T.C. CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAY VE BAZI KURUYEMİŞ TÜRLERİNDE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ-UV/VİS İLE FİTİK ASİT TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin KARACA

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Analitik Kimya

MANİSA-2014

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇAY VE BAZI KURUYEMİŞ TÜRLERİNDE YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ-UV/VİS İLE FİTİK ASİT TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülçin KARACA

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04.02.2014
Tezin Savunulduğu Tarih : 13.02.2014

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Kenan DOST
Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Ali ÇELİK
: Yrd.Doç.Dr. Pelin GÜNÇ ERGÖNÜL

MANİSA-2014

İÇİNDEKİLER

SEMBOL LİSTESİ……IV
TABLO LİSTESİ……V
ŞEKİL LİSTESİ……VI
KISALTMALAR……VII
TEŞEKKÜR……VIII
ÖZET……IX
ABSTRACT……X
GİRİŞ……1
1. FİTİK ASİT ... 3
1.1. Fitik Asitin Meydana Gelişi ... 3
1.2. Fitik Asitin Yapısı ... 3
1.3. Fitik Asidin IR Spektrumu ... 4
1.4. Fitik Asidin Kaynakları ... 4
1.5. Fitik Asidin Bitki Üzerindeki Etki Şekli ... 5
1.6. Fitik Asidi Parçalayan Enzim: Fitaz Enzimi ... 5
1.7. Fitik Asidin İnsan Sağlığı Açısından Önemi ... 7
1.8. Fitik Asidin İnsan Sağlığına Olumlu Etkileri ... 8
1.8.1. Fitik Asidin Antioksidan Fonksiyonu ... 8
1.8.2. Fitik Asidin Böbrek Hastalıkları ve Böbrek Taşı Oluşumundaki Etkisi ... 10
1.8.3. Fitik Asitin İnsan sağlığı Açısından Diğer olumlu Etkileri ... 11
1.9. Fitik Asitin Mineraller ve Proteinler Üzerine Olumsuz Etkisi ... 12
1.9.1. Fitik Asidin Mineral Absorpsiyonunu Engellemesi ... 12
1.9.2. Protein-Fitik Asit İlişkisi ... 14
2. ÇAY VE KURUYEMİŞ ÜRÜNLERİ ... 15
2.1. Çay ve Çay Bitkisi ... 15
2.1.1. Yeşil Çay ... 15
2.1.2. Oolong Çay ... 15
2.1.3. Siyah Çay ... 15
2.1.4. Çayın Genel Bileşimi ... 15
2.1.5. Çay ve Sağlık İlişkisi ... 16
2.1.5.1. Çay ve Kanser ... 17
2.1.5.2. Çay ve Böbrek ... 17
2.2. KURUYEMİŞ ... 18
2.2.1. Kuru Yemişlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi ... 19

3. ULTRAVİYOLE–GÖRÜNÜR BÖLGE (UV-VIS) MOLEKÜLER ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ 20
3.1. IŞININ ABSORBBİYONU 20
3.2. BEER YASASI 21
3.3. ULTRAVİYOLE-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROFOTOMETRESİ 22
3.3.1. Spektrofotometre Cihazının Kısımları 22
3.4. ULTRAVİYOLE VE GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİNİN KALİTATİF UYGULAMALARI 23
3.5. ULTRAVİYOLE VE GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİNİN KANTİTATİF UYGULAMALARI 23
4. KROMATOGRAFİK METOTLARA GİRİŞ 25
4.1. KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI 25
4.2. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ 27
4.2.1. HPLC'NIN KAPSAMI 27
4.2.2. HPLC CİHAZI 28
4.2.2.1. Hareketli Faz Kapları ve Çözücü Muamele Sistemleri 28
4.2.2.2. Pompalama Sistemleri 29
4.2.2.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri 29
4.2.3. Sıvı Kromatografi Kolonları 30
4.2.3.1. Analitik Kolonlar 30
4.2.3.2. Koruyucu Kolonlar 30
4.2.3.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri 30
4.2.3.4. Bağlı-Faz Dolgu Maddeleri 31
4.2.3.5. Normal-Faz ve Ters-Faz Dolgu Maddeleri: 31
4.2.3.5.1. Normal-Faz Dağılma Kromatografisi 32
4.2.3.5.2. Ters-Faz Dağılma Kromatografisi: 32
4.2.4. Dedektörler 32
4.2.4.1. İdeal Bir Dedektörün Özellikleri 33
4.3. KROMATOGRAFİNİN UYGULAMALARI 34
4.3.1. Kalitatif Analiz 34
4.3.2. Kantitatif Analiz 34
4.3.2.1. Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler 34
4.3.2.2. Pik Alanına Dayalı Analizler 35
4.3.2.3. Kalibrasyon ve Standartlar 35
4.3.2.4. İç Standart Yöntemi 35
4.4. HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler 35

4.4.1. Hareketli Faz Çözücüleri için Önlemler 35
4.4.2. Kolon Kullanımı için Önlemler 36
5. MATERYAL VE METOT 37
5.1. UV-VIS BÖLGE SPEKTROSKOPİSİ İLE FİTİK ASİT TAYİNİ 37
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar 37
5.1.2. Materyal 37
5.1.3. Materyalin Hazırlanması 37
5.1.4. Deney Uygulamaları 38
5.1.4.1. Örneklerin Ekstraksiyonu 38
5.1.4.2. Standartların Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 38
5.1.4.3. Örneklerin Analizi 39
5.1.4.4. Kafein Analizi: 39
5.2. HPLC İLE FİTİK ASİT TAYİNİ 40
5.2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar 40
5.2.2. Materyal 41
5.2.3. Materyalin Hazırlanması 41
5.2.4. Deney Uygulamaları 41
5.2.4.1. Örneklerin Ekstraksiyonu 41
5.2.4.2. Standartların Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması 41
5.2.4.3. Örneklerin Analizi 42
5.2.4.4. Kafein Analizi: 42
5.2.4.5. Sabunlaşma 42
5.2.4.6. Sıcaklık kontrolü 43
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 44
6.1. UV-VIS BÖLGE SPEKTROSKOPİSİ İLE FİTİK ASİT TAYİNİ 44
6.1.1. Numune İçerisindeki Fitik Asit Miktarlarının Hesaplanması 49
6.1.1.1. Kafein Analizi 50
6.2. HPLC İLE FİTİK ASİT TAYİNİ 52
6.2.1. Numune İçersindeki Fitik Asit Miktarlarının Hesaplanması 60
6.2.1.1. Fitik Asitin Sıcaklıkla Bozunması 62
6.2.1.2. Sabunlaşma ile Basınç Değişimi: 62
6.3. SONUÇ 65
KAYNAKLAR 67

SEMBOL LİSTESİ

A : Absorbans

C : Derişim

Ca^{+2} : Kalsiyum (II)

Cr^{+3} : Krom (III)

Cu^{+2} : Bakır (II)

Fe^{+3} : Demir (III)

Mn^{+2} : Mangan (II)

Ni^{+2} : Nikel (II)

Zn^{+2} : Çinko (II)

