid ve isoaskorbatlarla beraber askorbik asit üzerinden hesap edilerek
		Dondurulmuş su ürünleri	1 gr/kg	Asit üzerinden hesap edilerek
	Potasyum askorbat	Et ürünleri	500 mg/kg	Tek başına veya asiti, isoaskorbid ve isoaskorbatlarla beraber askorbik asit üzerinden hesap edilerek
		Dondurulmuş su ürünleri	1 gr/kg	Asit üzerinden hesap edilerek
E331	Sodyum sitrat	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	100 mg/kg	
		Margarinler	100 mg/kg	
		İçecek tozları	100 mg/kg	
E330	Sitrik asit	Katı ve sıvı bitkisel yağlar	UTG (GMP)	
		Margarinler	UTG (GMP)	
		Bisküvi, gofret, kek, kurabiye, pasta vb.	UTG (GMP)	
		Tahin helvası	UTG (GMP)	
		Et ürünleri	UTG (GMP)	
		İçecek tozları	UTG (GMP)	
	Tersiyer butil-hidroksikininon	Sıvı yağlar	200 mg/kg	Propil gallat ile birlikte kullanılmaz
		Margarinler	100 mg/kg	

Çizelge 2.2’de Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu tarafından antioksidan olarak sınıflandırılmış maddelerden, CAC (1997), EC (1995) ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY, 1997)’ne göre kullanımına izin verilenler görülebilmektedir.

Çizelge2.3 CAC ve EC'ye göre gıdalarda kullanımına izin verilen antioksidanlar
(Resmi Gazete, 1990)

INS No	Antioksidanlar	CAC	EC	TGKY
220	Kükürt dioksit	+	+	+
221	Sodyum sülfat	+	+	+
222	Sodyum hidrojen sülfat	+	+	+
300	Askorbik asit	+	+	+
301	Sodyum askorbat	+	+	+
302	Kalsiyum askorbat	+	+	+
303	Potasyum askorbat	+	-	-
304	Askorbil palmitat	+	+	+
305	Askorbil stearat	+	+	+
306	Tokoferol ekstraktları	+	+	+
307	α -Tokoferol	+	+	+
308	β -Tokoferol	+	+	+
309	γ -Tokoferol	+	+	+
310	Propil gallat	+	+	+
311	Oktil gallat	+	+	+
312	Dodesil gallat	+	+	+
315	Eritorbik asit	+	+	+
316	Sodyum eritorbat	+	+	+
319	TBHQ	+	-	-
320	BHA	+	+	+
321	BHT	+	+	+
1102	Glukoz oksidaz	+	-	-

Çizelge2.3'den gözlendiği gibi potasyum askorbat, glukoz oksidaz ve TBHQ gibi antioksidanların gıdalarda kullanımına, EC ve ülkemiz yönetmeliğinde henüz izin verilmemektedir.

2.6 KALİTATİF ve KANTİTATİF TAYİN YÖNTEMLERİ

Iriskina, L.B. ve grubu quersetin ve bunlarla ilgili polifenollerin (doğal polifenoller) antioksidan özelliklerini açıklamak ve bunların tabletlerdeki miktarını saptamak için spektrofotometrik yöntem uygulamışlardır (Iriskina, L.B.Zhusupova,1996).

Miller, N.J. ve grubu antioksidanların aktivitelerinin ölçülmesi için geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile 660, 734 ve 820 nm'deki absorbans değerlerinden yararlanmışlardır. Bu yöntemin kullanılmasıyla 12 antioksidan molar antioksidan aktiviteleri temel alınarak birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Miler, N.J., 1993).

Diplock A.T. , antioksidanların ve peroksit bozunma ürünlerinin tayini için kullanılan HPLC ve spektrofotometrik yöntemleri içeren 17 çalışmayı bir derleme yapmıştır (Diplock, A.T., 1991).

Bea, E.A., ve grubu soya fasulyesinde ve onun yan ürünlerinde bulunan izoflavonlar ve onların antioksidatif etkileri üzerine yaptığı çalışmada ters faz HPLC yöntem ile başlıca antioksidan bileşenlerin miktarını saptamışlardır. Soya fasulyesinde izoflavonların çoğu metanol ile çok az bir kısmı ise su ile ekstrakte edilmiştir. Dört çeşit soya fasulyesinde yapılan çalışmada izoflavon içeriği kahverengi soya fasulyesinde en yüksek miktar olarak tespit edilirken bunu sırayla sarı, küçük siyah ve siyah soya fasulyesindeki değerler takip etmiştir (Bea, E.A.,1997).

Summanen J. ve grubu fenolik antioksidanların ayrılması ve tayini için kapiler zone elektroforez (CZE) ve miceller elektrokinetik kapiler kromatografik (MEKC) yöntemlerini kullanarak rutin laboratuvar tekniklerinin güvenilirliğini arttırmayı amaçlamışlardır. Yöntemleri yiyeceklerin oksitlenmesinin önlemek ve geliştirmek amacı ile kullanılan CZE ile yapılan ön çalışmaların sonuçları yeterli olmayınca MEKC metodu ileri araştırmalar için kullanılmıştır (Summanen, J., 1996).

Irache, J.M. ve grubu yağlı gıdalardaki 7 fenolik antioksidanın tayini için ters faz HPCL yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem margarinlerde bulunan BHA, BHT ve dodesil galat (DG)'in miktar tayinine ve margarinlerin -18, 6, 20 ve 50 ° C depolanmaları sırasında antioksidanların davranışlarını izlemek amacıyla uygulanmıştır (Irache, J.M., 1997)

Abusshita, A.A. ve grubu modern analiz tekniklerini kullanarak en önemli sebzelerden biri olan domateste bulunan antioksidanların (vitamin E, vitamin C ve β -karoten) tayinini gerçekleştirmişlerdir. İon çiftçi kromatografi yöntemi ile mükemmel ayırma saptamışlardır ve yüksek duyarlılık elde etmişlerdir (Abusshita, A.A., 1997)

Tsuruizumi, A. kahve çekirdeklerinden ılık veya sıcak suyla ekstrakte ederek yiyecekler için uygun antioksidan elde etmiştir (Tsuruizumi, A., 1994)

Zbiec, M.A. ve Goszcz, H. sentetik fenolik antioksidanlar olan butil-4-hidroksilanisol (BHA) ve butil-hidroksil tolue (BHT)'nin gıdalarda tayini için iki adımdan oluşan yöntem geliştirmişlerdir.

a. Antioksidanın gıdalardan ekstraksiyonu

b. HPLC ile tayin

Değişik prosedürler ile hazır çorba, çiğnenebilen sakızlar ve yumuşak içeceklerde bulunan BHA ve BHT ekstrakte edilmiş C_{18} kolonda, HPLC yöntemi ile yapılan ölçümlerde deteksiyon limitleri ters faz, sakız ve hazır çorbalarda 0.8-2 mg BHA/kg ve 4-10 mg BHT/kg yumuşak içeceklerde ise 2 mg BHA/L ve 2 mg BHT/L olarak belirlenmiştir. Yöntem marketlerde satılan birçok gıda maddesinde uygulanmıştır (Zbiec, M.A., 1995)

Aeschbach, R. ve Rossi P. çay, baharat, sebze ve kahve gibi bitkilerden antioksidan ekstrakte elde etmek üzere geliştirilen proseslerde elde ettiği sıvı antioksidanların gıda, kozmetik ürünler ve farmasotik emülsiyonlarda koruma amaçlı kullanılabileceğini belirtmiştir (Aeschbach, R., 1996).

Chen, C.W. ve Ho, C.T. yeşil ve siyah çaydan ekstrakte edilen polifenollerin antioksidan özelliklerini BHT ve theaflavinlerle (TF) karşılaştırmışlardır (Chen, C.W., 1995).

Huang, G. ve grubu hazır şehriyelere teotanninlerin antioksidan etkisinin araştırılması üzerine yaptıkları çalışmada teotanninlerin mükemmel antioksidan özellik gösterdiklerini ve optimum miktarın 50 ppm olduğunu belirtmişlerdir (Huang, G., 1996).

Ariga, T. ve grubu üzüm ve çekirdiklerinin 60 ° C 'de su ile 2 saat ve daha sonra 90 ° C su ile ekstraksiyonuyla elde edilen proantosiyanidinlerin gıda ve kozmetikler için faydalı antioksidanlar olduğunu belirterek bu konuda patent almışlardır (Ariga, T., 1991).

Yanishlieve, N.V. ve Marinova, E.M. ayçiçeği yağındaki bazı doğal antioksidanların antioksidatif etkileri üzerine araştırmalar yapmışlardır (Yanishlieve, N.V., 1996).

Takaya I. suda çözünen rutin türevlerinin et ürünlerinde antioksidan olarak kullanılabileceğini, örneğin balık veya tavuk etinde % 0.050-0.250 α G-rutin kullanıldığında oksidasyonu ve koku oluşumunu engellediğini belirtmiştir. (Takaya I., 1993).

Diaz, T.G. ve Cabanillas, A.G. alkil gallatlar (AG), BHA, BHT, TBHQ ve NDGA analiz süresini birkaç saat olacağını belirtmişlerdir (Diaz, T.G., 1996).

Furuta, S., Nishiba, Y. ve Suda, I. sebzelerin antioksidatif etkilerini fluorimetrik yöntemle araştırmışlardır. Yöntemin pigment içeren sebzelerde uygulanabileceğini ve analiz süresinin birkaç saat olacağını belirtmişlerdir (Furuta, S., 1997).

Nieto, S. ve grubu balık yağı oksidasyonuna karşı antioksidan özellik gösteren 6 flavonoidten 5 tanesini yerel Chilean bitkisinden elde ederek saflaştırmışlardır. Flavonoidlerin balık yağı için stabilizer olduklarını ve sentetik antioksidanlara alternatif teşkil ettiklerini bildirmişlerdir. Bu 5 flavonoidi dl- α - tokoferol ve sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA ile karşılaştırmışlardır. Sardunya yağı oksidasyonunda flavonoidlerden olan kateşin, morin ve quersetin'in oldukça yüksek değerlerde antioksidatif etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Araştırma sonuçları birçok flavonoidin doğal antioksidanlar gibi sentetikler yerine kullanılabileceğini göstermiştir (Nieto, S., 1994).

Tan, S. ve grubu kalp rahatsızlığı için kullanılan ilaçlar ve sebzeler için koruyucu olarak kullanılacak antioksidanı (Hesperidin) taze soyulmuş turunçgil kabuğundan 2 N NaOH ile ekstrakte etmişlerdir. Filtrasyondan sonra Hesperidin pH = 4-5'e ayarlayarak çöktürülmüş, çökelti su ile yıkanmış ve kurutulmuş. Çökelti 80°C'de su ile yıkanarak süzölmüş ve oda temperaturünde yeniden kristallendirilmiştir. 10 kg portakal kabuğunda 72.6 g Hesperidin elde edilmiştir (Tan, S., 1993).

Sawamura, M. ve grubu pericorps'den MeOH ve EtOH ile suda çözünen antioksidan ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyon işleminden sonra yağda çözünen kısımlar kloroform, n-hekzan veya her ikisi kullanılarak ayrılmıştır. Elde ettikleri antioksidanın askorbik asitten farklı olduğunu belirtmişlerdir (Sawamura, M., 1993).

Kahless, R. ve Michlbauer, F. bitkilerden (göl, kekik, ada çayı, oregan....) doğal antioksidan ekstraksiyonunu CO₂ ile 10-80⁰C ve 80-300 bar basınçta gerçekleştirmişlerdir. 100 kg gül yaprağından 7 kg sarı renkte kokusuz flavonsuz doğal antioksidan elde etmişlerdir (Kahless, R., 1994).

Xie, B. ve grubu yeşil ve siyah çaydan antioksidan eldesi için önce suyla ekstraksiyon ve sonra kloroform, Et-asetat ve bütanol ile ekstraksiyon yapmışlardır. 8 ayrı fraksiyon elde etmişlerdir. Alkoloidlerin büyük bir kısmını kloroform ile ekstrakte ederken büyük ölçüde önem arz eden flavanoller ise Et-OAc ile ekstrakte etmişlerdir. Thearubiginler, bütanol fraksiyonlarından elde edilmiş ve aminoasitlerin çoğu su fazında kalmıştır. Bütün fraksiyonlar ters faz HPLC yöntem ile analiz edilmiştir. Flavanollerin oldukça güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduklarını belirtmişlerdir (Xie, B., 1994).

Tsuda, T. ve grubu tamarind çekirdek kabuklarından etanol ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın antioksidatif aktivite gösterdiği [tiyosiyanat ve tiyobarbütürik asit, (TBA) metod ile] görülmüştür. Çekirdek kabuklarının Et-OAc ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların ise daha güçlü antioksidatif özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar bize sakız endüstrisinde bir biyolojik ürün olarak kullanılan tamarind çekirdeği kabuklarının güvenli ve düşük maliyetli antioksidan kaynağı olduğunu gösterir (Tsuda, T., 1994).

Kawagishi, S., ve grubu susam tohumlarını sıcak su ile muamele ederek elde ettikleri susam glikozitlerini tanımlayarak antioksidant özellik gösterdiklerini ve bunların gıda koruyucu olarak kullanılabileceklerini belirtmişlerdir (Kawagishi, S., 1995).

Oosawa, T. ve Ochi, H. pirinçten % 0.5 TFA - %95 EtOH ile ekstraksiyonu ile elde edilen siyanidin. 3-O-(β)-glukozunidin gıdaların korunmasında antioksidan olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Oosawa, T., 1996).

Hara, M. ve Sugiara, M. soya fasulyesi ve soya filizlerinin H₂SO₄ ve sonra MeOH ile ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktın kolonda ayrılmasıyla elde edilen saponinlerden antioksidant, anticoloestramic ve antirombin agent olarak faydalanılabileceğini göstermişlerdir (Hara, M., 1990).

Ahn, C.Y. ve grubu beyaz ve siyah susam tohumlarından elde ettikleri (sefadex LH-20 ve C18 kolon kullanarak) antioksidatif maddeler üzerinde yaptıkları araştırmalarda beyaz susamdan elde edilen antioksidanların daha aktif ve güçlü olduklarını belirtmişlerdir (Ahn, C.Y., 1993).

Sato, T. ve grubu yaptıkları çalışmalarda askorbik asidin türevlerinden biri olan 3-Oetilaskorbik asidin gıdalarda oksidasyonu inhibe edici bir etkisi olduğunu ve gıda olarak kullanılan yağlara eklendiğinde iyi antioksidan özellik gösterdiğini belirtmişlerdir (Sato, T., 1995).

Dei, Y. bilim adamları tarafından çeşitli bitki ve sebzelerden elde edilen antioksidanlardan, ayçiçeği tohumlarından elde edilenlerin güçlü antioksidatif etkiye sahip olduğunu belirleyerek bunun üzerinde çalışmalarını sürdürmüştür. Bu ürünün askorbik asidin stabilize edilmesinde ve karotenoidlerin renginin bozulmamasında oldukça etkili olduğunu belirterek çalışmalarında ayçiçeği tohumlarında elde ettiği suda çözünen doğal antioksidanın gıdalarda kullanımı üzerindeki gelişmeleri tartışmıştır (Dei, Y., 1995).

Anon., susamdan moleküler distilasyon ile elde edilen yağın sesamin, sesamolin ve linoleik asit bakımından zengin olduğunu ve oksidasyona karşı direnç gösterdiklerini ve antioksidatif etkiye sahip olduğunu belirtmiştir (Anon., 1994).

Çizelge 2.4 Doğal Antioksidanların tayin yöntemleri

Antioksidan	Tayin Yöntemi	Uygulanan Alan
α -tokoferol, α -tokoferil asetat, 2,6-di-tert-bütil-p-hidroksitoluen, tert-bütil-4-hidroksianisol, tert-bütilhidrokinon	Gaz Kromatografisi	Sıvı ve katı yağlardaki trigliseridler (Nieto, S., 1994)
Flavon, flavonollar	HPLC	Akdeniz kökenli bitkisel materyallerde (Skerget, M, 2004)
Askorbik, dehidroaskorbik asit	HPLC	Armudun etli dokusunda (Rizollo, A., 2002)
β -karotenin	HPLC– TLC	Balık yağlarında (esaslı destek ilaçlarında) bitkisel yağlarda (Lutorelli, S., 1999)
A ve E vitaminleri, retinol asetat, α -, β - ve γ -tokoferol, α -tekoferol asetat	HPLC ters- faz	Bebek mamalarında (Mendoza, B.R., 2003)
Fenolik asitler ve flavonoidler	Kütle spektrometrik HPLC	Elma – armut (Schieber, A., 2001)
Tokoferol	Voltametik	Zeytinyağı (Diaz, T.G., 2004)
Fenolik antioksidan	Voltametik	Ticari portakal suyu (Sousa, W.R., 2003)
Vitamin E (α -tekoferol)	Spektrofotometrik	Bakır (II)-neokuproin reaktifıyla (Tütem, E., 1997)
Vitamin A, C ve β -karoten	HPLC	Plazma (Zhao, B., 2004)
		Domates (Abushita, A.A., 1997)
α -tekoferol	Türev Spektrofotometrisi	Farmasötik preparat (Yılmaz, B., 2004)
Askorbik asit, gallik asit	Türev Spektrofotometrisi	Sentetik karışım (Markopolou, C.K., 2003)
Kuersetin	HPLC	Bazı sebze (soğan), meyvelerde (elma) ve herbal örneklerde (Wach, A., basımda)
		İnsan plazma ve idrarında (Ishii, K., 2003)
	Spektrofotometrik	Askorbik asitin varlığında (Pejic, N., 2004)
Flavonoid	HPLC Kapiler elektroforez	Plazma (biyolojik sıvılar) (Oliviera, E.J., 2001)
	UV veya floresans	Biyolojik matrislerde (Oliviera, E.J., 2001)
	Elektrokimyasal yöntemler	Biyolojik matrislerde (Oliviera, E.J., 2001)
	GC-MS	Trimetil silil türevleri (Oliviera, E.J., 2001)
Kuersetin ve Kamferol, TMS türevleri	GC-MS	İnsan idrarı (Oliviera, E.J., 2001)

Çizelge 2.5 Sentetik antioksidanların tayin yöntemleri

Antioksidan	Tayin Yöntemi	Uygulanan Alan
BHA, BHT, α -TA, α -T, TBHQ	HPLC	Gıda ürünleri (Gonzalez,M.,1998)
BHA, BHT, TBHQ	Gaz Kromatografisi	Yemeklik sıvı ve katı yağlarda(Yang, M., 2001)
BHA, BHT, TBHQ	UV-Vis. Spektrofotometri, en küçük kareler yöntemi (PLS)	Ayçiçek yağı(Espinossa-Mnsilla, A., 1996)
Propil ve oktil galllatlar, Tert-butilhidrokinon ve 3-ter-bütil-4-hidroksianisol	HPLC	Ayçiçeği, mısır, zeytinyağları, margarin, domuz yağı, tereyağı(Nouguera-Orti,J.F., 1999)
BHA ve PG	Ters-faz HPLC	Et suyu, toz çorbalar (Perin, C.,2002)
BHA	Ters-faz HPLC	Bulyon, kuru et, kuru hayvan yiyeceklerinde (Perin, C.,2002)
OG	Ters-faz HPLC	Kuru et (Perin, C.,2002)
BHA	Floresans Spektrofotometrisi	Toz çorbalar,sakız(Cruces-Blanco,C.,1999)
BHA, BHT, PG, TBHQ	Voltametrik yöntem, CLS, PCR ve PLS	Katı yiyecek örnekleri, yağlarda (Ni,Y.,2000)
BHA, PG	Lüminesans Spektrofotometrisi	Çorba, yağ, margarin(Aguilar, M.P., 2000)
PG, OG, DG,BHA, BHT	Sıvı kromatografisi	Unlu Mamüller (Rafecas, M., Guardiole, F., 1998)

2.7 UV – Vis Spektrofotometrisi ve Türev Spektrofotometrisi

Görsel yöntemlerle yapılan analizler belli bir hata olasılığı taşır. Göz yerine ışına duyarlı aletlerin kullanılması ile daha duyarlı sonuçlar alınabilir ve eser miktardaki maddeler bile analiz edilebilir. UV – Vis spektrofotometrisi, kantitatif analizler için analitik kimya laboratuvarlarında en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir. UV – Vis spektrofotometrisi, moleküllerin prizma, mercekler, gratingler veya aynalar gibi araçlar kullanarak UV – Vis bölgenin elektromanyetik spektrum içerisindeki elektrik alan vektörleriyle etkileşmesine dayanır. ($E = E_1 - E_0 = h\nu = h \cdot C_0/\lambda$). UV – Vis spektrofotometrisi, Lambert – Beer yasasıyla açıklanmaktadır ($A = \epsilon \cdot l \cdot c$). Absorbans, A, ışığın geçirgenliğine ve ölçülen maddenin özelliğine bağlıdır. Lambert – Beer yasası çok absorplayıcı madde içeren karışımlar içinde geçerlidir. Lambert – Beer yasasına göre türlerin birbirini etkilemesi koşuluyla karışımın belirli bir dalga boyundaki absorbansı kendini oluşturan komponentlerin aynı dalga boyundaki toplam absorbanslarına eşittir.

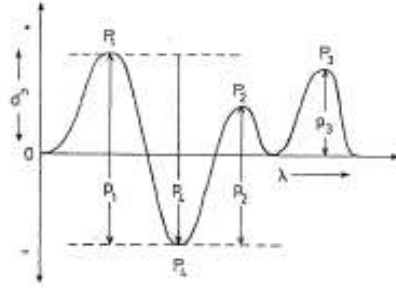
$$A_{\lambda n} = c_A \cdot \epsilon_{\lambda 1,A} + c_B \cdot \epsilon_{\lambda 1,B} + \dots + c_n \cdot \epsilon_{\lambda n}$$

UV – Vis spektrofotometrisi oldukça fazla kullanılmasına rağmen çoklu komponent tayinlerinde birtakım sorunlarla karşılaşmaktadır. Çünkü çoklu komponent tayinlerinde komponentlerin yalnız başına verdiği absorpsiyon pikleri karışım içerisinde üst üste çakışmaktadır. Bu durum elde edilen spektrumlardan karışımı oluşturan piklerin tayinini olanaksızlaştırmaktadır. UV – Vis spektrofotometrisinde elde edilen spektrumların geniş ve piklerin yetersiz kalması sonucunda türev spektrofotometrisi geliştirilmiştir. Türev spektrofotometrisinde spektrumlar çözülür, pikler keskinleşir ve istenmeyen girişimler yok edilir.

Türev spektrofotometrisinin temeli UV – Vis spektrofotometrisinde elde edilen spektrumların düzeltilmesinde türevsel işlem yapılmasına dayanır. UV – Vis spektrofotometrisinde belirli bir dalga boyundaki absorbansı bir fonksiyon olarak tanımlarsak $A = f(x) = \epsilon \cdot l \cdot c$, bu fonksiyonun 1. türevi $dA/d\lambda = c \cdot l \cdot [d\epsilon/d\lambda]$ 'dır. Spektrumun herhangi bir noktasındaki türev değeri hesaplanıp, dalga boyunun fonksiyonu olarak grafik çizildiğinde 1. türev spektrumu elde edilir. Bu grafikler daha üst derecedeki türev değerleri içinde çizilebilir. $d^n A/d\lambda^n = c \cdot l \cdot [d^n \epsilon/d\lambda^n]$ formülünden de anlaşıldığı gibi absorbans konsantrasyonla doğru orantılıdır. Absorpsiyon spektrumun türevi alındığında maksimum olan yerler 0 olur; iki kere türevi alındığında ise, fonksiyonun ekstramum noktaları elde edilir. Bunu bir kural halinde vermek istersek, tek sayılardaki türev değeri 0 olan noktalar, çift sayılardaki türevi, ekstramum noktasına

yani maksimum – minimum noktasına eşit olurlar. Türev alındıktan sonra 0 olan bölge dönüm noktası da denir. Ayrıca, türev derecesi arttıkça, pikler dar ve keskin bir hal alır. Bu durum, çoklu komponent analizlerinde zorluğa neden olduğundan yüksek derecelerdeki türevler pek tercih edilmez. Türev spektrumu uygulanırken birçok yöntemlerden faydalanılır. Bunlar;

- **Pik – Pik Yöntem** : Bu yöntem, maddelerin konsantrasyon tayini için kullanılır. Türev absorpsiyon eğrilerinin maksimum ile minimum arasındaki uzaklık maddenin konsantrasyonu ile (Şekil 2.9) doğru orantılıdır.



Şekil 2.9 p_n - P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu pik – pik yöntemi

d^n : n. türev sırası

A: Absorbans

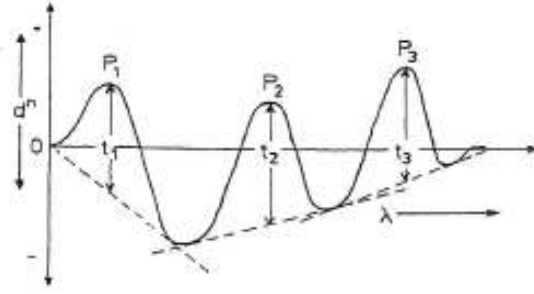
ϵ : Molar absorptivite [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]

c : Molar konsantrasyon [$mol \cdot L^{-1}$]

l : Işın yolu [cm]

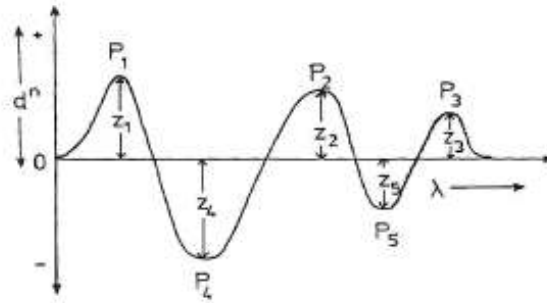
Bu yöntemde, her zaman istenildiği gibi konsantrasyon ile doğru orantı grafiği elde edilemez. Bu yüzden, logaritmik fonksiyonlar gibi çeşitli matematiksel fonksiyonlar kullanılır. Bunun nedeni, piklerin yeterince ayrılamaması, maksimum pik noktasının bozulması, istenmeyen zemin oluşması ve Lambert – Beer yasasına uymamasıdır.

- **Pik – Tanjant Yöntemi** : İki komşu eğrinin maksimum veya minimumdan geçen bir teğet çizilir. Eğrinin ekstremler noktasının ortasından geçen ordinata paralel bir doğru çizilir. Doğrunun, teğeti kestiği noktaya kadar olan yerin uzaklığı ölçülür (t_1 , t_2 , t_3). Lineer bir zemin oluşturmak için çok uygun bir yöntemdir (Şekil 2.10)



Şekil 2.10 t_n , P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı pik – tanjant yöntemi

- **Pik – Sıfır Yöntemi** : Bu yöntemde, sıfır çizgisine çizilen dikey doğruların uzaklıkları ölçülür (z_1 , z_2 , z_3 , z_4 , z_5). Ölçülen uzaklık türev absorpsans değerleri ile doğru orantılıdır. Çoklu komponentlerin tayininde fazlaca uygulanan bir yöntemdir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 z_n , P_n pikinin konsantrasyonu ile doğru orantılı pik – sıfır yöntemi

- **Pik – Pik Oranı Yöntemi** : İki komşu pikin birbirlerine olan oranı alınarak yapılır (p_1 / p_2). Bu yöntem, zemin girişimine yol açtığından pek tercih edilen bir yöntem değildir. Daha pek çok yöntem bulunmaktadır (Genişleyen pik- pik yöntem, dönüm noktası yöntemi...)

2.7.1 Analitik Bantların Türevlendirilmesi

Türev spektroskopisinin en önemli avantajı iki veya daha fazla analitik bandın çakışması durumunda her iki komponentin tayin edilebilmesinin mümkün olabilmesidir. Türev derecesinin artması ile çok üst üste gelmiş bantların ayrılması da mümkün olabilmektedir.

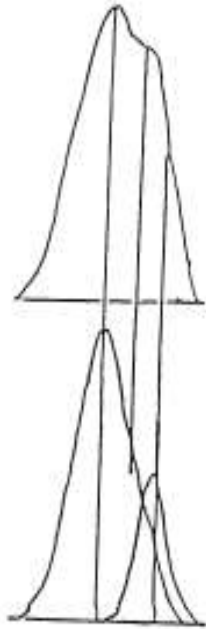
Basit bir absorpsiyom bandının (veya analitik bandın) 1-4 türevlerde uç değerleri (min. veya max.) vardır. Türev derecesinin artması ile bant genişliği azalmaktadır ve daha

keskin olmaktadır. Esas eğrinin dönüm noktası tek dereceli türevlerde maksimum veya minimum olmakta, çift dereceli türevlerde ise sıfır olmaktadır.

Türev derecesini artması ile uçların sayısı artmakta n . türev için $(n+1)$ sayıda uç olmaktadır.

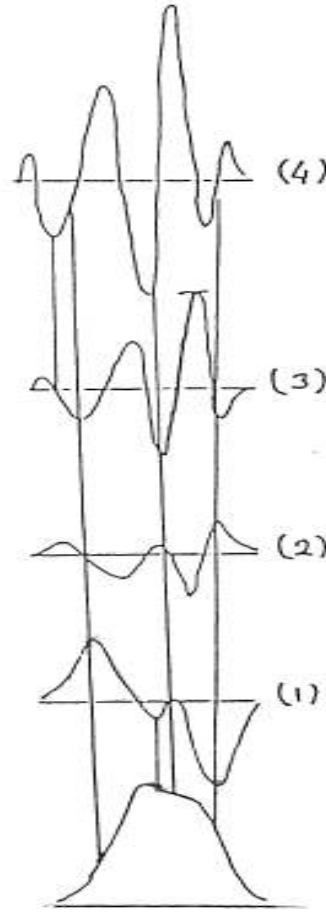
İki bandın üst üste geldiği bir eğri veya 1-4 arası türevleri Şekil 2.12 ve 2.13'de görülmektedir. Esas eğrideki yan ve üst çıkıntıların piklere dönüştüğü görülmektedir. Bu piklerin amplitüdü her bir komponentin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Türevlendirmenin derecesi ise durumuna göre değişir. Genellikle en uygun olan orijinal her çıkıntının maksimuma veya minimuma dönüştüğü koşullardır. Böylece yüksek frekanslı sinyallerin sebep olduğu girişim etkilerinden de kurtulmuş olunur. Bu sebeple en uygun 3., 4. ve 5. türevlerdir (Şekil 2.13).



Şekil 2.12

İki bandın üst üste geldiği bir eğri



Şekil 2.13

1-4 arası türevleri

2.7.2 Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları

- 1) Türev çalışması ile orijinal spektrumun eğimleri bulunabilir ve bunun yan çıkıntı noktaları ile dönüm noktaları daha belirginleşir. Böylece bir bileşik daha kolay ve doğru olarak tanınabilir.
- 2) Yoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen eğrilerde birçok pik üst üste çakışmıştır. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha ayrıntılı olur ve böylece bir arada bulunan pikler ayrı ayrı görülebilir.
- 3) Spektrofotometride bulanık çözeltiler ile çalışırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılabilir. Türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklık ile ilgili bu olumsuz etki giderilebilir ve bulanık ortamda çalışılabilir.
- 4) Birden fazla maddenin karışım halinde olduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi gibi herhangi bir ayırma işlemi olmadan tek tek miktarları tayin edilebilir.
- 5) Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü pikleri giderilebilir.

Türev spektrofotometrisinin avantajları yanında dezavantajı da vardır :

Türev spektrumlarında çok sayıda yabancı pik görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken hataya sebep olur. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı artacağı için karışıklık daha artar (Talsky, 1994; Prof. Dr. Sıdika Sungur'un seminer notları, 1992; Prof. Dr. Mahmure Üstün Özgür'ün seminer notları, 1998).

2.8 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

2.8.1 Genel Bilgi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography ya da High Performance Liquid Chromatography = HPLC), esas itibariyle gaz kromatografisine benzer. Aralarındaki fark gaz kromatografisinde mobil faz olarak kullanılan gazın ayırmayı etkileyici bir özelliği bulunmamasına karşılık HPLC’de mobil faz olarak kullanılan sıvının ayırmayı etkileyici özelliklerinin bulunması ve gaz kromatografisinde sadece uçucu olan veya uçucu hale gelebilen maddelerin analiz edilmesine karşılık sadece uçucu ya da uçucu hale gelebilen (belli bir termal stabiliteye sahip) maddelerin analizinde değil, makro moleküllerin, iyonik karakterdeki moleküllerin, polimerik materyallerin ve büyük fonksiyonel grup içeren moleküllerin analizinde kullanılır, yani geniş bir kullanım alanına sahiptir.

HPLC cihazı kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, örnek giriş sistemi (enjektör), kolon, detektör ve kaydedici olmak üzere beş ana bölümden oluşur.

2.8.1.1 Pompalar

Pompalar sıkıca doldurulmuş kolon içinden mobil fazın akışını sağlayan aletler olup sabit basınçlı ve sabit akışlı pompalar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Sabit akışlı pompalar kolondaki direnç ve mobil fazın viskozitesinden meydana gelebilecek basınç değişikliklerini düzeltmeleri nedeniyle daha fazla kullanılmaktadırlar. Emme basma ve şırınga pompalardan ibaret olan iki tip sabit akışlı pompa vardır. Bunlardan büyük pistonlu şırınga pompalar çok düz bir akış sağlamalarına rağmen rezervuar kapasiteleri sınırlıdır.