P : Çıkan ışın şiddeti

P_0 : Giren ışın şiddeti

T : Geçirgenlik

λ : Dalga boyu

ε : Molar absorptive

α : Şeçicilik Faktörü

σ^2 :Kromatografik grafiğin standart sapması

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Bazı besin maddelerinin fitik asit içerikleri (mg g^{-1}) 5
Tablo 2.1. İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi (kuru ağırlıkta %) 16
Tablo 2.2. Üretim aşamalarında siyah çayın kafein içeriğindeki değişimi 16
Tablo 2.3. Bazı kuruyemiş türlerinin besin değerleri 100 g için 18
Tablo 4.1. Düzlemselkromatografinin sınıflandırılması 25
Tablo 4.2. Kolon kromatografikyöntemlerin sınıflandırılması 26
Tablo 6.1. Fitik asit standartlarının ilavesiyle demir(III)-5 sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonu değerleri 45
Tablo 6.2. 100 mg L^{-1} fitik asit standardı için UV-Vis yöntemin ölçüm tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler 46
Tablo 6.3. 50 mg L^{-1} fitik asit standardı için UV-Vis yöntemin ölçüm tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler 47
Tablo 6.4. Üç ayrı 50 mg L^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyon değerleri 48
Tablo 6.5. Yer değiştirme reaksiyonunun tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler 48
Tablo 6.6. Tüm örneklerin UV-Vis spektrofotometre ölçümü ile hesaplanan fitik asit miktarları 50
Tablo 6.7. Standart fitik asit çözeltisi ve kafein ilavesiyle demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişimi 51
Tablo 6.8. Fitik asit standartlarının pik alanları 54
Tablo 6.9. 50 mg L^{-1} fitik asit standardı için HPLC yöntemin tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler 56
Tablo 6.10. 5 mg L^{-1} fitik asit standardı için HPLC yöntemin tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler 57
Tablo 6.11. Üç ayrı 50 mg L^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin pik alanı değerleri 58
Tablo 6.12. Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler 58
Tablo 6.13. Üç ayrı 5 mgL^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin pik alanı değerleri 59
Tablo 6.14. Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler 59
Tablo 6.15. Tüm örneklerin HPLC ölçümü ile hesaplanan fitik asit miktarları 61
Tablo 6.16. UV-Vis ve HPLC yöntemleri ile kuruyemiş ve çay ürünlerinde tayin edilen fitik asit miktarları 63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Anderson tarafından önerilen fitik asit modeli 2
Şekil 1.2. a.Fitik asitin sandalye konformasyonu, b. Fitik asitin açık yapısı 3
Şekil 1.3. Fitik asidin FT-IR spektrumu..... 4
Şekil 1.4.(A) Fitik asidin mikrobiyal kaynaklı fitaz enzimi ile hidrolizi (3-fitaz), (B) Fitik asidin bitkisel kaynaklı fitaz enzimi ile hidrolizi (6-fitaz)…….....6
Şekil 1.5. pH=5.5 ta hiperkalsiürik yapay idrar kullanıldığında fitik asitin domuz mesane epitel hücrelerindeki kristal gelişimine etkisi..... 11
Şekil 1.6. Fitik asidin nişasta ile etkileşimi..... 12
Şekil 1.7. Fitik asidin proteinlerle ve minerallerle etkileşimleri 14
Şekil 4.1. Sıvı kromatografinin uygulamaları 27
Şekil 4.2. Bir HPLC cihazının şematik görünüşü (Perkin Elmer)..... 28
Şekil 4.3.Sıvı kromatografide enjektör sisteminin çalışma prensibi 29
Şekil 4.4. Kolon dolgu maddesinin temel yapısı..... 31
Şekil 4.5. UV dedektör..... 33
Şekil 5.1. Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis Spektrofotometre..... 37
Şekil 5.2. Perkin Elmer Series 200 Marka HPLC cihazı..... 40
Şekil 6.1. Fitik asit standartlarının ilavesi ile demir(III)-5 sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişim. 45
Şekil 6.2. Fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi..... 45
Şekil 6.3. Kafein çözeltisi ile fitik asit standardının ilavesi ile demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişim 51
Şekil 6.4. Demir(III)-tiyosiyanat kompleksine fitik asit ilavesi sonucu elde edilen kromatogramı. 52
Şekil 6.5. Yeşil çay örneğine ait kromatogramı 53
Şekil 6.6. Döteryum lamba kullanıldığında fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi 54
Şekil 6.7. Vis lamba kullanıldığında fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi..... 55
Şekil 6.8. Fitik asit standartlarının ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin absorpsiyonundaki değişime ait HPLC kromatogramı. 55

KISALTMALAR

AH_2 : Askorbik asit

$CaC_2O_4 . H_2O$: Kalsiyum oksalat mono hidrat (oksalat taşları)

$CaC_2O_4.2H_2O$: Kalsiyum oksalat dihidrat (oksalat taşları)

$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$: Kalsiyum fosfat (fosfat taşları)

$FeCl_3 . 6H_2O$: Demir(III) klorür hegza hidrat

FeSCN : Demir tiyosiyanat

FT-IR : Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi

HPLC :Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IP6 : Myo-inositol hegzafosfat, Fitik asit

IP5 : Myo-inositol pentafosfat

IP4 : Myo-inositol tetrafosfat

IP3 : Myo-inositol tri fosfat

IP2 : Myo-inositol difosfat

IP1 : Myo inositol mono fosfat

IR spektroskopisi : Infrared spektroskopisi

$MgNH_4PO_4 . 6H2O$: Magnezyum amonyum fosfat hegza hidrat (fosfat taşları)

mL : Mililitre

•OH : Hidroksil radikali

RDS : Bağıl standart sapma

SD : Standart sapma

UV-VIS :Ultraviyole görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi

µL : Mikrolitre

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca gösterdiği ilgi, anlayış ve önerileri ile bana her konuda yol gösteren, çalışmamın tamamında karşılaştığım bütün problemlerle hoşgörü ile tek tek ilgilenen, engin fikirleriyle yetişmeme ve gelişmeme katkıda bulunan değerli danışmanım, saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kenan DOST'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle cihaz konusunda yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Mertcan ÖKSÜZ, Mustafa CİTTAN, Abdullah KARANFİL ve Mehmet Emin ŞEKER'e ve çalışmam boyunca manevi desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Sevim ÖZGÜNDE, Aslı ÖZLÜ, Seda YETİM ve Uğur KONUK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm eğitim öğretim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni bu günlere getiren, maddi ve manevi her türlü desteğini eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkürler.

Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine 2012-077 nolu projeyi desteklediken dolayı teşekkür ederiz.

ÖZET

Gıda ürünlerinin birçoğunda yer alan fitik asit, vücutta bulunan fazla miktardaki kalsiyum ile kompleks oluşturarak kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunu engeller, böbrekte ve idrar yolunda taş oluşum riskini azaltır. Ayrıca, doğal bir antioksidan özelliğe sahip olması nedeniyle demir katalizli oksidatif reaksiyonları, serbest radikallerin ve dolayısıyla da bazı kanser türlerinin oluşumunu engeller.

Bu çalışma kapsamında, çeşitli kuru yemiş ve çay türlerinde bulunan fitik asit miktarlarının tayini için HPLC-Vis ve UV- Vis yöntemleri kullanılmıştır. Fitik asidin UV-Vis bölgede karekteristik bir absorpsiyon spektrumunun olmaması, demir-fitik asit kompleksinin karalı ve oluşum sabitinin yüksek olmasından dolayı tayinler; fitik asit ilavesiyle UV-Vis yönteminde demir(III)-5-sülfosalisilat, HPLC yönteminde ise demir(III)-tiyosiyanat komplekslerinin absorpsiyonlarındaki azalmanın 500 ve 460 nm'de ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. HPLC yönteminde örnekler, demir(III)-tiyosiyanat kompleksi ile muamele edildikten sonra doğrudan sisteme enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak 0,1 M HNO_3 içeren % 30'luk asetonitril karışımı ve akış hızı da 1 mL dak^{-1}. olarak ayarlanmıştır. Bu şartlarda gerçek alıkonma zamanı 2,8 dakikadır. Kuru yemiş, çay ve demlenmiş çaydaki fitik asit miktarları sırasıyla 1.54 – 9.74, 20.49 – 28.82 ve 26.53 – 29.84 mg g^{-1} olarak bulunmuştur.

Spektrofotometrik yöntem, HPLC-Vis yönteminin doğruluğunu ve sonuçlarını karşılaştırmak amacıyla paralel olarak kullanılmıştır ve her iki yöntemle elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyumludur.

Anahtar Kelimeler : Fitik asit, demir(III)-tiyosiyanat,kuru yemiş, çay, HPLC, UV-Vis

ABSTRACT

Phytic acid which exists in many natural products, and prevents to develop the calcium oxalate crystals (kidney stones) in kidney and urine by formation a complex with excess of calcium ions. Phytic acid also plays an antioxidant role to inhibit of iron-catalyzed oxidative reaction and formation of free radicals and reduce some cancers spices.

The scope of this study, HPLC-Vis and UV-Vis methods were used for the determination of phytic acid in some type of nuts and tea leaves. Phytic acid does not have a characteristic absorption spectrum in UV-Vis region, but it forms a stably complex with iron, therefore the determination of phytic acid was performed by measurement of the absorption of the ion**(**III**)-**5**-**sulfosalicylatecomplex in UV-Vis method and ion(III)-tiocyanide complex in HPLC method at 500 and 460 nm, respectively. Samples were treated with the iron-tiocyanide complex than directly injected into the HPLC system. Flow rate of the mobile phase, which was 30 % acetonitril/water consists of 0.1 M HNO_3, was adjusted at 1 mL min^{-1}. The real retention time was 2.8 min. in these conditions. The level of phytic acid in nuts, tea leaves and cooked tea are ranged between 1.54 – 9.74, 20.49 – 28.82 and 26.53 – 29.84 mg g^{-1}, respectively.

UV-Vis technique was used as a confirmation technique for the HPLC and both techniques were used in parallel. The results obtained for both techniques were in agreement with each other.