2.8.1.2 Örnek Giriş Sistemleri (Enjektörler)

Valf enjektörler ve şırınga enjektörler olmak üzere iki tip enjeksiyon sistemi vardır. Valf enjektörler, paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki bir üniteye (loop) bağlanan ve açılıp kapanabilen valflerden ibaret olup küçük bir boru yardımı ile kolon başına bağlanmıştır. Valf yükleme durumunda iken örnek loop içine verilir. Aynı anda mobil faz, valf içindeki ayrı bir bölümden kolon içine akar. Valf “enjekt” durumuna getirildiği zaman, loop pompa ve kolon arasındaki akışa bağlanmış olur. En iyi kantitatif sonuçlar,

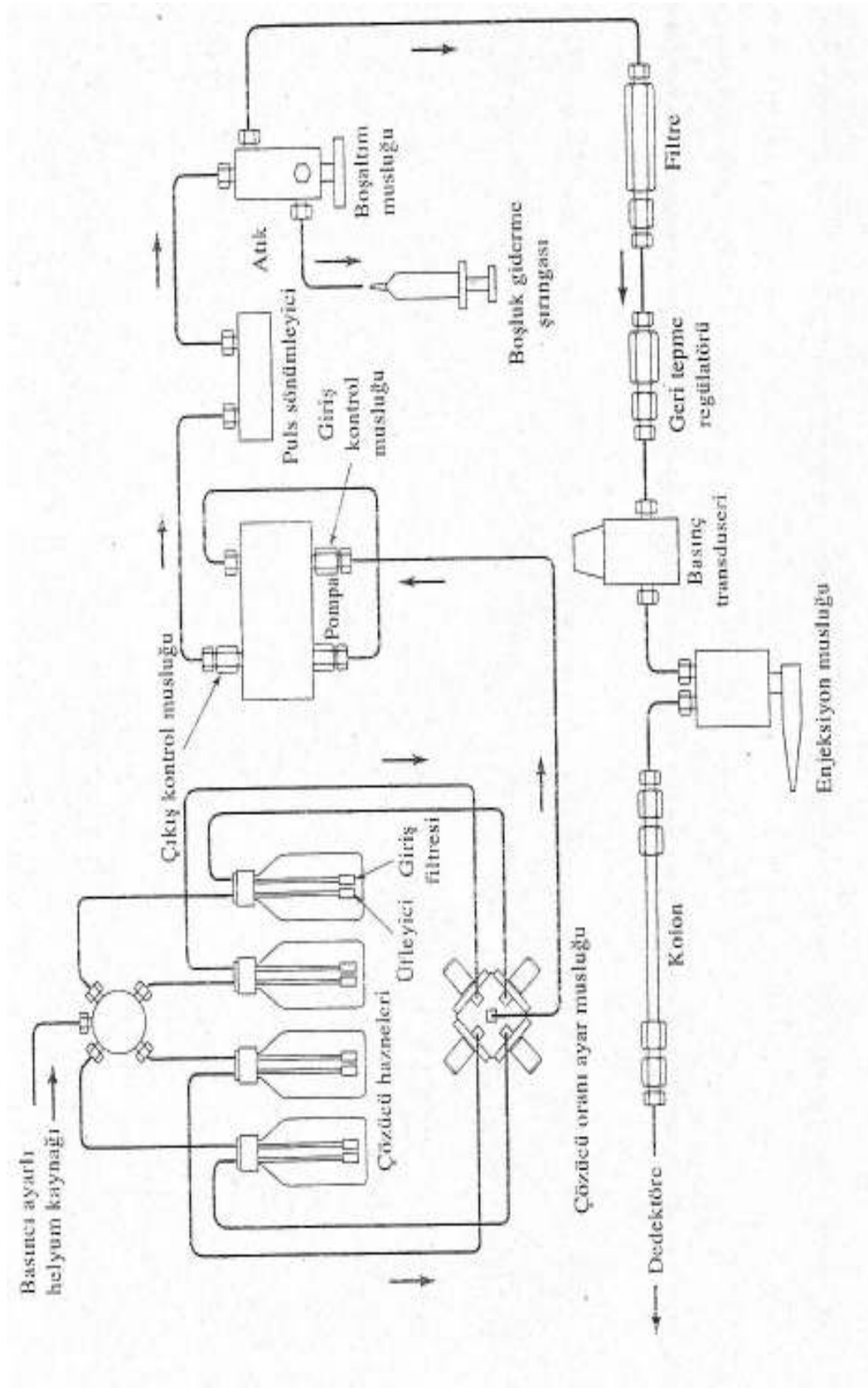
gerekli miktarda örneği alabilecek hacimde bir loop kullanılarak elde edilir. Ancak örnek dereceli bir enjektör aracılığı ile loop kısmen doldurulacak şekilde de verilebilir. Valf enjektörler dayanıklı olup daha az bakım gerektirirler ve bu nedenle rutin ilaç analizlerinde fazlaca kullanılırlar.

2.8.1.3 Kolonlar

Kolon, sistemin en önemli kısmı olup dolgu materyali ve taşıyıcı kısım olmak üzere iki bölümden meydana gelir. Dolgu materyalinin partikül yüzeyi ile partikül büyüklüğü, taşıyıcı kısmın ise uzunluğu, çapı ve üretildiği materyalin ayırma üzerinde etkileri vardır. Kolonlar paslanmaz çelikten veya plastikten yapılmış olup birinciler ikincilerden daha dayanıklıdır. Basınç, paslanmaz çelik kolonlarda 3500, plastik kolonlarda ise 1500 psi'yi geçmemelidir.

2.8.1.4 Detektörler

Detektörler, kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptamaya yarayan aletler olup temelde universal ve seçici olmak üzere ikiye ayrılmakta, seçici detektörler arasında a) floresans b) elektrokimyasal c) ultraviyole-visibl detektörler, universal detektörlerden de d) refraktif indeks detektörleri uygulamada en fazla kullanılan detektörler arasında yer almaktadır. Universal detektörler adlarından da anlaşılacağı gibi kolondan çıkan solutların hemen hemen tümüne karşı duyarlı olabilen detektörlerdir. Buna karşılık seçici detektörler, yine adlarından da anlaşılabilceği gibi elüe edilen bileşiklerin sadece bir kısmına karşı duyarlı ve bu nedenle daha yüksek bir hassasiyete sahip olan detektörlerdir. Floresans, elektrokimyasal, ultraviyole-visibl detektörler, universal detektörler, refraktif indeks detektörleri gibi detektörler bulunmakla beraber, bunların yaygın kullanılış alanı yoktur. Bazı özel durumlarda bunlardan yararlanılmakta, örneğin radyo izotop ile işaretli ilaç metabolitlerinin tanısında radyoaktif detektör kullanılmaktadır.



Şekil 2.14 Bir HPLC cihazının şeması (Skoog, Holler, Nieman)

2.8.2 HPLC' DE AYIRMA TEKNİKLERİ

HPLC, adsorpsiyon, partisyon, iyon değiştirme ve eleme kromatografisi olarak dört ana gruba ayrılmakta, ayrıca bu grupların bazılarının kapsamına giren bağlı faz kromatografisi ve iyon çifti kromatografisi de kullanılan teknikler arasında yer almaktadır. Bu nedenle iyi bir ayırma için bu tekniklerden hangisinin seçileceğini, dolayısıyla sayılan tekniklerin dayandığı bazı teorik esasları bilmek gerekmektedir, bundan başka kolon dolgu materyalleri ve solutların stasyonere ve mobil fazlarla olan ilişkileri (moleküler etkileşimleri) hakkında bilgi sahibi olmak da ayrılmaların sağlıklı olması bakımından önem taşır.

2.8.2.1 Kolon Dolgu Materyalleri

Dolgu materyalleri, partikül yapılarına bağlı olarak a) büyük partiküllü ve tamamen gözenekli (poröz) b) pelikler c) mikropartikll ve tamamen gözenekli dolgular olmak üzere üç grup altında toplanabilir.

a) Büyük partiküllü ve tamamen gözenekli dolgular 25 μm dolayında bir partikül büyüklüğüne ve 200-500 m^2/g yüzey alanına sahip bulunmakta ve boş kolona yer çekimi kuvveti ile basıncı gerekmeden 'kuru teknik' e göre doldurulabilmektedir. Kolon yatağında 5000-25000 m^2 'lik bir alanı kaplayabilen bu dolgu materyallerinin ayrılacak maddeyi yükleyebilme kapasiteleri büyük olduğundan özellikle preparatif sıvı kromatografisine yaygın biçimde kullanılırlar. Kuru teknikte, dolgu partiküllerinin tam olarak yerleşmesi sağlandığından, uzun süre stabil kalabilen kolon yatakları hazırlanabilmektedir.

b) Pelikler dolgu materyalleri, düzgün, küresel, inert bir çekirdek üzerinde 1-2 μm kalınlığında dolgu materyalleri kaplanmış tamamen gözenekli partiküllerden ibarettir. Bu partiküllerin çapı 35 μm dolayında olmakta birlikte, yüzey alanının küçüklüğü nedeniyle (>30 m^2/g) bunlarla hazırlanan kolonların madde yükleyebilme kapasiteleri düşüktür. Pelikler dolgularla da 'kuru teknik' e göre kolonlar doldurulmakta ve verimliliği yüksek kolonlar elde edilmektedir.

c) Mikropartikll ve tamamen gözenekli dolgu materyallerinin partikül çapları 3-12 μm 'dir. Tamamen gözenekli olduklarından yüksek yüzey alanına sahiptirler (200-500 m^2/g). Yükleme kapasiteleri büyüktür ve piyasadaki en yüksek verimliliğe sahip dolgu materyalleridir. Mikropartikllerin kolonlara doldurulması genellikle bulamaç yöntemiyle yapılmakta ve bu iş

için dolgu materyali uygun yoğunluktaki bir çözücüye alınıp basınç altında kolon içine itilmektedir.

2.8.2.2 Moleküler Etkileşimler

Mobil faz moleküllerinin solut molekülleri ile, mobil faz ve solut moleküllerinin stasyoner faz ile olan total etkileşimleri söz konusudur. Polarite, moleküller arası çekim kuvvetleri ile ilişkilidir. Solutların kolon içinde alıkonması, mobil ve stasyoner fazlar arasındaki intermoleküler kuvvetlerin gücüne bağlıdır. Solut, stasyoner faz ve mobil faz arasında meydana gelebilecek moleküler etkileşimler a) İyonik kuvvetler b) dipol etkileşimleri c) dispersif etkileşimler d) hidrojen bağı oluşumu olmak üzere dört tiptir.

2.8.2.3 Adsorpsiyon Kromatografisi (Sıvı-Katı Kromatografisi)

Bir katı partikül ile mobil faz molekülleri ya da solut arasındaki ilişki adsorpsiyon mekanizmasının temelini oluşturur. Ayrılacak bileşenler sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorblanırlar. Burada hareketli faz, adsorban üzerinde sıvı olarak hareket eder. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolonda hiç geciktirilmeden hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeyle etkileşmelerine bağlı olarak farklı kalma sürelerinde kolonu terketmektedir.

Adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak adsorplama yapabilecek bir katı kullanılır. En çok kullanılan yüzeyleri polar sabit fazlar alümina ve silikajeldir. Sabit faz olarak genellikle polar katılar kullanıldığından, hareketli faz olarak apolar veya çok az polar sıvılar kullanılır; benzen, oktan, kloroform gibi. Ayrılacak bileşenin sabit fazla etkileşmesi dipol-dipol çekimleri, Van Der Waals kuvvetleri veya hidrojen bağları sonucunda gerçekleşir.

Adsorpsiyon kromatografisi, polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir. Durgun fazın polaritesi, sabit fazın polaritesinden daha büyük olduğunda buna ‘Normal Faz Kromatografisi’, hareketli fazın polaritesi daha büyük olduğunda buna, ‘Ters Faz Kromatografisi’ denir. Bu tip kromatografide, nicel analizlerde adsorpsiyon izoterminin derişime göre doğrusal olduğu bölgelerde hatasız çalışılabilir. Doğrusal kısım zayıf adsorplanan bileşik için geniştir; bu nedenle nicel çalışmada zayıf adsorplama istenir.

2.8.2.4 Bağlı Faz Kromatografisi

Dolgu maddesinin üzerindeki stasyonier faz fiziksel olarak mobil faz tarafından kolaylıkla sürüklenip götürebilir. Stasyonier fazın miktarı zamanla azalır. Böyle kolonlarda yapılan ayrımların tekrarlanabilirliği az olmakta, kolon kısa zamanda bozunmaktadır. Bunu önlemek için önerilerden bir tanesi, taşıyıcı madde üzerine polimer taşıyıcı kaplanır (nylon, poliamid). Stasyonier faz destek katısı: dolgu maddesi üzerine kimyasal olarak bağlanmıştır. Silikajel aktif silanol grupları kimyasal olarak çeşitli polaritede gruplar bağlanarak modifiye edilmiştir.

Organik fonksiyel grupların kovalent bağla silikajele bağlanması ile kazanılan 5 – 10µm'lik partikül büyüklüğüne sahip stasyonier fazlar, HPLC ` de en fazla kullanılan dolgu materyalleridir ve bunların çoğu, uygun bir organosilan bileşiği ile silikajeli reaksiyona sokmak suretiyle hazırlanmıştır. Bunlar arasında en aktif olan organosilan bileşikleri organoklorosilanlardır.

Bu yapıların silika yüzeyindeki silanol gruplarının bir kısmı daha, trimetilklorosilan ile kapatılırsa daha stabil ve etkin kolonlar elde edilebilir.

2.8.2.5 Eleme Kromatografisi

Eleme kromatografisinde ayırma, stasyonier faz olarak değişik çapta porlar taşıyan bir dolgu materyali kullanmak suretiyle yapılmaktadır. Farklı molekül ağırlıklarına sahip solutlar içeren bir örnek, sisteme enjekte edildiğinde küçük moleküller bütün porların içine derin bir şekilde difuze olmakta ve kolondan büyük moleküllerden daha sonra çıkmakta; orta büyüklükteki moleküller nüfuz edemediklerinden kolonda küçük moleküllerden daha az tutulmakta; porlara giremeyecek kadar büyük moleküller ise stasyonier faz tarafından alıkonmamakta ve kolonu ilk terkeden solutları oluşturmaktadır.

Eleme kromatografisi, kullanılan dolgu materyalinin özelliğine göre jel filtrasyon (süzme) ve jel permasyon (geçirgenlik) kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Jel filtrasyon kromatografisinde dolgu materyali suda şişebilen jellerdir ve bunlar çapraz bağlı dekstran moleküllerinde oluşmaktadır.

Jel permasyon kromatografisinde, organik çözücülerde çözünebilen polimerlerin ayrılmasına yarayan ve farklı çaplarda porlara sahip bulunan çapraz bağlı polistiren jeller kullanılmaktadır. Kolonların seçiminde, öncelikle ayrılacak maddelerin molekül ağırlıkları

dikkate alınmakta ve bir dolgu materyali bütün molekülleri ayırmaya yeterli olmadığından jelleri karakterize eden kalibrasyon eğrileri hazırlanmaktadır. Bunun için değişik molekül ağırlıklarına sahip standartlardan (polistirenler organik, dekstranlar sulu mobil fazlar için) yararlanılmakta ve molekül ağırlıklarının logaritması ordinata, elüsyon hacimleri apsise yazılmak suretiyle bir grafik çizilmektedir. Bu ayırmada büyük moleküller sadece mobil fazda bulunduklarından kolonu ölü hacimde terketmekte ve dağılma katsayıları $K = 0$ olmakta; küçük moleküller bütün porlara girebileceklerinden kolondan en son çıkmakta ($K=1$) ve total geçirgenlik hacminde elüsyona uğramakta, orta büyüklükte bir molekül ağırlığına sahip olan solutlar ise dağılma katsayılarının belirleyeceği bir retensiyonla kromatogramda yer almaktadır.

2.8.3 HPLC’ DE KULLANILAN ÖZEL TEKNİKLER

2.8.3.1 Gradient Elüsyon

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, tek bir mobil faz kullanmak suretiyle yapılan elüsyona “ İsokratik Elüsyon” , analiz sırasında mobil fazın bileşiminde değişiklik yapılmasına ise “Gradient Elüsyon” adı verilir. Gradient elüsyon, mobil fazın elüsyon kuvvetinin, pH’ın, polaritenin ya da iyonik kuvvetlerin değiştirilmesi suretiyle, solutun kolonda tutulma süresini kısaltan ve bu suretle birbirinden çok retensiyona sahip madde karışımlarını ayırmaya olanak veren önemli bir yöntemdir.

Gradient elüsyonda mobil faz, genellikle iki pompadan verilen basınçlandırılmış akışlar birleştirilerek ve akış hızları elektronik bir programlayıcı ile ayarlandıktan sonra sisteme sürekli ya da aşamalı olarak verilmektedir. Tek pompa ile gradient elüsyon yapılması halinde, iki ayrı mobil faz rezervuarından gelen çözeltilerin oranları, pompaya girmeden önce bir gradient jeneratöründe kontrol edilerek birleştirilmektedir.

2.8.3.2 Türevlendirme

Yüksek basınçlı sıvı kromatografik analizlerde hassasiyetin ve seçiciliğin artırılması gerektiğinde ya da ancak türevlendirilmiş solut için uygun olan bir dedektörün bulunabilmesi durumunda türev oluşturma yoluna gidilir. Ultraviyole de türev oluşturmak için 1,2-

naftokinon -4-sülfonik asit sodyum tuzu, N-süksinimidil-p-nitrofenilasetat, fenilhidrazin ve 3,5-dinitrobenzoil klorür; fluoreskamin ve o-ftalaldehid gibi reaktifler kullanılmaktadır.

2.8.4 HPLC DE ÇALIŞMA KOŞULLARININ SAPTANMASI

HPLC de analiz yapabilmek için ayrılacak bileşiğin polar ya da nonpolar çözücülerde çözünmesi gerekmektedir; bileşiğin yapısına uyan bir kolon, detektör ve mobil faz seçilmekte, ayrıca mobil faz seçiminde kolonun dolgu meteryali de dikkate alınmaktadır.

HPLC de kullanılacak çözücülerin ve inorganik tuzların saflığı da çok önemlidir; çünkü çözücüler içindeki safsızlıklar, düzgün bir baseline (temel çizgi) elde edilememesine ve istenmeyen piklerin (sahte pikler) çıkmasına, ayrıca dolgu materyalinin yüzeyinde tutulup kromatografik retensiyonun değişmesine, pompa filtresinin gözeneklerinin ve boruların tıkanmasına neden olmaktadır.

Mobil fazda çözünmüş hava da problem oluşturan etmenlerden biridir. Bu hava, pompa başında bir kabarcık oluştursa mobil fazın akışını azaltacak ya da durduracaktır; detektörde oluşan kabarcık ise sahte pikler meydana getirecektir. Mobil fazın içindeki hava ultrasonik bir banyoda 20-30 dakika tutularak ve tercihen çok zayıf bir vakum uygulanarak çıkartılır ya da inert bir gaz olan helyum yardımıyla uzaklaştırılır. Mobil fazın uçucu çözücülerden ibaret bir karışım olması durumunda havayı kovarken çözücü oranlarının değişmemesine dikkat edilmelidir. Mobil faz hazırlandıktan, manyetik bir karıştırıcı ile 5-10 dakika karıştırıldıktan ve ultrasonik banyoda havası uzaklaştırıldıktan sonra uygun filtrelerden vakum uygulanarak süzülmesi gereklidir. Sulu karışımları hazırlamak için kullanılan su da ayırmayı etkileyeceği için bu su özel bir itina ile cam kaplarda iki kez distile edilmek suretiyle hazırlanmış olmalı ve 48 saat içinde tüketilmelidir. Su içindeki redüktör maddelerden kurtulmak için distilasyon sırasında suya bir miktar potasyum permanganat ilave edilmesi ve özellikle fluoresans detektörlerle çalışılırken bu önlemin alınması kesinlikle istenmektedir.