Keywords : Phytic acid, ion(III)-tiocyanide, nuts, tea leaves, HPLC, UV-Vis

GİRİŞ

Fitik asit, her bir karbona bağlı altı fosfat grupları ile basit bir halka formunda olan inositolün fosforik asitlerle oluşturduğu esterlerdir[1,2]. Molekül ağırlığı 660 olup sistematik adı myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hegzakisfosfat (dihidrojen fosfat)'tır [3,4]. Miyo-inositolhekzafosfattan bahsederken; fitik asit terimi serbest asit için, fitat terimi serbest tuz için ve fitin terimi Ca/Mg tuzu için yaygın olarak tercih edilmektedir [5].

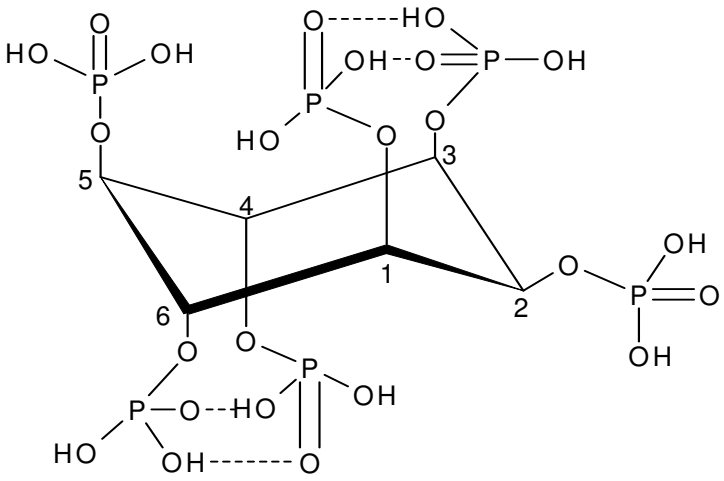
Tohum ve tahıl tanelerinin kök ve yumrularında bulunan, bitkide temel depo fosfor bileşeni olan ve toplam fosforun %70'inden fazlasını teşkil eden fitik asit (myo-inositol1,2,3,4,5,6–hexakisdihydrogenphosphate, IP6), ilk olarak 1800'lü yılların ortalarında keşfedilmiştir [6]. Hartig adlı araştırmacı 1855-1856 yıllarında yaptığı çalışmalar sonucunda bitki tohumlarından nişasta yapısında olmayan, tohumun çimlenmesi ve bitkinin büyümesi sırasında önemli rol oynayan küçük taneleri ekstrakte etmiştir. 1872 yılında Pfeffer bu partikülleri globoidler olarak adlandırmış ve bunların temel bileşeni olan fitikasidi ilk kez saf olarak izole etmiştir [7].

Suzuki ve ark. tarafından 1906 yılında fitikasitin bugünkü yapısının temelini oluşturan ilk model geliştirilmiştir. Aynı araştırmacılar, fitikasiti, inositolünhekzafosfat esteri olarak tanımlamışlardır. Diğer yandan 1908 yılında Starkenstein fosforun, fitikasitin yapısında pirofosfat formunda bulunduğu görüsünü savunmuştur. Tüm bu bulgular fitik asit için önerilen iki farklı yapıya zemin oluşturmuştur. Bunlardan bir tanesi 1914 yılında Anderson tarafından ileri sürülen hekzaortofosfat yapısı, diğeri ise 1908 yılında Neuberg tarafından tanımlanan pirofosfat ester modelidir [7]. İki yapı arasındaki temel fark, fosfat gruplarının izomerik konformasyonu ile yapıda kuvvetli bağlarla bağlanmış su moleküllerinin bulunup bulunmamasından kaynaklanmaktadır [8].

Johnson ve Tate adlı araştırmacılar 1969 yılında yaptıkları çalışmaları sonucunda çoğunlukla tahıl tanelerinde bulunan fitikasitin 1914 yılında Anderson tarafından önerilen simetrik yapıdaki myo-inositolhekzaortofosfat modeline uygun olduğunu göstermişlerdir [7]. Anderson yapısında, basit bir şeker olan myo-inositole altı adet fosforik asit molekülü bağlı bulunmaktadır (Şekil 1.1.). Bunlardan beş tanesinin dikey birinin ise yatay düzlemde bulunmasından dolayı bu yapı (5a-1e) konformasyonu olarak da adlandırılmaktadır [8].

Biyolojik düzenleyici rolleri ve besleyici özelliklerinin ötesinde insan sağlığına olumlu katkıları bulunan fonksiyonel bileşenlerden en önemlilerini antioksidanlar oluşturmaktadır. Antioksidan bileşenlerin en önemli kaynakları bitkisel gıdalar olduğu için diyetle alınan

antioksidanlar genellikle fitokimyasal antioksidanlar olarak da adlandırılmaktadır [9]. Fitik asit bir fitokimyasal olduğundan doğal bir antioksidan'dır [5].



Şekil 1.1. Anderson tarafından önerilen fitik asit modeli [8].

Fitik asit, özellikle demir ile oluşturduğu kompleks formu sayesinde demir katalizlioksidatif reaksiyonları, •OH radikalinin oluşumunu, bunu takiben meydana gelen lipidperoksidasyonunu ve DNA'nın zarar görmesini engeller [10-15]; kolon kanseri ve diğer iltihaplı bağırsak hastalıklarının oluşum riskini azaltır[16,17]. Bunun yanı sıra fitatlar vücuttaki fazla miktardaki kalsiyum ile kompleks oluşturarak kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunu engelleyerek, böbrekte ve idrar yolunda taş oluşum riskini azaltır [18-21]. Fitik asidin kansere ve böbrek taşı oluşumuna karşı koruyucu olması dışında, kolesterolü düzenleyerek kalp hastalıklarında, ∝-amilazın sindirimini engelleyerek kan glikoz düzeyinin azalmasında ve böylece diyabet hastalarının klinik tedavisinde de etkili olabileceği düşünülmektedir [11,18].

Kuruyemiş ve çay ürünleri toplumumuzun günlük beslenmesinde çok büyük bir yeri olan besin grubudur. Bu nedenle kuruyemiş ve çay ürünleri toplumumuz açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu çalışma ile öncelikli olarak çeşitli çay ve kuruyemiş ürünlerindeki fitik asidin miktarlarının spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle saptanması amaçlanmıştır. Birçok gıda ürününde bulunan fitik asidin analiz edilmesi amacıyla daha önceden Tokul ve Dost tarafından geliştirilen bir HPLC yöntemi kullanılmıştır [22]. Bu çerçevede gıda ürünlerinde mevcut olan fitik asidin analizleri ile geliştirilen bu metodun uygulanabilirliği gerçekleştirilmiştir.

Bunun dışında, tüketilen çeşitli kuruyemiş ve çay ürünlerinin fitik asit içerikleri arasındaki farklar ile kuruyemiş ürünlerinin kavrulması ve çay ürünlerinin demlenmesiyle fitik asit miktarındaki değişmeler de gösterilmeye çalışılmıştır.

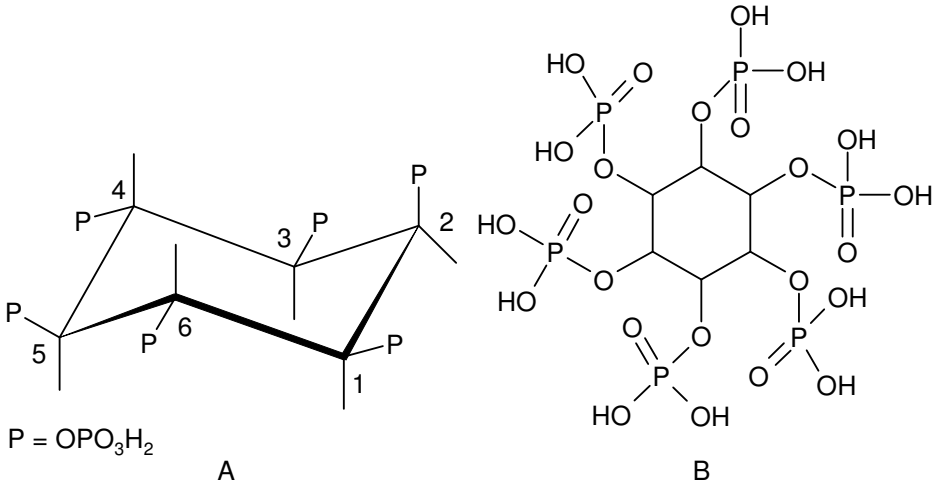
1. FİTİK ASİT

1.1. Fitik Asitin Meydana Gelişi

Fitik asit tahıllarda fosfat ve inositolün temel depo formu olup tanenin olgunlaşması sırasında oluşan bir bileşiktir. Fitik asit(myo-inositolhegzakisdihidrojen fosfat) bir organik fosfattır, kısacası fitik asit için siklik şeker alkolünün fosforlanmış hali de denebilir [23]. İnositol ise; bir trioz şeker olan gliseraldehitin alkole indirgenmesi ile meydana gelen gliserolün tamamen hidroksile hale gelmesi ile oluşan sikloheksan türevi bir bileşiktir. İnositolün kalsiyum ve magnezyum tuzları olan fitin büyük bitkilerin hücreler arası sıvısında destek materyali olarak bulunmaktadır.