Mobil faz olarak tampon çözelti kullanılması halinde, bu çözeltilerin taze hazırlanmış olması, o günlük çalışmanın sonunda kolonun distile su ile yıkanması (en az 30 ml) ve sonra kolondan organik çözücü geçirilmesi gerekmektedir. Tampon çözeltiler içinde küf ve bakteri üremesi, diğer mobil fazlara göre çok daha hızlı olduğundan ve ayrıca tampon çözelti içindeki maddeler kolon içinde kristallenerek kolonu tıkayacaklarından, bu çözeltilerin kolon içinde bırakılmamasına özel bir dikkat göstermek yerinde olur.

Solutların enjeksiyon için hazırlanmasında kullanılacak çözücülerin seçimi de önem arzetymekte ve ayrılacak analiz örneğinin mobil fazda çözülebilmesi en ideal durum olmaktadır. Eğer ayrılacak örnek mobil fazda iyi çözünmüyorsa, bu takdirde mobil fazla karışabilen ve detektör cevabı küçük olan bir çözücüde çözüldükten sonra sisteme enjekte edilmektedir. Bu ikinci durum söz konusu ise, omuzlu ve geniş piklerin oluşumunu önlemek için enjeksiyon hacmi küçük (5 µl) tutulmalıdır (ideal enjeksiyon hacmi 20 µl'dir.). Genellikle mobil fazın elüsyon kuvvetinin ayrılacak örneğin çözüldüğü çözücünün elüsyon kuvvetinden büyük olması istenir. Çünkü aksi durumda örneğin içerdığı madde ya da maddelerin kolon girişinde yoğunlaşması veya kolon içinde çökmesi gündeme gelir. Bu takdirde yapılacak en uygun iş, düşük konsantrasyonda bir çözelti hazırlayıp bunu enjekte etmektir (Analitik HPLC'de her enjeksiyonda verilecek ideal konsantrasyon 0.050-500 µl arasında değişmektedir.)

Ön hazırlıklar bu şekilde tamamlandıktan sonra çalışma için seçilmiş kolon, doldurulduğu yönde cihaza takılır; pompa, detektör ve kaydedici, çalışma koşullarının gerektirdiği biçimde ayarlanır. Kolon içinden 5-10 ml mobil faz geçirildikten sonra ideal hacim olan 20µl solut sisteme enjekte edilir ve kromatogram alınır. Alınan bu ilk kromatogram incelenerek daha iyi bir kromatogram elde edebilmek için akış hızında, hassasiyette ya da enjeksiyon hacminde gerekli değişiklikler yapılır. Bu değişikliklere karşın pik ya da pikler gerek şekil, gerekse rezolüsyon bakımından istenilen nitelikte değilse mobil fazda değişiklik yapmak (karışım oranlarını ya da bileşenlerini değiştirmek) , bununla da istenen sonuç alınamıyorsa kullanılan kolonda bozulma olup olmadığına bakmak, ayrıca en uygun kolonun seçildiğinden emin olmak gerekir. Kolonun bozulup bozulmadığı bir test maddesini enjekte etmek ve bunun bilinen retensiyonunda belirgin bir değişiklik olup olmadığına bakmak, teorik plaka sayısını hesaplamak sureti ile kontrol edilir. Bu kontrolün sonucu olumsuz ise kolonun bozulduğu kesin sonucuna varmadan önce, kolon dolgu materyaline adsorbe olmuş safsızlıklarıda göz önünde tutmak ve kolonu rejenere ettikten sonra alınacak kromatograma göre karar vermek gerekir.

HPLC çalışmalarında kolon, aletin beyni olduğundan, ömrünü uzatmak üzere bazı önlemler alınmakta ve bu önlemler arasında uygun bir mobil faz ile uygun pH'ın seçimi en önemli yeri almaktadır.

2.8.4.1 ÜSTÜNLÜKLERİ

- Örnek otomatik kapiller elektroforezde yerine yerleştirildikten sonra operatörün analize hiçbir katkısı kalmamaktadır. Dolayısıyla operatör hataları tamamen ortadan kalkmaktadır.
- Bir kapiler dolusu tampon μ l'lerle ölçüldüğü için ve analiz için kullanılan örnek hacmi birkaç nanolitre düzeyinde olduğu için örnek başına çözücü maliyeti sıfıra yaklaşmaktadır. Dolayısıyla az atık oluşmaktadır.
- Teorik plaka sayısı 1 milyonun üzerine çıkmaktadır. (Kromatografik yöntemlerde ise en çok 100.000-150.000)
- Hızlı bir analiz yöntemidir.
- Kullanım alanı geniştir.
- Hızla gelişmekte olan bir yöntemdir.
- Örnek hazırlama kolaylığı sağlar (İstanbul Üniversitesi ders notları, 1995; Enstrumental Analiz İlkeleri, 2000).

3.DENEYSEL BÖLÜM

3.1.Maddeler ve Çözücüler

BHA, BHT, metanol, dimetilsülfoksid, etanol, hekzan, asetonitril, asetik asit, etilasetat, distillenmiş su. Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır.

HPLC ile ilgili olan çalışmalarda kullanılan maddeler HPLC saflıktaki maddelerdir. Asetonitril, metanol, asetik asit (HPLC GRADE, J.T.Baker).

First White şekersiz sakız: Tatlandırıcılar (sorbitol, maltitol, maltitol şurubu, mannitol, aspartam, asesulfam-K), sakız mayası, sodyum bikarbonat, dikalsiyum fosfat, doğal nane aroması, kıvam arttırıcı (gum arabik), emülgatör (lesitin), parlaticı (karnauba mumu, şellak), renklendiriciler (titanyum dioksit), antioksidan (BHA E320)

3.2.Çözeltiler

BHA Stok Çözeltisi: 0.01 g BHA tartılarak 100 ml'ye metanol ile tamamlandı. (100µg/ml)

BHT Stok Çözeltisi: 0.01 g BHT tartılarak 100 ml'ye metanol ile tamamlandı. (100µg/ml)

Standart Çözeltiler: Spektrofotometrik ve HPLC ile ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere; deney koşullarının saptanması ve standart eğrilerin çizimi için BHA'nın stok çözeltilerinin metanol ile seyreltilmesiyle 5-25 µg/ml, HPLC için ise 20-100 µg/ml; BHT'nin stok çözeltilerinin metanol ile seyreltilmesiyle 20-100 µg/ml, HPLC için ise 5-25 µg/ml konsantrasyondaki çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan BHA ve BHT stok çözeltileri haftalık hazırlanarak 4⁰ C'de buzdolabında bekletildi. Standart çözeltiler ise bu stok çözeltilerden uygun bir şekilde seyreltilerek günlük hazırlandı (Cruces-Blanco, C., 1999).

Mobil faz: Asetonitril:metanol (1:1) / % 1'lik asetik asit kullanıldı.

3.3.Aletler ve Diğer Gereçler

Spektrofotometre (Agilent 8453 Technologies spectrophotometer), HPLC (Schimadzu HPLC System) LC-20, AT pompa, SPD-20A UV-VIS dedektör, 7725 20 µl enjektör, boyutları 5µm, 4.62*50mm olan C₁₈ HPLC kolonu, bilgisayar, ultrasonik banyo, manyetik karıştırıcı, magnet, terazi (Metler AE200), kuvars küvet, mavi bandlı süzgeç kağıdı, teknik cam malzemeler.

3.4. Çalışma Yöntemi

3.4.1. Uygun Çözücünün Saptanması

Sakız örneklerinde türev spektroskopisi ile BHA ve BHT tayini için uygun ekstraksiyon çözeltisinin saptanmasında DMSO, etanol, metanol, hekzan, %70 etanol:su (7:3), asetonitril:su (4:1), metanol:su (3:2), asetonitril:metanol (1:1), metanol:asetonitril:%5'lik asetik asit (3:3:4), etilasetat çözeltilerinin herbiri ile sakıza şu işlem yapıldı: (Karovicova, J., 2000)

Sakız küçük parçalara ayrıldıktan sonra 2.5 g örnek 50 ml'lik kapaklı şilifli erlene hassas olarak tartıldı. Üzerine 25 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda ½ saatlik karıştırma süresi uygulandı. Erlen içindeki karışım mavi bandlı süzgeç kağıdından süzüldü ve hacim 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 5 ml alınarak 10 ml'lik balonjojelere aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Elde edilen çözeltilerin metanole karşı absorpsiyon ve türev eğrileri alındı.

3.4.2. Ekstraksiyon Süresinin Tayini

Yapılan literatür çalışmalarında ekstraksiyon süresi için farklı materyaller ve farklı karıştırma cihazları için farklı süreler verilmiştir. Kullandığımız manyetik karıştırıcıda ekstraksiyon süresinin saptanması için 50 ml'lik erlene 2.5g sakız örneği kondu. Üzerine uygun çözücü olarak saptadığımız metanolden 25 ml ilave edildi. Sırasıyla ½, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 saatlik karıştırma süreleri uygulandı. Mavi bandlı süzgeç kağıdından süzüldü ve hacim 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 5 ml alınarak 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı. Metanol ile hacmine tamamlandı. Absorpsiyon ve birinci derece türev spektrumları alınarak $^1D_{304}$ 'deki türev absorbans değerleri kaydedildi.

3.4.3. Spektrumların Çizilmesi

BHA ve BHT karışımının analizinde absorpsiyon (A) ve birinci türev (1D) absorpsiyon spektrumları metanol çözücüsüne karşı 260-320 nm dalga boyu aralığında 2 nm bant genişliğinde ve 1200 nm/dk tarama hızı ile alındı.

3.4.4 BHA Tayini İçin Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

BHA'ya ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 100µg/ml konsantrasyondaki stok BHA çözeltisinden 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml alınarak 10 ml'lik balonjojelere aktarıldı ve metanol ile

hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.4.3'deki koşullarda birinci derece türev spektrumları alınarak 304 nm'deki birinci derece türev absorbans değerleri ($^1D_{304}$) kaydedildi. Bu değerler ile karşılık gelen BHA konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi hazırlandı (Standart Eğri 1).

Antioksidan içermeyen sakız mayası küçük parçalara ayrıldı. Bu karışımdan 2.5 g sakız mayası hassas olarak tartılıp 50 ml'lik erlene kondu. 25 ml metanol ilave edildi ve 4 saat karıştırıldı. Mavi bantlı süzgeç kağıdından süzüldü. 25 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 2 ml sakız mayası 10 ml'lik balonjölere aktarıldı ve 100µg/ml konsantrasyondaki stok BHA çözeltisinden 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ml konsantrasyonlardaki miktarlar alınarak hacmine tamamlandı. Yeni bir standart eğri çizildi. Referans olarak yukarıda hazırlanan bu çözeltiden 2 ml alınarak 10 ml'lik balonjölere aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Bölüm 3.4.3'deki koşullarda birinci derece türev spektrumları alınarak 304 nm'deki birinci derece türev absorbans değerleri ($^1D_{304}$) kaydedildi. Bu değerler ile karşılık gelen BHA konsantrasyonları arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi hazırlandı (Standart Eğri 2).

Yukarıda hazırlanan çözeltilerin birinci derece türev spektrumları metanole karşı alındı. Çözeltilerdeki BHA konsantrasyonları ile birinci derece türev spektrumlarında BHA için 304 nm'deki birinci derece türev absorbans ($^1D_{304}$) değerleri ile ölçü eğrisi hazırlandı (Standart Eğri 3).

Bölüm 3.4.7'de anlatıldığı gibi hazırlanan sakız örneği çözeltisinde BHA tayini için standart katma yöntemi uygulamak amacıyla şu şekilde çalışıldı; 10 ml'lik balonjölere 2 ml aktarıldı. Balonjölere birine BHA ilave edilmedi; yalnız metanol ile hacmine tamamlandı. Diğerlerine BHA standart çözeltilerinden 5-20 µg/ml konsantrasyon aralığındaki miktarlar eklendi. Metanol ile hacmine tamamlandı. Birinci derece türev absorbans ($^1D_{304}$) değerleri ile karşılık gelen konsantrasyon değerleri arasında ölçü eğrisi hazırlandı (Standart Eğri 4).

3.4.5 . BHT Tayini İçin Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

BHT'ye ait ölçü eğrisinin hazırlanması için 100µg/ml konsantrasyondaki stok BHT çözeltisinden 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 ml alınarak 10 ml'lik balonjölere konuldu ve metanol ile hacmine tamamlandı. İyice karıştırıldıktan sonra Bölüm 3.4.3'deki koşullarda birinci derece türev spektrumları alındı. Daha sonra, 292 nm'deki birinci derece türev absorbans değerleri ($^1D_{292}$) saptandı. Bu değerler ile karşılık gelen BHT konsantrasyon değerleri arasında bir grafik çizilerek ölçü eğrisi hazırlandı.

3.4.6 . HPLC Yöntemi İçin Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

BHA ve BHT konsantrasyonları ile pik alanları arasındaki ilişkiyi incelemek için 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki BHA ve BHT içeren sulu çözeltilerinden BHA için 2-10 ml, BHT için 0.5-2.5 ml hacimler 10 ml'lik balonjojeye konduktan sonra metanol ile hacmine tamamlandı. 0.45 µm'lik süzme aparatı ile süzildükten sonra 20 µl'si sisteme enjekte edildi. Kromatografi işlemi C₁₈ kolonda, mobil faz olarak asetonitril + metanol (1: 1) / %1'lik asetik asit karışımı kullanılarak yapıldı. Çalışmada gradient elüsyon tekniği uygulandı. Bu amaçla mobil fazda çözücü karışımı oranı ilk 10 dk. 70 / 30 ; daha sonra ise 100 / 100 olacak şekilde ayarlandı. 1 ml/dk akış hızında 280 nm dalga boyunda kromatogram alındı. Herbir çözelti için pik alanları değerleri ile karşılık gelen konsantrasyon değerleri arasında ölçü eğrileri çizildi. Ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri en küçük kareler yöntemi ile hesaplandı. Sonuçlar Bölüm 4.4'te verilmiştir.

3.4.7 Geliştirilen Yöntemin Örneğe Uygulanması

İçinde BHA ve BHT'yi antioksidan olarak bulunduran sakız örneğinin analizi için alınan örnekler küçük parçalara ayrıldı. Bu karışımdan 2.5 g örnek hassas olarak tartılıp 50 ml'lik erlene kondu. 25 ml metanol ilave edildi ve 4 saat karıştırıldı. Mavi bandlı süzgeç kağıdından süzüldü. 25 ml'ye metanol ile tamamlandı. 5 ml örnek alınarak 10 ml'lik balonjojelere aktarıldı ve metanol ile hacmine tamamlandı. Aynı şartlarda 6 örnek hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerin Bölüm 3.4.3'deki koşullarda birinci derece türev spektrumları alındı. BHA için birinci derece türev spektrumunda 304 nm'deki, BHT için ise 292 nm'deki ¹D değerleri kaydedildi.

3.4.8 Kıyas Yöntemi (HPLC)

Kıyas yöntemi olarak gıdalarda antioksidan tayini için kullanılan (Ed., P., 1995; P.D. Page, 1993) ve sentetik karışımları uygulanan (Ivanovic,D., 1990) HPLC yönteminden faydalanıldı. Bölüm 3.4.7'de anlatıldığı şekilde hazırlanan sakız örneği çözeltisinden 20 µl enjekte edildi. Elde edilen pik alanından faydalanılarak sakız örneğinde BHA ve BHT tayini yapıldı. Sakız örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.14'te verildi.

3.4.9 Geri Kazanma Çalışmaları

Bölüm 3.4.7'de hazırlanan sakız örneğinden alınan 2 ml çözeltiye 10, 15 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında BHA çözeltisi ilave edilerek geri kazanma çalışmaları yapıldı. Herbir konsantrasyon için bağıl standart sapma ve % geri kazanma değerleri hesaplandı.

4. SONUÇLAR

4.1. Uygun Koşulların saptanması

Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı gibi yapılan denemeler sonucunda elde edilen çözeltilerin absorbans değerleri alındı. Ekstraksiyon sonunda asetonitril:su (4:1) ve DMSO çözücüleri ile elde edilen absorbans değerleri, metanol ile ekstraksiyondan elde edilenden daha yüksek olmasına rağmen bu çözücüler zehirli ve pahalı olduğu için seçilmedi. Bunun sonucunda uygun çözücünün metanol olduğu belirlendi.

Çizelge 4.1 Uygun çözücünün saptanması için bulunan absorbans değerleri

Çözücüler	A
DMSO	294 nm: 2.158
etanol	292 nm: 1.296
metanol	291 nm: 1.973
hekzan	289 nm: 1.793
etanol:su (7:3)	291 nm: 1.859
asetonitril:su (4:1)	291 nm: 2.042
metanol:su (3:2)	290 nm: 1.658
asetonitril:metanol (1:1)	292 nm: 1.886
metanol:asetonitril:%5’lik asetik asit (3:3:4)	292 nm: 1.025
Etilasetat	291 nm: 0.988

Uygun çözücünün metanol olduğu saptandıktan sonra ekstraksiyon süresinin tayini için Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi çalışılarak alınan absorpsiyon spektrumlarında 304 nm’deki türev absorbans değerleri okundu. Karıştırma süreleri ile alınan absorbans değerleri Çizelge 4.2’de verildi. 4 saatlik karıştırma süresinin ekstraksiyon için uygun olduğu saptandı.