1.2. Fitik Asitin Yapısı

Fitik asit, myo-inositol1,2,3,4,5,6-hekzakis dihidrojen fosfat; her karbona 6 fosfat grubunun bağlandığı basit halkalı bir hidrokarbondur [24-26]. Fitik asit molekülü; 6 tanesi kuvvetli (pKa<3,5) ve 6 tanesi zayıf (pKa>4,6-10)olarak ayrışan 12 yer değiştirebilir protona sahiptir [24,27]. Şekil 1.2. fitikasitin kimyasal yapısını göstermektedir.

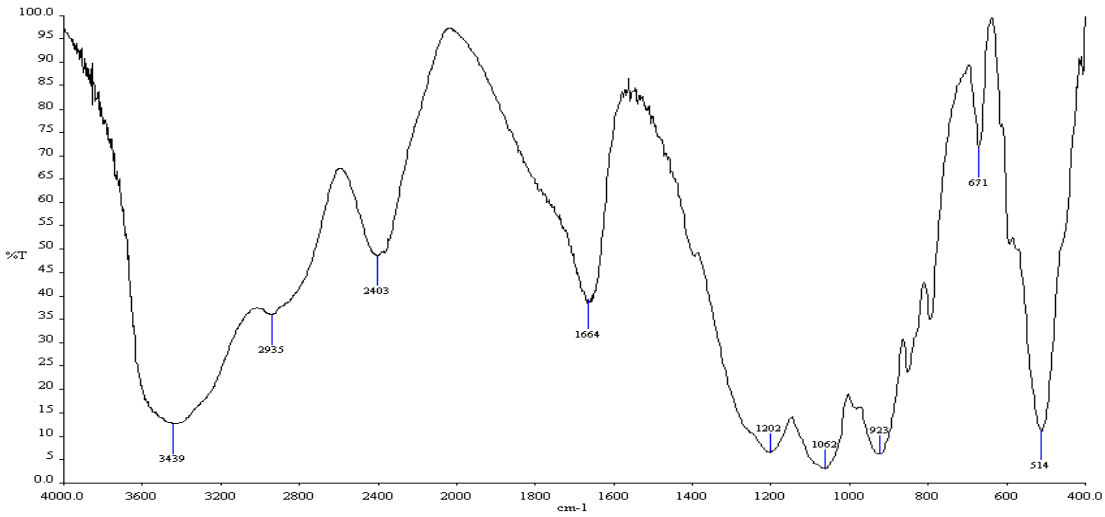


Şekil 1.2. a.Fitikasitin sandalye konformasyonu, b. Fitikasitin açık yapısı [28].

pH 0.5-9.0 aralığında ikinci pozisyonda bulunan karbona bir fosfat grubu eksenel pozisyondan, diğer beş fosfat grubu da ekvatoryal pozisyondan bağlanarak yapıyı sterik olarak kararlı hale getirmektedir [27-29].

1.3. Fitik Asidin IR Spektrumu

Fitikasitin FTIR spektrumu incelendiğinde;3439 cm^{-1} moleküler arası OH gerilimine, 2935 cm^{-1}siklik halka C-H gerilme titreşimine, 2403 cm^{-1} deki pikin P-O-H (fosforik asit O–H) gerilme titreşimine, 1664 cm^{-1} siklik halka C-C gerilme titreşimine, 1202 cm^{-1} P=O gerilme titreşimine, 1063 cm^{-1} P-O-C gerilme titreşimine, 923 cm^{-1} P-OH gerilme titreşimine, 671 cm^{-1} C-H düzlem dışı eğilim titreşimine ve 514 cm^{-1} pikin de düzlem dışı O-P-O gerilim titreşimlerine ait olduğu görülmektedir. Bu pikler Fitik asitin karakteristik pikleridir (Şekil 1.3.).



Şekil 1.3. Fitik asidin FT-IR spektrumu.

1.4. Fitik Asidin Kaynakları

Fitik asit tahıl ürünlerinin tohumlarının ve çekirdeklerinin olgunlaşması sırasında oluşan doğal bir bileşiktir [30]. Günlük diyette tüketilen gıdalarda yaygın olarak bulunan fitik asitin özellikle sert kabuklu yemişler, baklagiller ve tahıllardaki miktarı oldukça yüksektir [4,27,31]. Olgunlaşma periyodu boyunca tanede nişasta, yağ gibi diğer depo maddeleriyle birlikte hızla birikir [32]. Tahıllardaki fitik asit oranı tanenin morfolojik açıdan farklı kısımlarında homojen bir dağılım göstermemekte [8,33]; tanenin alöron kısmında fazla miktarda bulunurken, tanenin rüşeym kısmında daha az miktarlarda bulunmaktadır [34].

Fitik asit bitkisel tohumlarda ve tanede, kök ve yumruda, kuş ve kaplumbağaların eritrositlerinde ve organik topraklarda, polen ve sporlarda da bulunmaktadır [35]. Fitik asit en yüksek oranda; hububat, baklagiller ve sert kabuklu yemişlerde, orta düzeyde; enginar, incir, patates ve çilekte, iz miktarda; elma, brokoli, havuç ve yeşil fasulyede bulunur [33,36]. Muz,

kereviz, turunçgiller (elma, kayısı, muz, armut, şeftali, ananas, ıspanak, soğan, marul, mantar ve erikte), mantar ve kuru erikte fitik asit bulunmaz [4,33]. Tablo 1.1 de bazı besin maddelerinin fitik asit içerikleri görülmektedir. Bitkisel besinlerin fitik asit içeriğini etkileyen pek çok faktör bulunmakla birlikte; iklim koşulları, toprak yapısı, yıl, çeşit, sulama ve lokasyon bunların başlıcalarıdır [34].

Tablo 1.1. Bazı besin maddelerininfitik asit içerikleri (mg g^{-1}) [5,8,28]

Ürün	**Fitik Asit Miktarı (mg g^{-1})**	**Ürün**	**Fitik Asit Miktarı (mg g^{-1})**
Sert kırmızı buğday kepeği	66.80	Beyaz ekmek	0.30
Yumuşak beyaz buğday kepeği	50.30	Badem	10.00
Tam buğday unu ekmeği	5.60	Ceviz	16.00
Buğday ekmeği	0.60- 2.30	Yer fıstığı	17.00
Kraker	3.70- 5.80	Soya Fasulyesi	1.00- 1.47
Bisküvi	1.10- 10.50	Fasulye	0.74- 2.10
Buğday glüteni	21.30	Bezelye	1.20
Tritikale kepeği	3.10-9.80	Bakla	1.80
Mısır ekmeği	1.36	Börülce	0.44
Çavdar ekmeği	4.10	Nohut	0.28

1.5. Fitik Asidin Bitki Üzerindeki Etki Şekli

Bitkilerdeki fitik asitin (fitatların) 5 önemli fizyolojik role sahip oldukları bilinir [10,11,23,24,32]. Bunlar;

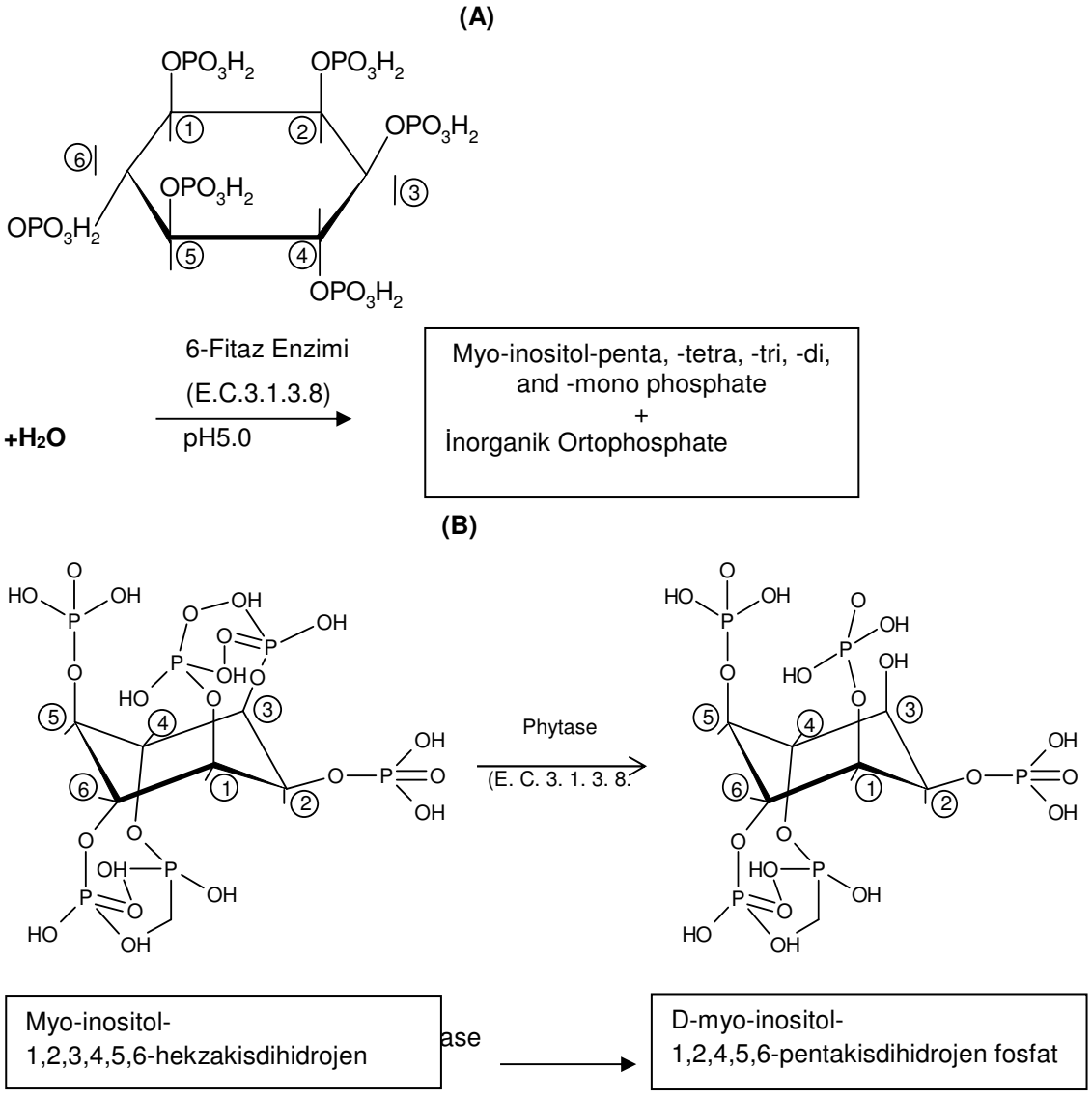
1. Yedek fosfor deposu,
2. Enerji deposu,
3. Filizlerin olgunlaşması için biyosentez esnasında ATP ye karşı yarışır, metabolizma inhibitörü,
4. Hücre işlemlerinin kontrolü için gerekli olan 2 değerlikli katyon kaynağı.
5. Tohumdaki inorganik fosfat düzenleyicisidir.

Bununla beraber fitik asit oksijen ve demirin zararlı etkilerine karşı tohumu koruma gibi hayati bir öneme de sahiptir.

1.6. Fitik Asidi Parçalayan Enzim: Fitaz Enzimi

Fitaz [myo-inositolhegzafosfathidrolaz] fosfataz enzimleridir [23]. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalarda geniş bir dağılıma sahip olan bu enzimler, fitik asitin inositol ve

ortofosfatlara (IP5'den IP1'e) hidrolizini katalize ederek daha düşük yapıdaki fosforik esterlerinin ortaya çıkmasına yol açar [37]. Bu reaksiyon serbest miyositolün açığa çıkmasını sağlar. Fitaz enzimi, tritikale, buğday, mısır, arpa, pirinç; bazı baklagiller ve hayvansal kaynaklardan izole edilip karakterize edilmiştir. Kimi mantar ve bakterilerde de fitaz varlığı görülmüştür [32]. Şekil1.4'de fitaz enzimi ile fitik asitin hidrolizi görülmektedir [23].



Şekil 1.4. (A) Fitik asidin mikrobiyal kaynaklı fitaz enzimi ile hidrolizi (3-fitaz) [23]
(B) Fitik asidin bitkisel kaynaklı fitaz enzimi ile hidrolizi (6-fitaz).

Araştırmalar sonucunda kesin olarak iki tür fitaz eziminin var olduğu belirlenmiştir [23,24]. Bunlar sırasıyla 3-fitaz ve 6-fitazdır. Bu enzimler, fitik asitin defosforilasyonunu, inositol zincirinde farklı pozisyonlardan başlatmasıyla birbirlerinden ayrılmaktadırlar ve sonuç olarak

daha az fosforlanmış olan inositollerin farklı izomerlerini oluştururlar. 3-fitaz enzimi üçüncü pozisyonda fitik asitin defosforilasyonunu başlatarak 1,2,4,5,6-pentakis fosfat ve inorganik fosfat ürünlerini oluşturur. 6-fitaz enzimi ise, altıncı pozisyonda fitik asitin defosforilasyonunu başlatarak 1,2,3,4,5-pentakis fosfat ve inorganik fosfat ürünlerini oluştururlar. Bunun yanı sıra aralarındaki diğer bir farklılık ise; 3-fitaz enziminin genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilmesi, 6-fitaz enziminin ise genellikle bitkilerden elde edilmesidir. Bu duruma bazı istisnalar da söz konusudur. Örneğin; 3-fitaz aktivitesine sahip bir enzim soya fasulyesi tohumlarında, 6-fitaz aktivitesine sahip bir enzim ise, Escherichia Coli adı verilen bir mikroorganizmada görülmüştür. 6-fitaz enzimi fitik asiti tam olarak defosforile edebilirken (yani myo-inositol monofosfat ve inositollere kadar defosforile edebilir), 3-fitaz enzimi tam olarak defosforile edemez [23].

Fitazlar esas olarak tahılların alöron tabakasında bulunur ve aktiviteleri pH'a bağlı olarak değişir. Mikrobiyal fitazların aktiviteleri pH 2-6 arasında en yüksekken, bitki kaynaklı fitazların aktiviteleri için optimum pH 5 tir. Bunun yanı sıra fitaz aktiviteleri için optimum sıcaklık fitaz kaynağına göre değişmekle beraber 45-60 °C aralığındadır [32].

Fitaz aktivitesi, genellikle 37°C ve pH5.5 de 5.1 mmol sodyum fitattan 1 dakikada 1 µmol inorganik fosforu açığa çıkaran enzim miktarı, bir ünite fitaz aktivitesi olarak tanımlanır [38]. Yaygın olarak üç çeşit fitaz aktivite birimi kullanılmaktadır. Bunlar; FTU, PU ve U'dur [4].

1.7. Fitik Asidin İnsan Sağlığı Açısından Önemi

Kendisi besin olmayan, ancak besin gibi yararları ve işlevleri olan ve fonksiyonel, sağlıklı, tıbbi, düzenleyici, özel beslenme amaçlı veya farmakolojik besinler olarak adlandırılan yiyeceklerin yapısında yer alan, bitkisel kaynaklı biyolojik aktif bileşiklere "fitokimyasallar" denilmektedir.

Sebze ve meyveler; vitaminler, mineraller ve fitokimyasal bakımından zengindir. Tam tahıl ürünleri ve diğer bitkisel besinlerde de bulunan ve biyoaktif besin bileşeni olarak kabul edilen fitokimyasallar; kanser, diyabet, osteoporoz, vasküler ve metabolik sendrom gibi hastalıkların oluşum riskinin azalmasında potansiyel bir etki gösterirler. Bu sebeple bir fitokimyasal olan, fitik asit üzerine birçok araştırma yapılmıştır [5].

Yapılan son çalışmalarda diyetle alınan fitikasitin faydalı etkilerine ilişkin veriler elde edilmiştir [39]. Fare ve sıçanlarda yapılan araştırmalarda fitik asitin, kan lipitlerini düşürdüğü, kan glikoz cevabını ve kanser riskini azalttığı gibi sağlık üzerine olumlu etkileri tespit edilmiştir.

Ayrıca diş çürüklerinin önlenmesinde, trombosit agregasyonunda, hiperkalsiüri tedavisinde, böbrek taşı olan kişilerin beslenmesinde ve akut kurşun zehirlenmesinde panzehir aktivitesine karşı yüksek fitatlı diyet önerilmektedir [40-42].

Fitik asit; bu olumlu etkilerine karşın her antioksidanın sahip olduğu bir takım olumsuz etkilere de sahiptir. Fitik asit; çinko, demir, kalsiyum, magnezyum ve bakır gibi minerallerle proteinleri direkt ya da indirekt olarak bağlayıp bunların çözünürlük, fonksiyonellik ve sindirilebilirliklerini değiştirdiğinden anti-besinsel bir öğe olarak tanımlanmaktadır [33].