Çizelge 4.2 Karıştırma süresi(t) tayini için $^1D_{304}$ ’deki türev absorbans değerleri

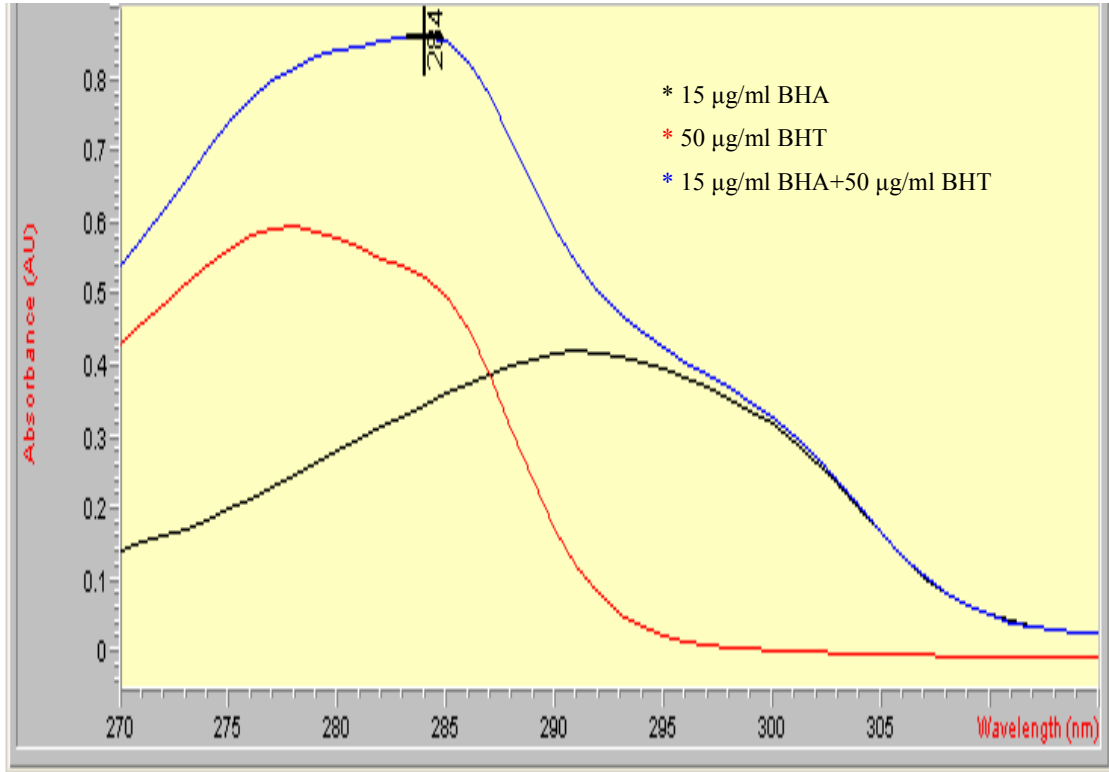
1\2 saat	-4.875
1 saat	-7.688
2 saat	-8.248
3 saat	-9.139
4 saat	-9.411
5 saat	-9.308
6 saat	-9.327

Çözeltilerin dayanıklılığının ve farklı günlerde alınan ölçümler arasındaki tutarlılığın araştırılması amacıyla aynı stok BHA ve BHT çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin hergün absorbans değerleri ölçüldü. Okunan absorbans değerlerinde 5 gün boyunca alınan ölçümlerde BHA'ya ait absorbans değerlerinde çok az farklılık gözlemlendi. BHT'ye ait absorbans değerlerinde tutarsızlıklar görüldü. Stok BHA ve BHT çözeltileri hafta başında taze olarak hazırlandı.

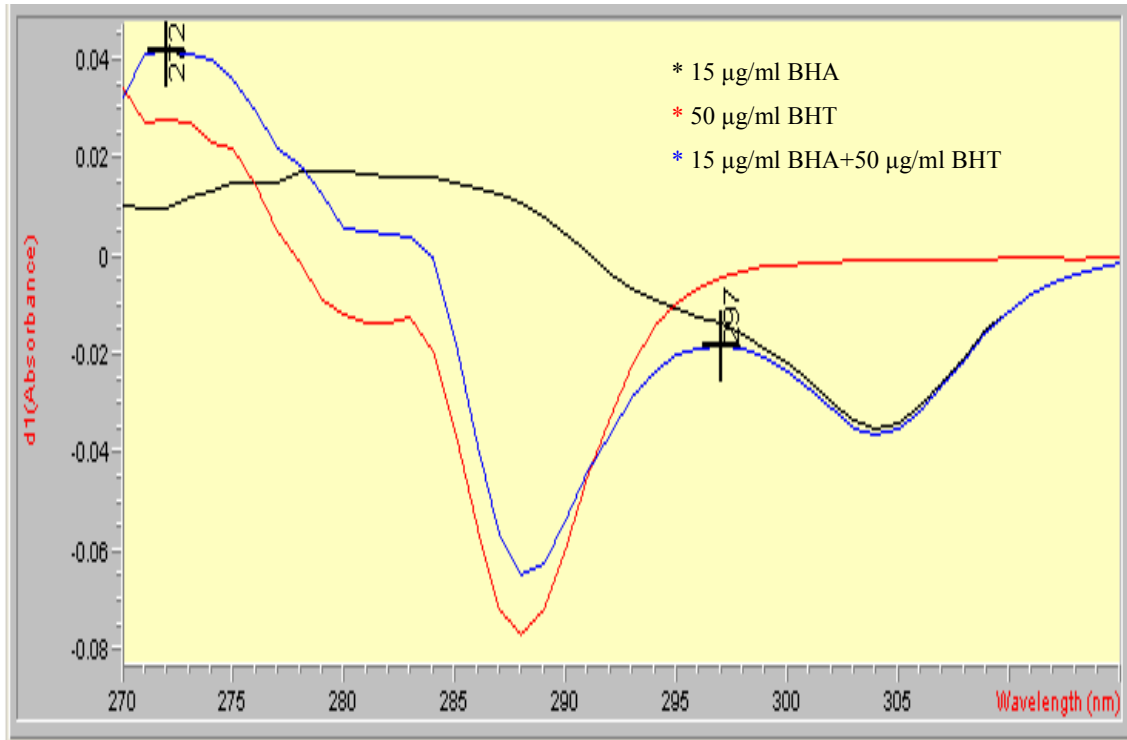
Çizelge 4.3 BHA ve BHT çözeltilerinin dayanıklılığının araştırılmasına ait çalışma sonuçları

Hergün Alınan						
291 nm'deki Absorbans Değerleri				278 nm'deki Absorbans Değerleri		
Gün	BHA'nın Konsantrasyonu($\mu\text{g/ml}$)			BHT'nin Konsantrasyonu($\mu\text{g/ml}$)		
	10	15	25	40	60	80
1.	0.2055	0.3085	0.5304	0.3749	0.5801	0.7872
2.	0.2148	0.3123	0.5315	0.3783	0.5944	0.8133
3.	0.1913	0.3070	0.5262	0.3901	0.6452	0.8322
4.	0.2196	0.3489	0.5492	0.4033	0.6912	0.8726
5.	0.2159	0.3218	0.5583	0.4104	0.6840	0.8574

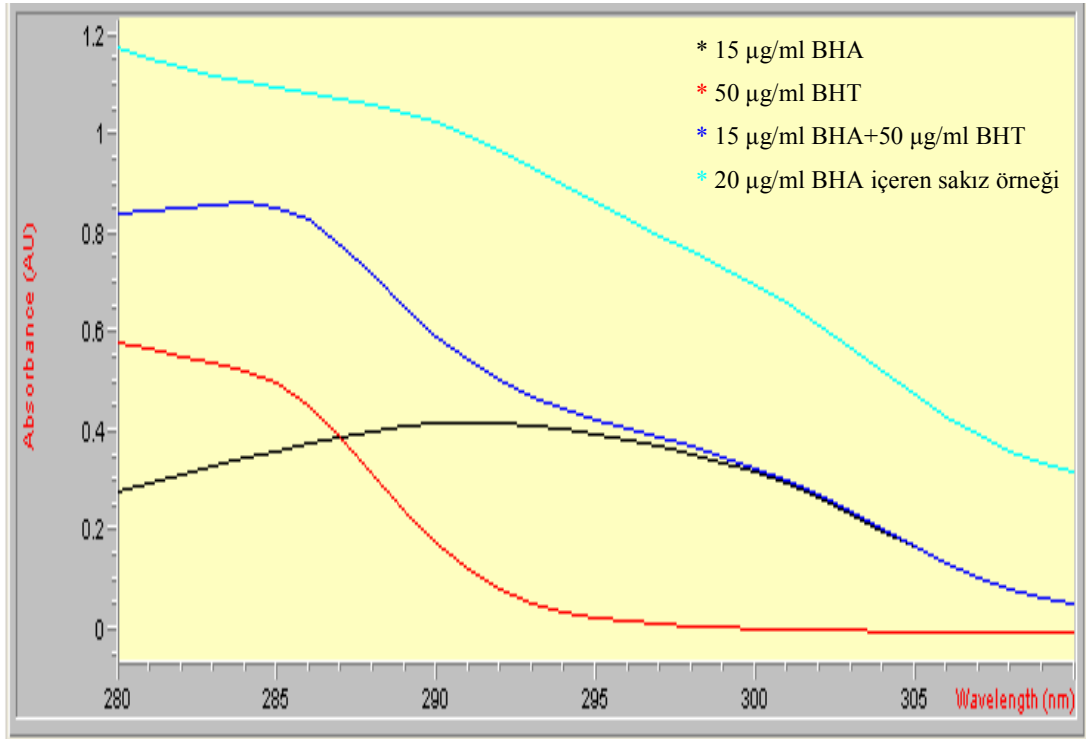
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi BHA, BHT ve karışımlarına ait grafikte BHA, BHT'nin absorpsiyon spektrumları çakışmaktadır. Absorpsiyon spektrumlarından faydalanarak BHT tayini mümkün değildir. Ancak sadece BHA tayini yapılabilir. Fakat Şekil 4.3'te görüldüğü gibi sakız örneğine ait absorpsiyon spektrumunda sakız örneğinden gelen fiziksel girişimlerin giderilmesi amacıyla BHA tayini absorpsiyon spektrumlarından yapılamaz. Dolayısıyla birinci derece türev spektrumları alındığında örnekten gelen girişimlerin spektrumların türev değeri alınarak giderilebileceği (Ivanovic,D., 1990) göz önüne alınarak 304 nm'deki birinci derece türev değerinin BHA tayini için uygun olduğu saptandı. Şekil 4.2'de üst üste çizilmiş olan 1. derece türev spektrumlarında 304 nm'de BHT'nin türev absorbansı sıfırdır. Bu bakımdan karışımın 1. derece türev spektrumunda, bu dalga boyundaki absorbans değeri ölçülerek BHA'nın konsantrasyonu diğerlerinin etkisi olmaksızın tayin edilebilir. Çünkü sıfır absorbans değerlerinde diğer bileşikler bu spektrumda o noktada etkili değildir. BHA'nın absorbans değeri 292 nm'de sıfır olduğundan BHT'nin tayini de bu dalga boyundaki birinci derece türev absorbans değerinden yararlanılarak yapıldı. Peak to Zero yönteminden yararlanarak 1.derece türev spektrumunda 292 nm'de BHT tayini yapıldı (Şekil 4.2).



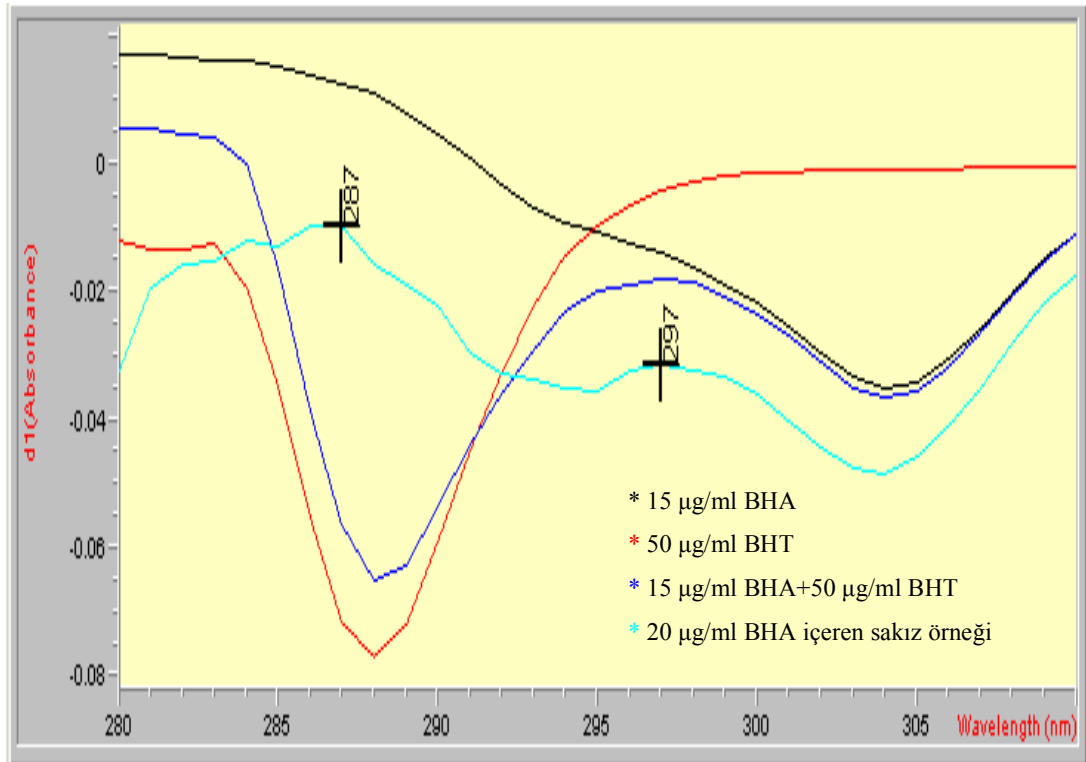
Şekil 4.1. BHA (15 µg/ml) , BHT (50 µg/ml) ve karışımlarının (15:50) absorpsiyonspektrumları
(Referans: metanol)



Şekil 4.2. BHA (15 µg/ml) , BHT (50 µg/ml) ve (15:50) karışımlarının metanoldeki 1.derece
türev spektrumları(Referans: metanol)



Şekil 4.3. BHA (15 µg/ml) , BHT (50 µg/ml), karışımlarının (15:50) ve sakız örneğinin (20 µg/ml BHA içeren) absorpsiyon spektrumları (Referans: metanol)



Şekil 4.4. BHA (15 µg/ml), BHT (50 µg/ml), karışımlarının (15:50) ve sakız örneğinin (20 µg/ml BHA içeren) 1. derece türev spektrumları (Referans: metanol)

4.2. Ölçü Eğrileri

5-25 µg/ml konsantrasyon aralığında hazırlanan BHA standart çözeltilerinin Bölüm 3.4.4’de anlatıldığı şekilde çalışılarak absorpsiyon ve birinci derece türev spektrumları alındı. Çözeltilerdeki BHA konsantrasyonları ile birinci derece türev spektrumlarında BHA için 304 nm’deki birinci derece türev absorbans (1D) değerleri yardımıyla oluşturulan ölçü eğrisi Şekil 4.6 ve bu eğrinin regresyon analizine ait parametreler Çizelge 4.4 ve 4.5’te verildi. Ortalama 1D değerleri ile oluşturulan ölçü eğrisi ve bu ölçü eğrisine ait regresyon denklemi BHA içeren sakız örneğinin kantitatif analizinde kullanıldı (Standart Eğri 1).

Sakız örneğinden gelebilecek girişimlerin türev spektrumları alınarak tamamen giderilip giderilmemesinin araştırılması amacıyla içinde antioksidan olmayan sakız mayası Bölüm 3.4.4’deki gibi çalışılarak alınan birinci derece türev spektrumlarında BHA için 304 nm’deki birinci derece türev absorbans (1D) değerleri yardımıyla oluşturulan ölçü eğrisi Şekil 4.7 ve bu eğrinin regresyon analizine ait parametreler Çizelge 4.6 ve 4.7’de verildi. Ortalama 1D değerleri ile oluşturulan ölçü eğrisi ve bu ölçü eğrisine ait regresyon denklemi BHA içeren sakız örneğinin kantitatif analizinde kullanıldı (Standart Eğri 2).

Standart Eğri 2’yi çizmek için hazırlanan çözeltilerin birinci derece türev spektrumları ayrıca metanole karşı alındı. Ölçü eğrisine ait spektrumlar Şekil 4.8 ve bu eğrinin regresyon analizine ait parametreler Çizelge 4.8 ve 4.9’da verildi. Ortalama 1D değerleri ile oluşturulan ölçü eğrisi ve bu ölçü eğrisine ait regresyon denklemi BHA içeren sakız örneğinin kantitatif analizinde kullanıldı (Standart Eğri 3).

Sakız örneğinde spektral girişim dışındaki girişimler, analizde standart ekleme yöntemi kullanılarak giderilebilir. 5-20 µg/ml konsantrasyon aralığında BHA çözeltilerinin Bölüm 3.4.4 ‘de anlatıldığı şekilde çalışılarak birinci derece türev spektrumları alındı. Çözeltilerdeki BHA konsantrasyonları ile birinci derece türev spektrumlarında BHA için 304 nm’deki birinci derece türev absorbans ($^1D_{304}$) değerleri yardımıyla oluşturulan ölçü eğrisi Şekil 4.9 ve bu eğrinin regresyon analizlerine ait parametreler Çizelge 4.10 ve 4.11’de verildi. Birinci derece türev absorbans ($^1D_{304}$) değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Elde edilen doğrunun X ekseninin uzantısını kestiği yerin mutlak değeri sakız örneğinin konsantrasyonunu verdi (Standart Eğri 4).

20-100 µg/ml konsantrasyon aralığında BHT çözeltilerinin Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı gibi çalışılarak absorpsiyon (Şekil 4.10) ve birinci derece türev spektrumları alındı. Çözeltilerdeki BHT konsantrasyonları ile birinci derece türev spektrumlarında BHT için 292 nm'deki birinci derece türev absorbans (1D) değerleri Şekil 4.11; bu değerler yardımıyla oluşturulan ölçü eğrisinin regresyon analizlerine ait parametreler Çizelge 4.12 ve 4.13'de verildi. Ortalama 1D değerleri ile oluşturulan ölçü eğrisi ve bu ölçü eğrisine ait regresyon denklemi BHT içeren sakız örneğinin kantitatif analizinde kullanıldı.