1.8. Fitik Asidin İnsan Sağlığına Olumlu Etkileri

1.8.1. Fitik Asidin Antioksidan Fonksiyonu

Biyolojik düzenleyici rolleri ve besleyici özelliklerinin ötesinde insan sağlığına olumlu katkıları bulunan fonksiyonel bileşenlerden en önemlilerini antioksidanlar oluşturmaktadır. Antioksidan bileşenlerin en önemli kaynakları bitkisel gıdalar olduğu için diyetle alınan antioksidanlar genellikle fitokimyasal antioksidanlar olarak da adlandırılmaktadır [9]. Fitik asit bir fitokimyasal [5] olduğundan doğal bir antioksidan'dır. Antioksidanlar zararlı moleküller olan serbest radikallerin vücuda verdikleri zararların engellenmesi açısından büyük bir öneme sahiptir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar fitik asitin antikanserojenik ve antimutajenik özellikleri olduğunu göstermektedir. Yapılan in vitro ve in vivo deneyler fitik asitin kanseri önleyici ve iyileştirici role sahip olduğuna dikkatleri çekmektedir [43]. Vejeteryan tipi beslenen populasyonlarda düşük kanser vakalarına rastlanması bir antikanserojen olarak düşünülen fitik asit üzerine yapılan son çalışmaları desteklemiştir [5,14].

Fitik asit inositoldan sentez edilmektedir. İnositol da fitik asitten daha düşük seviyede olmak üzere antikanserojenik özelliğe sahiptir. Fitatların farelerde meme ve kolon kanserinin önlenmesinde ve kemoterapisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Fitik asitin antikanserojen etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, farelere kanserojen azoksi metan şırınga edildikten 8 ay sonra, kontrol gruplarının % 43'ü bağırsak kanserine yakalanırken %2 fitat içeren su içirilen grubun sadece % 10'unda kanser gelişmiştir. Fitatlı su verilmesinin kesilmesinde dahi kalıntının faydalı etkisi görülmüştür. Ayrıca çalışmada fitatlı suyun nötral pH'a doğru ayarlanması oldukça iyileştirici etki göstermiştir [44].

Fitik asitin tümörü baskılanması hücrelerin doğal savunma mekanizmasını güçlendirmesiyle açıklanmaktadır. Ayrıca Fitik asitin insanlarda kanserli hücrelerin çoğalmasını azalttığı in vitro olarak birçok çalışmada gösterilmiştir [10,14,40].

Fitik asidin antioksidan fonksiyonu demir ile güçlü bir kompleks oluşturması sonucu gerçekleşir. Çözünür Fe(II) iyonlarının girdiği redoks reaksiyonlarıyla birçok serbest radikalin oluşumuna yol açarak kanseri teşvik ettiği bilinmektedir. Oysa fitik asit vücuttaki demiri, Fe(III) formunda tutarak onun olumsuzluklarını önlemektedir [10]. Fitik asit üzerinde bulunan 1,2,3 (ekvatoryal, aksiyal, ekvatoryal) fosfat grupları demir ile spesifik etkileşim sağlayacak eşsiz bir konformasyon oluştururlar [10,14]. Dolayısıyla fitik asit Fe(III) ile kompleks oluşturarak serbest radikallerin, aktif oksijen türlerinin ve bu reaksiyonları takip eden lipid peroksidasyonun, protein ve DNA hasarının oluşumunu engeller [10,11,13,14,15,30,45].

Fitik asidin demir ile oluşturduğu birkaç kompleks mevcuttur. Bu komplekslerden biri, $Fe(III)_1$-(fitat) şeklindedir [11,46]. Bu kompleks fitik asidin kısmen yüksek konsantrasyonlarında oluşur. Üç değerlikli demirin 6 koordinasyonunun geri kalanı ise su ile tamamlanır. Kompleks $[Fe(III)_1$-(fitat)-$(H_2O)_5]$ yapısına sahip olur. Bu kompleksteki su sayısı sodyum azid ile spektroskopik titrasyon yapılarak tayin edilebilir ve böylece komplekste kaç fitatın bulunduğu hesaplanır [11]. Ayrıca kompleksin oluşumu için ısı gereklidir. Evans ve ark. (1991) Fe ve Cr ile fitik asidin etkileşimlerini araştırmış ve kompleks oluşumlarının endotermik olarak gerçekleştiğini göstermiştir [46]. Fitik asidin oldukça düşük konsantrasyonlarında $Fe(III)_3$-(fitat) veya $Fe(III)_4$-(fitat) kompleksleri oluşabilir [46-47].

Aşırı demir ile yüklenen insan ve hayvanlarda kolon ve diğer kanserlerin oluşum risklerinin arttığı ortaya çıkmıştır [48]. Bu oluşum demirin kolayca indirgenip yükseltgenmesi sonucu gerçekleşir. Serbest •OH radikalinin oluşumunu gösteren reaksiyonlar aşağıdaki gibidir[10,49].

$$O_2^- + Fe^{+3} \longrightarrow Fe^{+2} + O_2$$

$$2\,O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + OH^- + \bullet OH$$

Fitik asit askorbik asidin oluşturacağı serbest radikalleri azaltır. Oksijen Fe(II)'nin yükseltgenmesini ve askorbik asitte Fe(III)'ün indirgenmesini sağlayarak demirin redoks potansiyeli sürdürmesini sağlar ve sonuç olarak serbest radikaller oluşur. Fitik asit bu oluşumu engeller [14,30]. (AH_2 = askorbik asit).

$$Fe^{+3} + AH_2 \xrightarrow{IP6} Fe^{+2} + A + H_2O_2$$

$$4\,Fe^{+2} + O_2 + 4\,H^{+}IP6 \xrightarrow{O_2,\ e^-} 4\,Fe^{+3} + 2\,H_2O$$

1.8.2. Fitik Asidin Böbrek Hastalıkları ve Böbrek Taşı Oluşumundaki Etkisi

Böbrek taşları, çeşitli minerallerin ve başka maddelerin böbrekte toplanıp, katı parçacıklar halinde çökmesi sonucu oluşur. Normal koşullarda idrarda bulunan çeşitli kimyasallar bu çökmeyi engeller. Fakat bazı durumlarda bu koruyucu mekanizma etkisini yitirir. Eğer oluşan parçacıklar küçükse herhangi bir yakınmaya neden olmadan idrarla atılırlar [50].

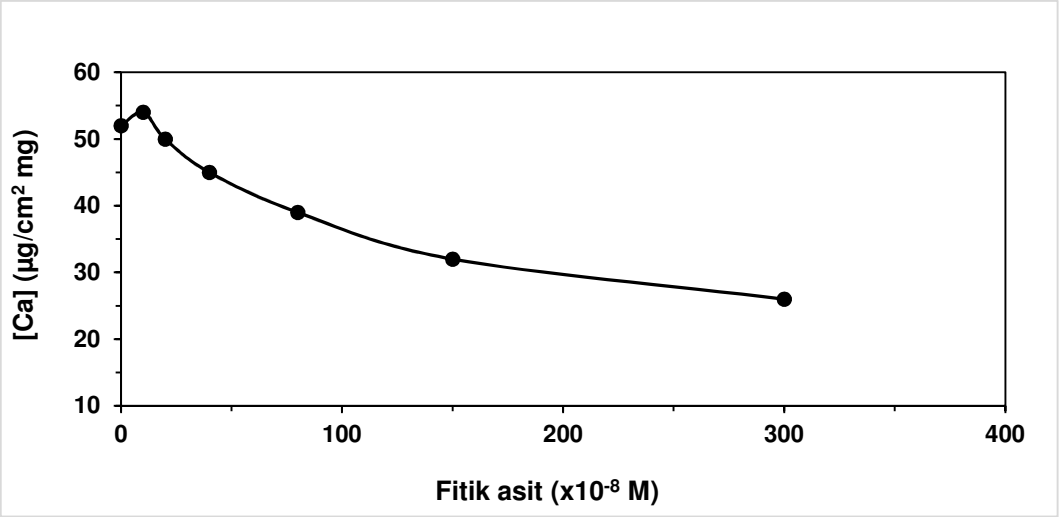
Tüm böbrek taşlarının yaklaşık %70-80'i kalsiyum oksalat monohidrat ($CaC_2O_4 .H_2O$), kalsiyum oksalat dihidrat ($CaC_2O_4 .2H_2O$), kalsiyum fosfat ($Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2$) ya da bunların bileşimlerinden oluşurken [51,52];%15-20 magnezyum amonyum fosfat ($MgNH_4. PO_4. 6H_2O$), %5-10 ürik asit,%5 kalsiyum fosfat, %2 oranında sistin taşları görülür. Böbrek taşlarının en yaygın olanı kalsiyum oksalat monohidrattır [52,53].

Fitik asit, kalsiyum taşı oluşumunda rol oynayabilen bir besin bileşeni olmasıyla araştırmaların konusu haline gelmiştir. Üriner sistem taşlarının %80'inden fazlası kalsiyum içerir. Gerçekte fitik asit kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat gibi kalsiyum tuzlarının kristalleşmesi üzerinde güçlü bir engelleyici etkiye sahiptir [54]. Fitik asidin kalsiyum oksalat kristalleşmesini azaltma yeteneği, kalsiyum oksalat kristalizasyonu inhibitör kapasitesinin kombinizasyonu ve koruyucu antioksidan etkisinden kaynaklanmaktadır. Besinlerle alınan fitik asit, idrar ve yumuşak dokularda kalsiyum tuzlarının kristalleşmesini ve böbrek taşlarının oluşumunu engeller [55,56].

Grases ve ark. (1998) fitatların böbrek taşı oluşumunda önemli bir rolü olduğunu, kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunuönleyerek idrar ve böbrekte taş oluşumunu engellediğini yayınlamıştır. Çalışmalarında, serbest radikallerin neden olduğu kalsiyum okzalat gelişmesine karşı fitik asit kullanıldığında okzalat kristallenmesinde önemli bir azalış olduğu ve dolayısıyla taş oluşum riskinin azaldığı görülmüştür [57].

Böbrek taşı oluşumunda fitatın etkisi araştırılan bir çalışmada; fitatla beslenen farelerin aksine, fitatla beslenmeyen farelerde böbrek kanallarında önemli derecede kalsiyum tortusu geliştiği gözlenmiştir. Bu bulgular fitatın kristalizasyon inhibitörü olarak görev yaptığını göstermektedir [55].

Yaşlanma sırasında kardiyovasküler kalsifikasyonda, diyetle alınan fitatın etkisini değerlendiren bir çalışmada; fitatla beslenen farelerin aortlarında kalsiyum ve çinko miktarının fitatla beslenmeyen farelerle kıyaslandığında önemli derecede daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Bu sonuç; fitatça zengin diyetle beslenildiğinde, yaşlanmaya bağlı olarak aortta meydana gelen kireçlenme ve çinko birikiminin önemli ölçüde azaldığını göstermektedir [54].

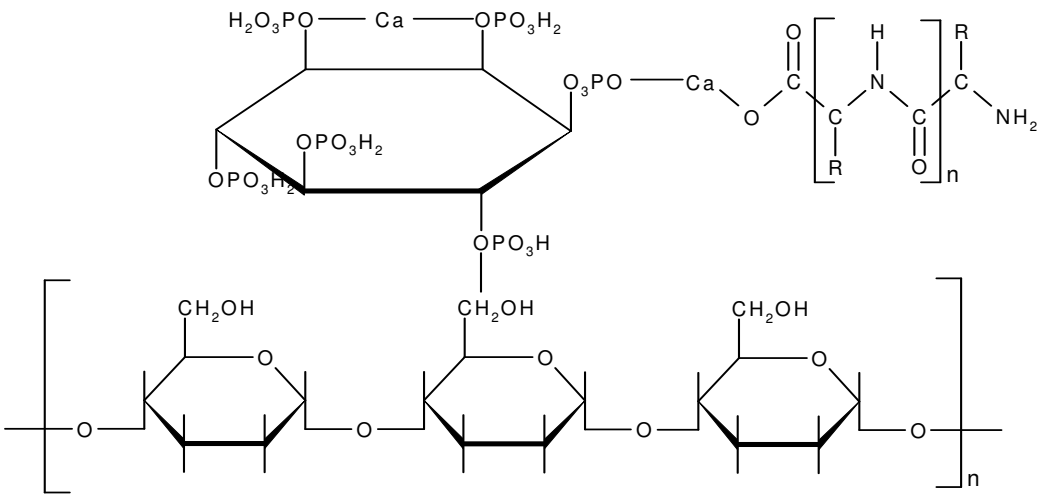


Şekil 1.5. pH=5.5 ta hiperkalsiürik yapay idrar kullanıldığında fitikasitin domuz mesane epitel hücrelerindeki kristal gelişimine etkisi [57].

1.8.3. Fitik Asitin İnsan sağlığı Açısından Diğer olumlu Etkileri

Bitkisel kaynaklı besinlerde fazla miktarda nişasta ve fitat bulunmaktadır. Fitik asidin nişastaya bağlanması H bağı oluşumu ile meydana gelir. Nişasta ve fitat kompleksi, nişastanın sindirim oranını azaltır. Çalışmalar düşük nişasta sindiriminin, düşük kan glukoz cevabına neden olduğunu göstermiştir (Şekil 1.6). Düşük kan glukoz cevabı da diyabetin tedavisinde faydalıdır [58-61]. Bu durumda diyabet hastalıklarının klinik tedavisinde fitik asidin kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Fitik asit hipokolesterolemik etkiye sahiptir; bu etkisinin antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. LDL kolestrolün oksidasyonunu önlemesi kalp-damar hastalıkları riskini azaltmaktadır [62]. Fitat antioksidan, antikarsinojenik ve hipokolesterolemik özelliğe sahip olması ve kan glukozunu azaltmasından dolayı kronik hastalıkların önlenmesinde yararlı olabilir.



Şekil 1.6. Fitik asidin nişasta ile etkileşimi [61].

1.9. FitikAsitin Mineraller ve Proteinler Üzerine Olumsuz Etkisi

1.9.1. Fitik Asidin Mineral Absorpsiyonunu Engellemesi

Temel minerallerin biyolojik yarayışlılıklarını azaltarak yetersiz beslenmeye yol açması nedeniyle, fitatlarca zengin gıdaların tüketimine yönelik ilgi ve araştırmalar her geçen gün yoğunlaşmaktadır [8]. Fitikasitin neden olduğu beslenme problemleri, fitatın sindirimi, biyoyarayışlılığı ve fitatın mineral metabolizması üzerine olan etkisi ile ilişkilidir. Fitik asit; çinko, demir, kalsiyum, magnezyum ve bakır gibi minerallerle proteinleri direkt ya da indirekt olarak bağlayıp bunların çözünürlük, fonksiyonellik ve sindirilebilirliklerini değiştirdiğinden anti-besinsel bir öğe olarak tanımlanmaktadır [33]. Fitik asidin minerallerin biyoyarayışlılığı üzerine etkisi birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; pH, gıdalardaki fitik asit konsantrasyonu ve dağılımı, gıdalardaki minerallerin yapısı ve kalitesi, fitik asidin minerallerle olan ilişkisini etkileyen diğer maddelerin varlığı (örneğin diyet lif, polisakkaritler, okzalatlar, polifenolik bileşikler vb.), fitatın fitazlar tarafından hidrolizi, öğündeki diğer gıdaların yapısı, bağırsaktaki absorbsiyon koşulları ve adaptasyon etkisidir [8,33,34].

Fitikasitin yapısında bulunan 6 fosfat grubu negatif yüklü olduğundan; grubun anyonik karakteri, pozitif yüklü mineral ve proteinlere karşı aktif durumdadır. Fitik asit özellikle Ca, Mg, Zn ve Fe gibi mineraller ile kuvvetli kompleks oluşturabilmektedir. Fitik asitin katyonlarla oluşturduğu fitatların çözünürlük karakteristikleri beslenme üzerindeki olumsuz etkilerinin temel nedeni olarak görülmektedir [8]. Bu bileşikler normal gastrointestinal pH (fizyolojik pH) da yani pH 4-8 arasında en az çözünürlüğe sahiptir [34].

Fitat-mineral komplekslerinin kararlılığı üzerine yapılan çalışmalarda, fitat-mineral komplekslerinin kararlılık sırası bazı araştırmacılar tarafından Cu^{+2}> Zn^{+2}> Ni^{+2}> Co^{+2}> Mn^{+2}> Ca^{+2} verilirken, bazıları Zn^{+2}> Cu^{+2}> Mn^{+2}>Co^{+2} [8], bazıları ise Cu^{+2}> Zn^{+2}> Cd^{+2}> Ni^{+2} = Co^{+2} [63] vermiştir. Ekholm P. Ve ark. (2003) yaptıkları çalışmalarda fitik asidin mineral elementlere bağlanma yeteneğinin çözeltinin pH'ına bağlı olarak değiştiğini belirterek pH = 7,4'te fitat-mineral kompleksinin kararlılık sırasının Cu^{+2}> Zn^{+2}> Co^{+2}> Mn^{+2}> Fe^{+2}> Ca^{+2} şeklinde olduğunu bildirmiştir [64]. Nötr pH da birleştikleri bu 2 ve 3 değerlikli katyonlarla (Zn^{+2}, Cu^{+2}, Co^{+2}, Mn^{+2}, Ca^{+2} ve Fe^{+2}) çözünmez nitelikte kompleks tuzlar meydana getirirler ve yine bu sıraya göre çözünmezliği giderek düşen bileşikler oluştururlar [39].