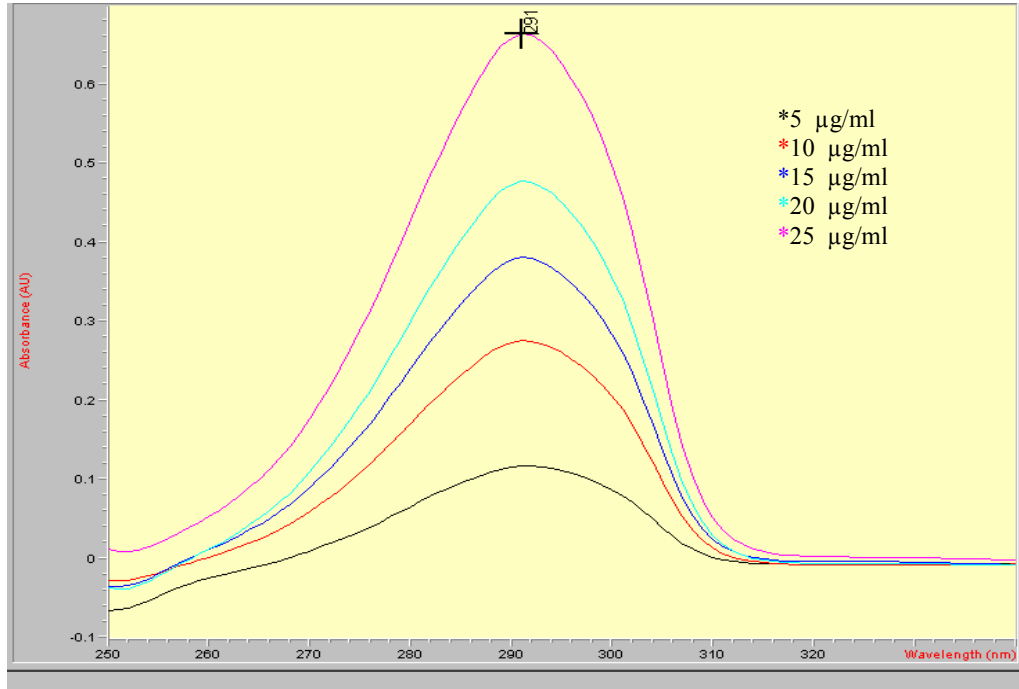
BHA ve BHT'nin ölçü eğrilerine ait absorpsiyon ve birinci derece türev spektrumlarının üst üste çakıştırılması ile elde edilen grafikler Şekil 4.12 ve 4.13'te verildi.

Bölüm 3.4.6'da anlatıldığı şekilde HPLC yöntemi ile hazırlanan ölçü eğrilerine ait regresyon denklemleri:

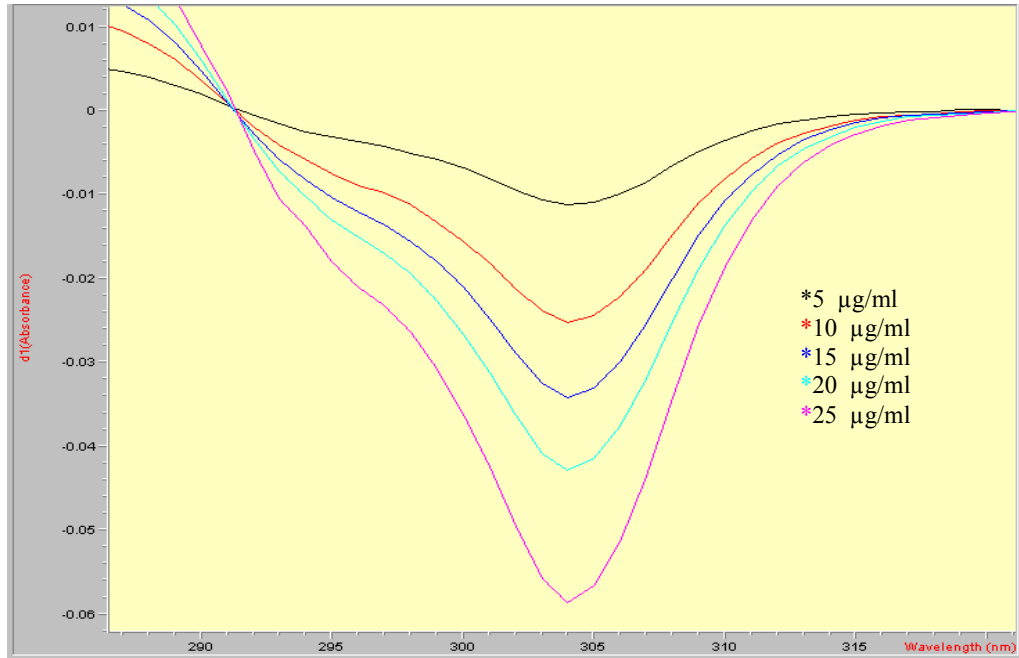
$$\text{BHA için } A = 35840 + 19382c \quad (r=0.9998)$$

$$\text{BHT için } A = -652 + 12019c \quad (r=0.9998)$$

Bu denklemler sakız örneğindeki BHA ve BHT tayininde kullanıldı.



Şekil4.5. BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait absorpsiyon spektrumları



Şekil4.6. BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 1.derece türev spektrumları

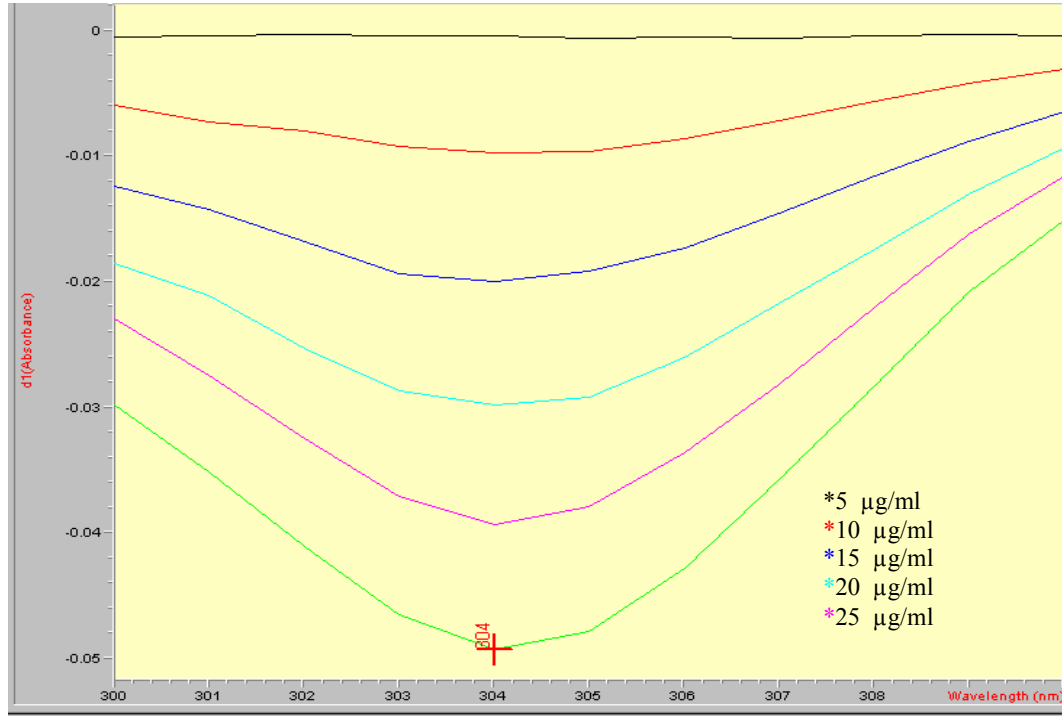
Çizelge 4.4 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri

C µg/ ml	$^1D_{1(304nm)}$	$^1D_{2(304nm)}$	$^1D_{3(304nm)}$	$^1D_{4(304nm)}$	$^1D_{5(304nm)}$	$^1D_{6(304nm)}$	$^1D_{ort}$	S	%S
5	1.316	1.213	1.166	1.194	1.370	1.344	1.267	0.086	6.788
10	2.565	2.277	2.279	2.618	2.569	2.395	2.451	0.153	6.242
15	3.770	3.498	3.326	3.776	3.687	3.619	3.613	0.175	4.844
20	4.838	4.506	4.388	5.125	5.201	4.626	4.781	0.332	6.944
25	6.162	5.581	5.670	6.467	6.451	5.701	6.005	0.405	6.744

Çizelge 4.5 BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
a	0.1406	0.1253	0.0309	0.0793	0.0176	0.2530	0.0816
b	0.2393	0.2193	0.2223	0.2610	0.2559	0.2189	0.2361
r	0.9996	0.9996	0.9993	0.9996	0.9988	0.9996	0.9999

$$\text{BHA' a ait ölçü eğrisi } ^1D_{304} = 0.2361c + 0.0816 \quad r = 0.9999$$



Şekil 4.7 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları (Referans sakız mayası)

Çizelge 4.6 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri

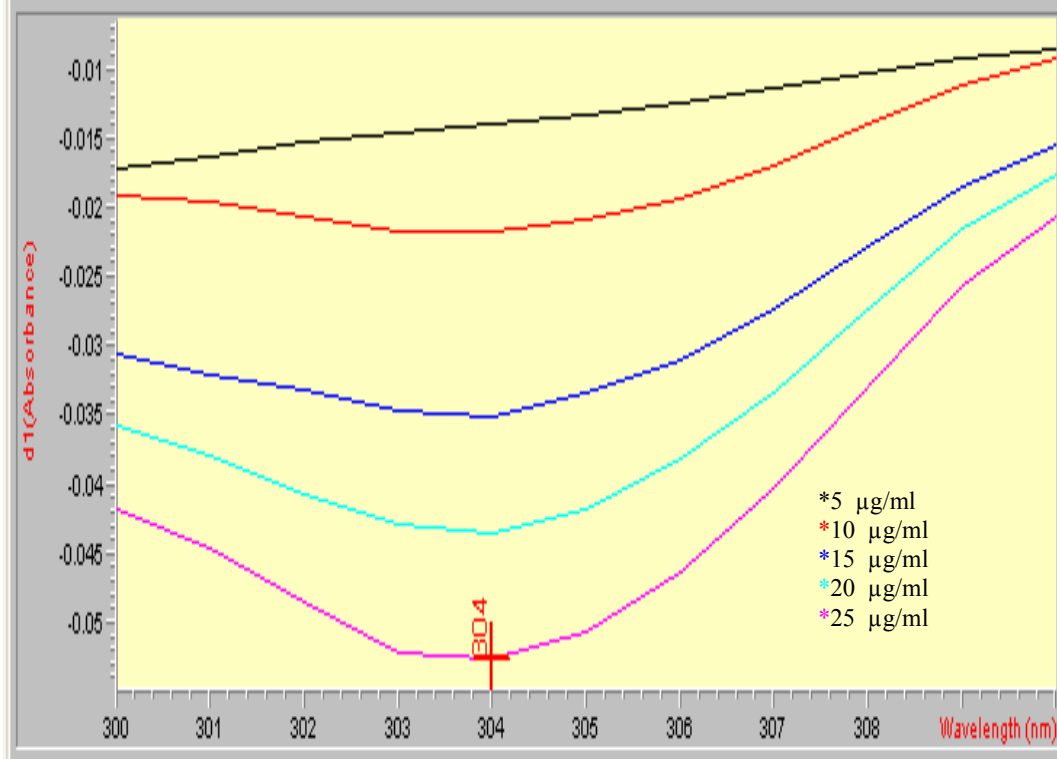
C µg/ml	$^1D_{1(304nm)}$	$^1D_{2(304nm)}$	$^1D_{3(304nm)}$	$^1D_{4(304nm)}$	$^1D_{5(304nm)}$	$^1D_{6(304nm)}$	$^1D_{ort}$	S	%S
5	0.9975	0.9933	0.9952	0.9873	0.9786	0.9813	0.9889	0.0737	7.453
10	1.9856	1.9892	2.0511	2.0207	2.0032	1.9981	2.0080	0.0245	1.2201
15	3.0010	3.0439	2.8933	3.0719	2.9103	2.9789	2.9832	0.0711	2.3833
20	3.9942	4.2975	3.8681	4.0826	3.9187	3.9318	4.0154	0.1566	3.9000
25	5.0091	5.4918	4.8566	5.0744	4.9241	4.9256	5.0470	0.2307	4.5710

Çizelge 4.7 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
a	-0.0121	0.2285	0.0709	-0.0235	0.0050	0.0165	-0.0286
b	0.2006	0.2261	0.1908	0.2047	0.1961	0.1964	0.2025
r	0.9999	0.9989	0.9995	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999

BHA' a ait ölçü eğrisi $^1D_{304} = 0.2025 c - 0.0286$

$r = 0.9999$



Şekil 4.8 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları (Referans metanol)

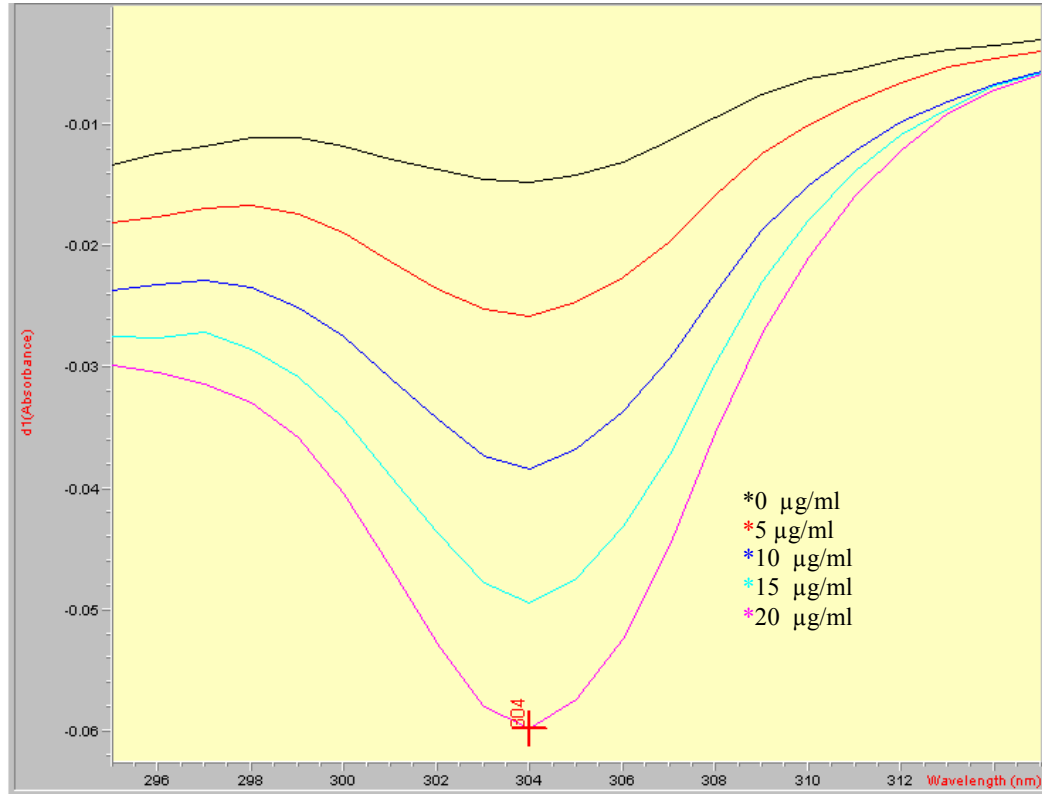
Çizelge 4.8 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri

C µg/ml	$^1D_{1(304nm)}$	$^1D_{2(304nm)}$	$^1D_{3(304nm)}$	$^1D_{4(304nm)}$	$^1D_{5(304nm)}$	$^1D_{6(304nm)}$	$^1D_{ort}$	S	%S
5	2.3380	2.5106	2.3583	2.3703	2.1728	2.3610	2.3518	0.1076	4.5752
10	3.3592	3.4475	3.3598	3.4110	3.5070	3.4153	3.4166	0.0560	1.6390
15	4.3043	4.3477	4.0718	4.3011	4.3541	4.2980	4.2795	0.1047	2.4465
20	5.3228	5.3874	5.2732	5.3359	5.2658	5.3152	5.3167	0.0445	0.8370
25	6.3224	6.3791	6.2678	6.3357	6.2895	6.3072	6.3170	0.0388	0.6142

Çizelge 4.9 BHA tayini için sakız mayası kullanılarak hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
a	1.3496	1.5114	1.3465	1.3941	1.3202	1.4017	1.3873
b	0.1986	0.1935	0.1946	0.1971	0.1998	0.1958	0.1966
r	0.9999	0.9997	0.9975	0.9998	0.9969	0.9997	0.9989

$$\text{BHA' a ait ölçü eğrisi } ^1D_{304} = 0.1966 c + 1.3873 \quad r = 0.9989$$



Şekil 4.9 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 1. derece türev spektrumları

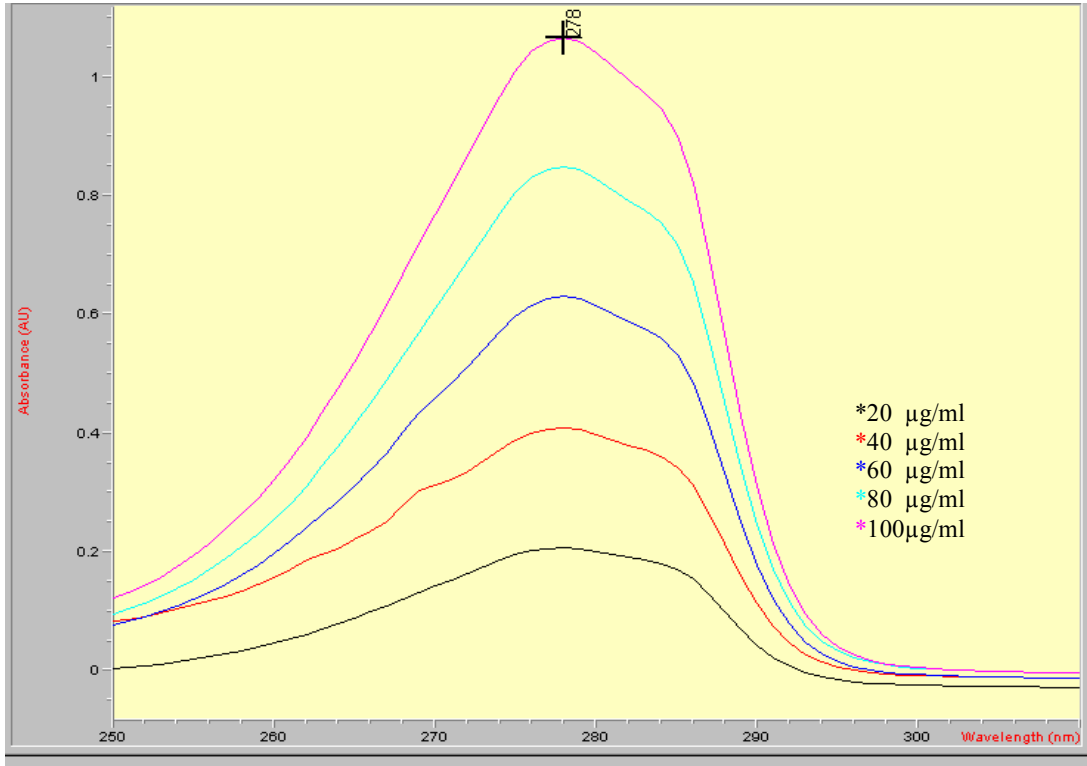
Çizelge 4.10 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait 304 nm'deki $^1D_{304}$ değerleri

C µg/ml	$^1D_{1(304nm)}$	$^1D_{2(304nm)}$	$^1D_{3(304nm)}$	$^1D_{4(304nm)}$	$^1D_{5(304nm)}$	$^1D_{6(304nm)}$	$^1D_{ort}$	S	%S
0	1.4717	1.5513	1.5192	1.5587	1.5391	1.5305	1.5284	0.0311	2.0348
5	2.5815	2.6208	2.5803	2.6840	2.6390	2.6258	2.6219	0.0388	1.4798
10	3.8400	3.9202	3.9145	3.7600	3.6248	3.7308	3.7984	0.1150	3.0276
15	4.9386	5.0287	4.8861	4.9043	4.7128	4.8626	4.8889	0.1039	2.1252
20	5.9738	5.9480	5.8430	6.0178	5.8452	5.9452	5.9288	0.0706	1.1908

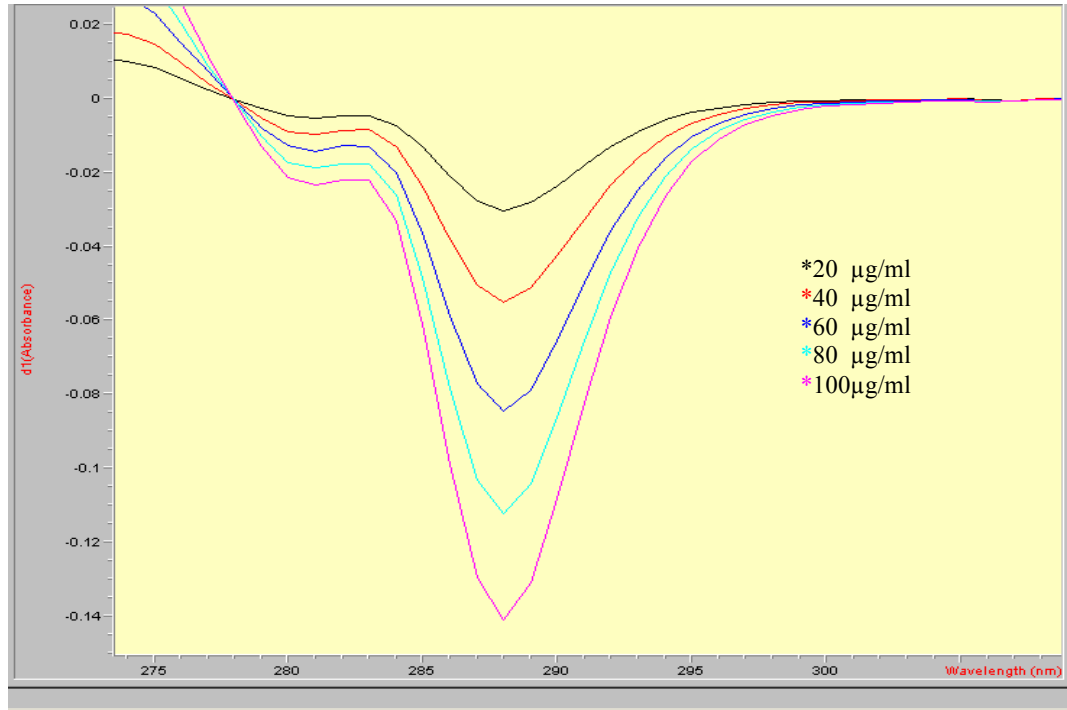
Çizelge 4.11 Standart katma çalışmasında BHA tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
a	1.4889	1.5735	1.5579	1.5573	1.5350	1.5257	1.5397
b	0.2272	0.2240	0.2191	0.2228	0.2137	0.2213	0.2214
r	0.9995	0.9985	0.9981	0.9999	0.9998	0.9999	0.9997

$$\text{BHA' a ait ölçü eğrisi } ^1D_{304} = 0.2214 c + 1.5397 \quad r = 0.9997$$



Şekil 4.10 BHT tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.11 BHT tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin 1.derece türev spektrumları

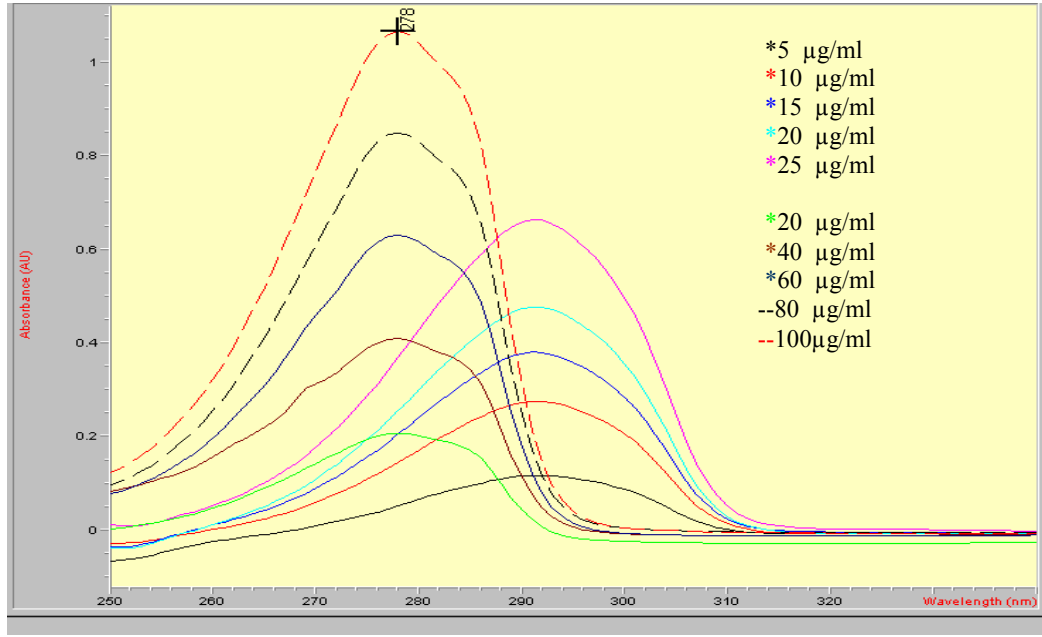
Çizelge 4.12 BHT tayini için hazırlanan ölçü eğrisinin 292 nm'deki $^1D_{292}$ değerleri

C µg/ ml	$^1D_{1(292nm)}$	$^1D_{2(292nm)}$	$^1D_{3(292nm)}$	$^1D_{4(292nm)}$	$^1D_{5(292nm)}$	$^1D_{6(292nm)}$	$^1D_{ort}$	S	%S
20	1.205	1.318	1.361	1.303	1.294	1.324	1.301	0.052	4.014
40	2.444	2.477	2.451	2.425	2.334	2.345	2.413	0.059	2.452
60	3.682	3.716	3.665	3.732	3.589	3.362	3.625	0.138	3.811
80	4.787	4.919	4.796	4.914	4.730	4.341	4.748	0.213	4.481
100	5.993	6.025	5.892	6.151	5.934	5.791	5.965	0.123	2.061

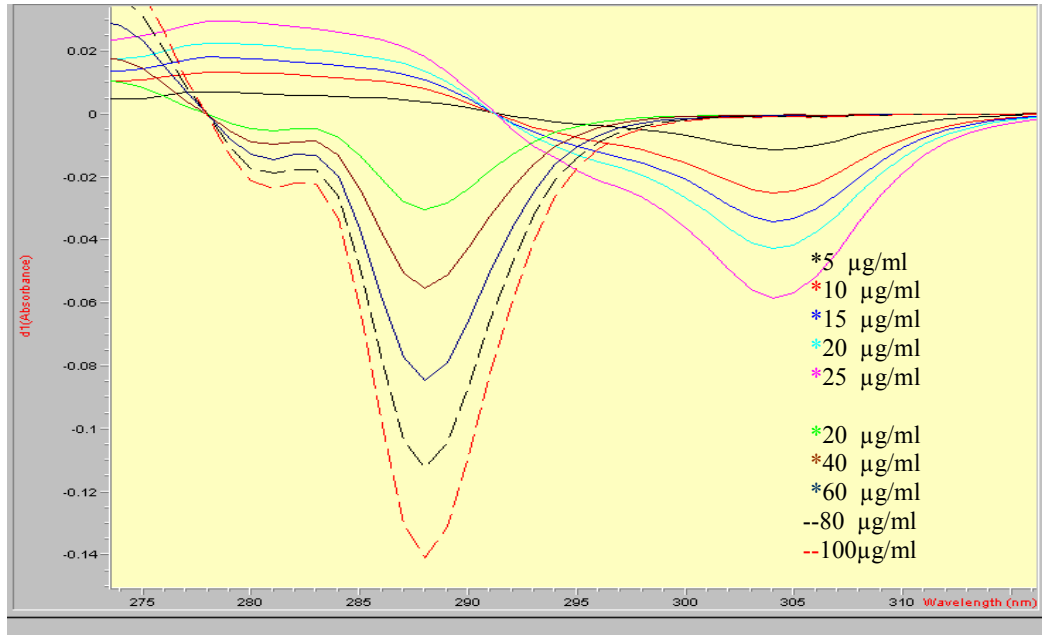
Çizelge 4.13 BHT tayini için hazırlanan ölçü eğrisine ait parametreler

	1	2	3	4	5	6	Ortalama
a	0.0462	0.1345	0.2109	0.0498	0.0734	0.1531	0.1115
b	0.0596	0.0593	0.0570	0.0609	0.0584	0.0547	0.0583
r	0.9998	0.9998	0.9999	0.9998	0.9997	0.9970	0.9998

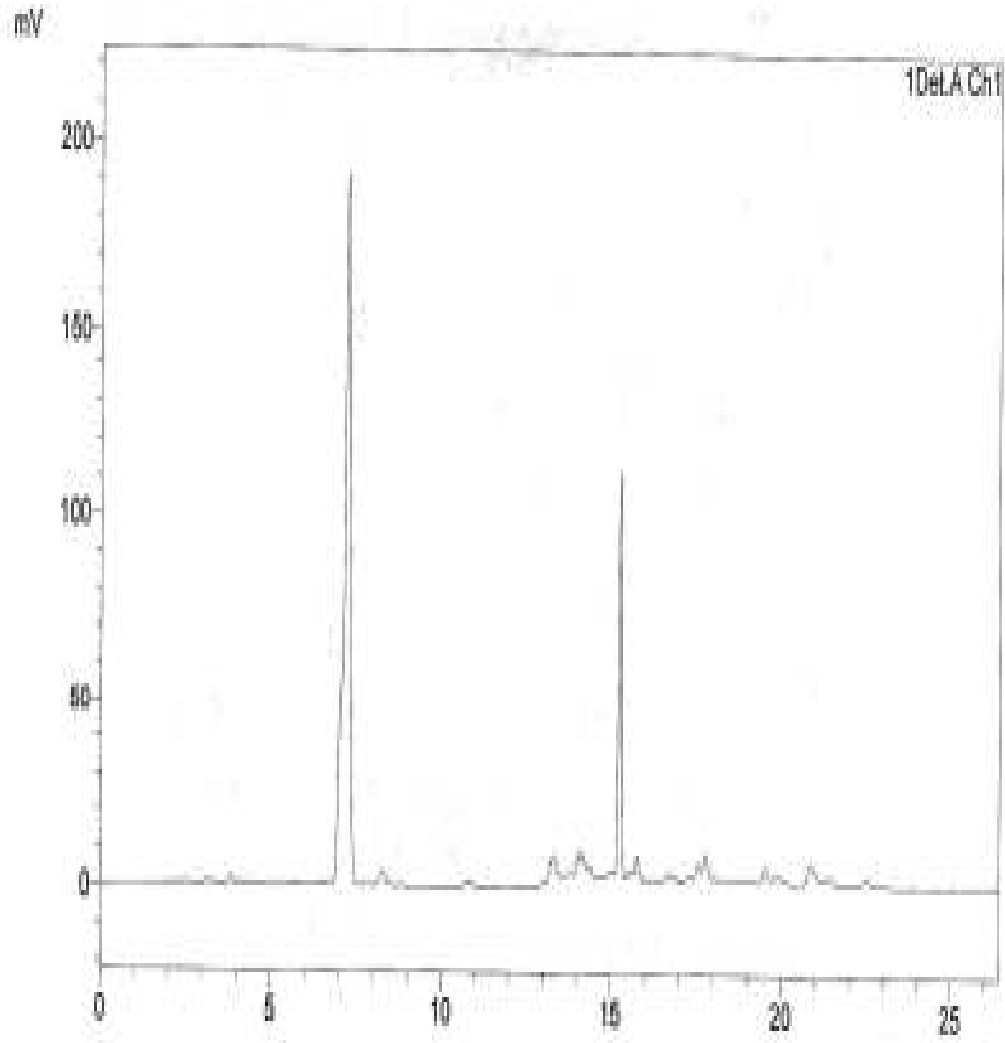
BHT' e ait ölçü eğrisi $^1D_{292} = 0.0583 c + 0.1115$ $r = 0.9998$



Şekil 4.12 BHA ve BHT'ye ait ölçü eğrilerinin absorpsiyon spektrumlarının üst üste çakıştırılması



Şekil 4.13 BHA ve BHT'ye ait ölçü eğrilerinin 1.derece türev spektrumlarının üst üste çakıştırılması



Şekil 4.14 Sakız örneğine ait HPLC kromatogramı

4.3 Geri Kazanma Testi

Geliştirilen yöntemin uygulanabilirliği açısından kontrolü için sakız örneğinde % geri kazanma çalışmalarının yapılması amacıyla Bölüm 3.4.9’da anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen sonuçlar için bağıl standart sapma ve % geri kazanma değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 4.14’te verildi.

Çizelge 4.14 BHA çözeltilerinde geri kazanmaya ait çalışma sonuçları

Standart eğri 1’den Bulunan 6.12 (µg\ml)				Standart Katma Yöntemi ile Bulunan 6.95 (µg\ml)			
Konulan (µg\ml)	% Bulunan	Bağıl standart sapma %	Verim	Konulan (µg\ml)	% Bulunan	Bağıl standart sapma %	Verim
10	9.62	3.8	96.2	10	8.79	12.10	87.9
15	14.23	5.13	94.8	15	13.41	10.60	89.4
20	18.64	6.8	93.2	20	17.81	10.95	89.5

Her iki yöntemde elde edilen geri kazanma değerleri %88.9 ila %96 arasında bulunmuştur.

4.4 Sakız (First White Şekersiz Sakız) Örneğinin Analizi

BHA ve BHT’yi içeren sakız örneğinde bu antioksidanların kantitatif miktarı Bölüm 3.4.7’de anlatıldığı gibi çalışılarak türev spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Elde edilen sonuçların kıyaslanması amacıyla HPLC yöntemi uygulandı. Her bir çalışma için 6 paralel tayin yapılarak ve ilgili ölçü eğrilerinden yararlanarak BHA ve BHT’nin miktarı hesaplandı. 6 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama $\bar{X}$, standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı değerleri $(\bar{X} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}})$ hesaplandı.

Geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem ve HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar; F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven aralığında karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar, bunların istatistik değerlendirilmesi, t ve F testleri sonuçları Çizelge 4.15’de toplu halde verilmiştir. Çizelge 4.15’den anlaşılacağı gibi, uygulanan her bir yöntemin sonuçları ayrı ayrı HPLC yöntemi ile elde edilen değerle t testi yapılarak karşılaştırıldı. Standart Eğri 1 yöntemi HPLC yöntemi ile kıyaslandığında t değeri %95 güvenirlilik için verilen tablo değerinden küçüktür. Yani ortalamalar birbirinden anlamlı derecede farklı değildir. Standart Eğri 2, Standart Eğri 3 ve Standart Eğri 4 yöntemleri HPLC yöntemi ile kıyaslandığında t değeri %95 güvenirlilik için verilen tablo değerinden büyüktür. Yani

ortalamalar birbirinden anlamlı derecede farklıdır. Yöntemlerin presizyon yönünden karşılaştırılması için uygulanan F testi sonucuna bakıldığında % 95 güvenilirlik ve $n_1 = n_2 = 6$ için ilgili tabloda F için verilen sınır değerinden küçük olduğu görülür. Buna göre yöntemler ile elde edilen presizyonlar arasındaki fark anlamlı değildir.

Bölüm 3.4.8’de anlatıldığı şekilde sakız numunesinde çalışılarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.15’te ve sakız örneğine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.14’te verildi.

Çizelge 4.15 Sakız numunesinde bulunan BHA tayini için elde edilen sonuçlar

	Standart Eğri 1 (mg\ kg)	Standart Eğri 2 (mg\ kg)	Standart Eğri 3 (mg\ kg)	Standart Eğri 4 (mg\ kg)	HPLC (mg\ kg)
Örnek 1	380	355	358	359	392
Örnek 2	367	339	335	345	380
Örnek 3	392	347	342	351	387
Örnek 4	393	337	332	350	395
Örnek 5	370	362	354	356	372
Örnek 6	390	342	340	348	401
$\bar{X}$	382	347	344	352	388
S	11.78	9.8	10.4	5.17	10.5
%S	3.08	2.82	3.02	1.46	2.72
n	6	6	6	6	6
$\bar{X} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$	3.94	3.57	3.54	3.57	3.99
t testi	0.92	6.95	7.26	9.61	
F testi	1.26	1.15	1.10	4.12	
$n_1 = n_2 = 6$ $t_{\text{tablo}} = 2.23$ $P = 0.05$ $F_{\text{tablo}} = 5.05$					

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada gıda maddelerine antioksidan olarak ilave edilen BHA ve BHT'nin herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmadan birarada tayini için yeni bir yöntem geliştirmeyi amaçladık. Bunun için BHA ve BHT içeren gıda ve kozmetik örnekleri piyasada araştırıldı. Aşağıdaki örnekler; içeriklerinde sakız : BHA, güneş yağı : BHT, gece bakım kremi : BHA + BHT içerdiği yazan ve ayrıca domates çorbası, ışkembe çorbası, tavuk çorbası, et suyu, cips gibi gıda ürünleri ise içeriklerinde yazmadığı halde resmi gazetede (1990) verilen bilgilerden (Çizelge 2.2) faydalanarak çalışma materyali olarak seçildi.

Güneş yağı ve gece bakım kreminde sakız örneğine uygulanan çalışma koşulları uygulanarak BHA ve BHT tayin edilmeye çalışıldı. Ancak fiziksel ve diğer etken maddelerin spektral girişimleri nedeni ile dalga boylarında kaymalar görüldüğünden çalışmaya devam edilemedi. Domates çorbası, ışkembe çorbası, tavuk çorbası, et suyu ve cipste yapılan çalışmalarda ise domates çorbasının her ikisini de içerdiği; et suyu, ışkembe çorbası, tavuk çorbası ve cipsin ise BHT içerdiği saptanmıştır. Ancak diğer etken maddelerden gelen spektral girişimlerin olmadığı fakat çalışılan koşullardaki örnekten gelen girişimlerden yüksek sonuçlar almamız nedeniyle yeniden literatürler incelendiğinde bu tür girişimlerin çok seyreltik örneklerle giderilebileceğini saptadık. Bu nedenle çalışmalar yalnızca sakız örneğinde sürdürüldü. Sakız örneklerinde BHA tayini için geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem dört ayrı şekilde uygulandı ve sonuçlar HPLC yöntemi ile mukayese edildi. Gerek türev spektrofotometrik gerek HPLC yöntemleri ile elde edilen sonuçların birbirine yakın değerler olduğu görüldü. Türev spektrofotometrisi ile sakızdan gelen girişimlerin giderildiği saptandı. Böylece herhangi bir belirteç kullanmaksızın BHA içeren sakız örneklerinden metanol ile ekstrakte edilen antioksidanın birinci derecede türev spektrumlarında 304 nm'deki türev absorbands değerlerinden yararlanılarak tayinin mümkün olduğu görüldü. Geliştirilen yöntem basit ve ekonomik bir yöntem olarak laboratuvarında BHA içeren sakızların analizinde tercihen kullanılabilir.

Geliştirilen yöntem ile BHT tayininde ise farklı günlerde yapılan ölçümlerdeki sonuçlarda tutarsızlıklar görüldü. Ayrıca sakız örneğinde yapılan kantitatif tayin sonuçları ile HPLC yöntemi ile elde edilenler arasında da farklılıklar gözlemlendi. Sonuçlar arasındaki bu farklılıkların BHT'nin 292 nm olarak saptanan dalga boyunun maksimum absorpsiyonun gözlemlendiği tepe noktasına değil de daha uç noktaya gelmesinden kaynaklanabileceği

düşünüldü. Daha üst derecede türevler alınarak ve seyreltik numuneler ile çalışarak problemin çözülebileceğine karar verildi.

KAYNAKLAR

- Abusshita, A.A., Hebshi, E.A., Daood, H.G., Biacs, P.A., Food Chem. Eng., 60(2), 207-212, 1997, Ref: C.A., 127, 134822u, (1997).
- Aeschbach, R., Rossi, P., Eur.Pat. Appl. EP 728,420 (ClA23L3/3472), 28 Aug. 1996, Appl. 95/102, 439, 21 Feb. 1996, 12pp., Ref: C.A. 125,194115j, (1996).
- Aguilar, M.P., Gomez, A., Perez, D., J. Agric. Food Chem. , 48, 312-317, (2000).
- Ahn, C.A., Hyun, K.H., Park, K.H., Han'guk Sikip'um Kwahakhoechi 1992, 24(1), 31-6 , Ref: C.A., 119, 47898q, (1993).
- Anon., Parfums, Cosmet, Aromes, 1993, 11, 52-4, Ref:C.A., 120, 37780b, (1994).
- Ariga, T., Hamano, M., Motai, H., Yatsusu, S., Yamada, M., Myaji, M., Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 03,200,781 [91,200,781] (Cl. C07D311/40), 02 Sep. 1991, Appl. 89/338,387,28 Dec. 1989, 7pp., Ref: C.A. 115,278534b, (1991).
- Asimgil, A., "Şifalı Bitkiler", Timaş, İstanbul, (1999).
- Baytop, T., "Türkiye'de Bitkilerle Tedavi", İ.Ü. Eczacılık Fak., İstanbul, (1984).
- B.D. Page, J. AOAC Int. 76, 765, (1993).
- Bea, E.A., Kwon, T.W., Moon, G.S., Han'guk Sikip'um Yongyang Kwahak Heochi 1997, 26(3), 371-373, Ref: C.A.,127, 204709p , (1997).
- Buck. D.F., "Food Additive users Handbook", (Smith, J., Ed.), AVI Puplichers, New York, (1991).
- Ceballos, C., Fernandez, H., Food Research International, 33, 357-365, (2000).
- Chen, C.W., Ho, C.T., J. Food Lipids, 2(1),35-46, Ref: C.A. 123, 197157u, (1995).
- Cruces-Blanco, C., Segura Carretero, A., Merino Boyle, E., Fernandez Gutierrez, A., Talanta, 50, 1099-1108, (1999).
- Cunniff (Ed.), P., AOAC Official Method 983.15, Official Method of Analysis, 16.th Ed. AOAC, Arlington, VA, p.2, Chapter 47, (1995).
- Dei, Y. Foods Food Ingredients J. Jpn., 1995,, 163, 56-62, Ref: C.A., 122, 212456r, (1995).
- Diaz, T.G., Cabanillas, A.G., Food Sci. Technol. (N.Y.), 1996, 77 (Handbook of Food Analysis, vol. 2), 1867-1887, Ref: C.A., 125,219817e, (1996).
- Diplock, A.T., Anal. Proc. Eng. 27(8), 223-4, 1990, Ref: C.A. 115, 109501h, (1991).
- Eröztürk, N., "Bir Yudum Sağlık", Anahtar Yayınları,İstanbul, (2000).

- Espinosa-Mansilla, A., Salinas, F., Del Olmo, M., De Orbe Paya, I., *Applied Spectrosc.* 50(4), (1996).
- Furuta, S., Nishiba, Y., Suda, I., *J.Food Sci.*, 1997, 62(3), 526-528, Ref: C.A., 127,108082h, (1997).
- Gagliandi, L., De Orsi, D., Mana, I., Taneli, D., *J.Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 20 ,11, (1997).
- Gıda Maddeleri Yönetmeliği, Resmi Gazete, Sayı:20541, (7 Haziran 1990).
- Gonzalez, M., Ballestros, E., Gallego, M., Varcancel, M., *Anal. Chim. Acta*, 359 , 47-55, (1998).
- Grosset, C., Cantin, D., Villet, A., Alary, J., *Talanta*, 37, 301-306, (1989).
- Gür, E. ve Altuğ, T., “Gıda Katkı Maddeleri”, Ege Üniversitesi Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü, İzmir, (2001).
- Hara, M., Sugiura, M., *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 01,275,592 [89,275,592]*, (Cl. C07G3/00), 06 Nov. 1989, Appl. 88/103,854, 24 Apr. 1988, 3pp., Ref: C.A., 112, 204664k, (1990).
- Huang, G., Lei, Y., Chen, W., *Shipin Kexue(Beijing)*, 17(1),22-3(ch.), 1996, Ref: C.A. 124,341476n, (1996).
- Irache, J.M., Ezpelata, I., Vega, F.A., *Sci. Aliments, Fr.*, 17(1),95-105, 1997, Ref: C.A., 127, 4344h, (1997).
- Iriskina, L.B. Zhusupova, G.E. Erzhanova, M.S., *Khim. Priir.Soedin. Russ.* (5), 757, 1995, Ref: C.A.,125,67946f, (1996).
- Ishii, K.,Furuta, T., Kasuya, Y., *J. Chromatogr. B.* 794(1), 49-56, (2003).
- Ivanovic, D., Guernet-Nivaud, E., Guernet, M., 23(6), 1123-1137, (1990).
- İstanbul Üniversitesi ders notları, (1995).
- Kahleyss, R., Michlbauer, F. *Eur. Pat. Appl. EP 560,291 (Cl. C09K15/34)*, 15 sep. 1993, DE Appl. 4,207,739, 11 Mar 1992, 6pp., Ref: C.A.,120,109933d, (1994).
- Karovicova, J., Simko,P., *Journal of Chromatography A*, 882, 271-281, (2000).
- Kawagishi, S., Oosawa, T., *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 06,306,093 [94,306,093] (Cl. C07H17/04)*, 01 Nov. 1994, JP Appl. 93/63,015, 25 Feb 1993, 6pp., Ref: 122, 238247y, (1995).
- Keskin, H., “Besin Kimyası”, Güryay Matbaacılık Tic. Ltd. Şti., İstanbul, (1987).

- Luterotti, S., Franko, M., Bicanic, D., J.Pharm Biomed. Anal., 21, 901-909, (1999).
- Markopolou, C.K., Koundourellis, J.E., Journal of Pharm. and Biomed. Analysis, 33, 1163-1173, (2003).
- Mendoza, B.R., Pols, S.M., Bargallo, A.I.C., Iopez-Sabater, M.C., J. Chromatogr. A., 1018, 197-202, (2003).
- Miler, N.J., Rice-Evans, C.A., Davles, M.J., Biochem. Soc. Trans. Eng. 21(2), 95S, 1993, Ref: C.A., 119, 103463h, (1993).
- Mindell, E., "Anti-Aging Mucizesi", Prestij Yay., İstanbul, (2003).
- Müftüoğlu, O., "Yaşasın Hayat", Doğan Kitapçılık, İstanbul, (2003).
- Ni, Y., Wang, L., Kokot, S., Analytica Chimica Acta, 412, 185-193, (2000).
- Ni, Y., Liu, C., Analytica Chimica Acta, 396, 221-230, (1999).
- Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A., Jam. Oil. Chem. Soc. 1993, 70(8), 773-8, Ref: 120, 297732x, (1994).
- Nouguera-Orti. J.F., Villanueva-Camanas, R.M., Ramis-Ramos, G., Anal. Chim. Acta. 402, 81-86, (1999).
- Oliviera, E.J., Watson, D.G., J. Chromatogr. B., 764(1-2), 3-25, (2001).
- Oosawa, T., Ochi, H., Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 06,271,850 [94,271,850], (Cl. C09K/06), 27 Sep. 1994, Appl. 93/87,896,23 Mar. 1993, 6pp., Ref: C.A., 122, 54686j, (1996).
- Öner, Y., Tuz, U., Güleç, S., "Besinlerdeki antioksidan maddeler ve genel tayin yöntemleri", İstanbul Üniversitesi Bitirme Tezi, (2004).
- Patterson, H.B.W., "Handling and Storage of Oilseeds, Oils,Fats and Meat", Elsevier Science Publishers Ltd., England 10-20, (1989).
- Pejic, N.,Kuntic, V., Vujic, Z., Micic, S., ii Farmaco, 59,21-24, (2004).
- Perrin, C., Meyer, L., Food Chem., 77., 93-100, (2002).
- Prof. Dr. Mahmure Üstün Özgür'ün seminer notları, (1998).
- Prof. Dr. Sıdıka Sungur'un seminer notları, (1990).
- Rafecas, M., Guardiola, F., Illera, M., Codony, R., Boatella, J., Journal of Chromatography A, 822, 305-309, (1998).
- Rizzolo, A., Brambilla, A.,Vasecchi, S., Eccher-Zerbini, P. Food Chemicals., 77,257-262, (2002).

Sato, T., Niino, Y., Matsumoto, H., Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 06,228,557 [94,228,557] (Cl. C09K15/06), 16 Aug. 1994, Appl. 93/16,615, 08 Feb. 1993, 5pp., Ref: C.A., 122,30230e; (1995).

Sawamura, M., Fuwa, J., Akano, H., Kawamura, K., Jpn.Kokai Tokyo Koho JP 05 98,255 [93 98,255] (Cl. C09K15/34),20 Apr. 1993, Appl. 91/258,180,04 Oct. 1991, 4pp. Ref: C.A., 119,115955h, (1993).

Schieber, A., Keller, P., Carle, R., J. Chromatogr. A., 910, 265-273, (2001).

Skerget, M., Kotnick, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M., Knez, Z., Food Chemicals., baskıda, (2004).

Skoog D.A.,Holler F.J., Nieman T.A., 5th ed., Çevirisi. Çeviri Editorleri: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., İki bölümün çevirisi : Henden E., “Enstrumental Analiz İlkeleri” , Bilim Yayıncılık ,Ankara (2000).

Sommerbur, O., Zang, L.Y., Van kuijk, F.J.M., J. Chromatogr., B:Biomed. Sci. Appl. Eng., 695(2), 209-215, 1997, Ref: C.A. 127,187634r, (1997).

Sousa, W.R., da Rocha, C, Cardoso, C.L., Silva,D.H.S,Zanoni, M.V.B., J. Food Comp. Anal., baskıda, (2003).

Summanen, J., Vuorela, H., Hiltunen, R., Siren, H., Riekkola, M.L., J. Chomatogr. Sci. Eng. 33(12), 704-11, 1995, Ref: C.A. 124,7312r, (1996).

Takaya, I., New Food Ind.,1993, 35(3), 17-22, Ref:C.A., 119,26970s, (1993).

Talsky, G., Derivative Spectrophotometry, VCH, New York, (1994).

Tan, S., Ma, B., Zhang, X., Chogquing Daxue Xuebao, 1991, 14(6), 119-20, Ref: C.A. 119, 26943k, (1993).

Tanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Z.Lebensm.-Untrs. Forsh. 1996, 203(3),220-223, Ref: C.A. 125,220058q, (1996).

Tsuda, T., Watanebe M., Ohshima K., Yamamoto, A., Kawaskishi, S., Osawa, T., J. Agric. Food Chem. 1994, 42(12), 2671-4 , Ref: C.A., 121, 299533q, (1994).

Tsuruizumi, A. Jpn., Kokai tokkyo Koho JP 05,236,918 [93,236,918],(Cl. A23L3/3463), Jpn., 17 Sep. 1993,Appl. 92/78,234,27 Feb. 1992,4pp.,Ref: C.A., 120,29805y, (1994).

Tütem, E., Apak, R., Günaydın. E., Sözgen, K., Talanta, 44, 249-255, (1997).

Xie, B., Shi, H., Chen, Q., Ho, C.T., Proc. Nstl. Sci. Counc.,Repub. China, Psrt B: Life Sci. 1993, 17(2), 77-84, Ref:C.A., 120, 24299r, (1994).

Yang, M.-H., Lin, H.J., Choong, Y.-M., Food Res. Intl., 35(7), 627-633, (2001).

Yılmaz, B., Öztürk, M., Kadioğlu, Y.Y., Farmaco 59, 723-727, (2004).

Zbiech, M.A., Goszcz, H., Pr. Inst. Lab. Badaw. Perzm. Apozyw. Pol. 49,63-74, 1994, Ref: C.A. 123,142063e , (1995).

Zhao, B., Tham, S.Y., Lu, J., Lai, M.H, Lee, L.K.H., Moochhaha, S.M., J. Pharm. Sci., 7(2), 200-204, (2004).

<http://www.bitkisel-tedavi.com>

<http://www.sagligim.com>

<http://www.gidaraporu.com>

<http://www.naturabesinsel.com>

<http://www.sagligim.com>

<http://www.vikipedi.com>

<http://www.vitacost.com/science/nutrients/antioxidants.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	20.04.1979	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1995-1998	Hasan Polatkan Lisesi
Lisans	2002-2005	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2005-	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Anorganik Kimya Programı

Çalıştığı kurumlar

2006-2007 Selimpaşa Lisesi Kimya Öğretmenliği