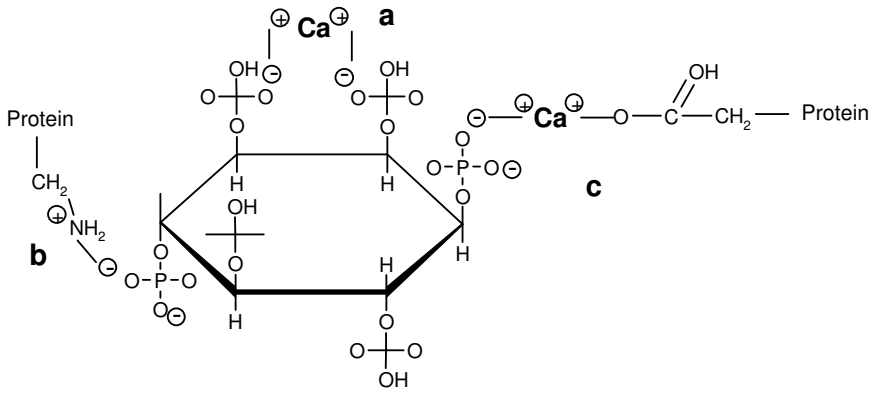
Metallerin fitik asitle bağlanmalarında iyon yarıçapları önemlidir. Çinko iyonlarının yarıçapları daha küçük olduğundan daha güçlü bir şekilde fitat anyonuyla bağlanmaktadır. Çinkonun fitik asitle yaptığı kompleksler diğerlerine göre daha kararlı ve çözünmeyen formda olduğundan, yüksek fitik asit konsantrasyonundan en fazla etkilenen mineral çinkodur [36]. Çinko fitik asit emilimi arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada da günde ortalama 1000 mg fitat alımıyla çinko ihtiyacının 2 katı arttığı sonucuna varılmıştır [65].

Kalsiyum eksikliği çocuklarda büyümeyi engellerken büyüklerde osteoporoz yapmaktadır [39]. Fitatlar ile kalsiyum da çözünmez bileşikler oluşturur ve bunun sonucu kalsiyumun da absorpsiyonunu azalır [66]. Oluşan Ca-fitat kompleksleri aynı zamanda Zn ve Fe gibi diğer metallerin absorpsiyonu da azaltır. Zn veya Fe, Ca-fitat kompleksine bağlanabilir ve böylece daha az çözünen kompleksler oluşur [10,30].

İnsan ve hayvan denekler üzerinde yürütülen çeşitli çalışmalar, gıdalara fitat ilavesinin ya da yüksek fitat içerikli besin tüketiminin demirin biyoyarayışlılığını azalttığını göstermektedir [67]. Hemoglobin, myoglobin ve birçok enzimin yapıtaşlarından biri olan demirin yetersizliğinin ileri durumları anemi gibi rahatsızlıklara neden olabilmektedir [32]. Fitik asit insanlarda demir emilimini önemli miktarda inhibe etmektedir. Bu nedenle gıdadaki fitik asit miktarı demir çözünürlülüğünün azalmasıyla yakından ilişkilidir [5]. Yapılan araştırmalarda mercimek, fasulye vb baklagiller, tahıllar ve yağlı tohumlar gibi fitatça zengin gıdalardaki demirin düşük biyoyarayışlılıkta olduğu saptanmıştır [34]. Demir dengesini karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada günlük demir alımının 21.5 mg olduğu diyete günde 0.3 g ve 1.9 g fitat eklendiğinde demir dengesinin düştüğü ve demir absorbsiyonu sırasıyla 2.5 mg ve 0.5 mg olduğu bulunmuştur [68].

1.9.2. Protein-Fitik Asit İlişkisi

Fitik asit protein ve amino asitlerin sindirimi üzerine negatif bir etkiye sahiptir ve sindirim sistemi koşullarında pepsin ve tripsin gibi proteolatik enzimlerin aktivitesini engeller [4]. Proteinler izoelektrik noktaları altındaki pH değerlerinde pozitif yüklü olduğundan; elektrostatik çekimle fitik asitin ana fosfat gruplarındaki bir hidrojen vasıtasıyla lisin, histidin ve arginin gibi amino asitlerin amino grupları ile kompleksler yapabilirler.[8, 33, 69].



Şekil 1.7. Fitik asidin proteinlerle ve minerallerle etkileşimleri [53], a) Ca ile etkileşimi b) Proteinlerle etkileşimi c) Fitik asit ve proteinler arasında Ca iyonunun metal köprüsü oluşturması

Proteinlerin katyonik grupları, fitat anyonları ile düşük pH' da doğrudan bağlanmakta ve bu noktada iki bileşiğin de çözünürlüğü çok düşük olmaktadır [70]. Katyonlar, nötral ya da yüksek pH' da pozitif yüklü protein grupları ile negatif yüklü fitatlar arasında köprü oluşumuna neden olmaktadırlar [7]. Bu sayede oluşan fitat-protein veya fitat-mineral- protein kompleksleri proteinin yarayışlılığını azaltabilmektedir [39].

Sonuçta oluşan fitat-protein ve fitat-mineral-protein kompleksleri proteinlerin sindirilebilirlik ve biyoyarayışlılıklarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir.

2. ÇAY VE KURUYEMİŞ ÜRÜNLERİ

2.1. Çay ve Çay Bitkisi

Dünyada en yaygın olarak tüketilen içeceklerden birisi olan ve ayrıca tıbbi özelliklerinin olduğu bilinen çay bitkisi [71], *Theaceae* familyasının *Camellia* cinsine (*Camelliasinensis*) [72,73] ait her mevsim yeşil olan, çok yıllık bir bitkidir.

Çay bitkisinden ticari kullanıma uygun, temel olarak 3 çeşit çay üretmektedir. Bunlardan yeşil çay fermantasyona uğramadan, oolong çayı yarı fermante edilerek ve siyah çay tam fermantasyonla elde edilmektedir [73-75].

2.1.1. Yeşil Çay

Yeşil çay, *Camellia sinensis* çay bitkisinin tepe tomurcuğu ve onu takip eden iki yaprak esasına göre hasat edilmiş taze sürgünlerinden üretilen [76] ve aynı bitkiden elde edilen siyah çaydan farklı olarak kurutulurken oksijenle tepkimeye girmesine izin verilmeyen bitkisel çaylardandır [77]. Yeşil çayın rengi oksidasyona uğramaması nedeniyle oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir [71].

2.1.2. Oolong Çay

Oolong çay, esas olarak Çin ve Tayvan'da yaygın olarak tüketilen bir çay çeşididir. Oolong çayın üretiminde kompleks bir yarı fermentasyon işlemi uygulanmakta olup, yoğun bir aromaya ve doğal çiçek kokusuna sahiptir [71].

2.1.3. Siyah Çay

Siyah çay, *Camellia sinensisL.* bitkisinin genç filizlerinin soldurma, kıvırma, fermentasyon (oksidasyon) ve kurutma işlemlerinden sonra elde edilen bir çay çeşidi olup demlenerek içilen sulu ekstraktı elde edilir [78]. Üretimi; soldurma, kıvırma, fermentasyon ve kurutma/derecelendirme olarak 4 farklı aşama sonucunda gerçekleştirilmektedir [71].

2.1.4. Çayın Genel Bileşimi

İşlem görmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi, yapılan işlem farklılıkları, çevresel etkiler, toplama standardı ve üretim yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik

göstermektedir. Ancak genel olarak taze çay yaprağının yaklaşık % 80'i sudur. Kuru ağırlıktaki bileşenlerin dağılımı Tablo 2.1'de verilmiştir. Çayın bileşenleri arasında en büyük öneme fenolik maddeler ve aralarında kafeinin de yer aldığı alkaloidler sahiptir. Ayrıca, çayda 26 çeşit amino asit bulunmaktadır [71].

Tablo2.1. İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi (kuru ağırlıkta %) [71]

Bileşik	**Miktar**	**Bileşik**	**Miktar**
Polifenol	23-39	Pigment	0,50-1,30
Kafein	3-4	Vitamin	0,60
Aminoasit	2-4	Mineral madde	1,00
Karbonhidrat	3-5	Selüloz	6-80
Organik asit	0,50-2	Lignin	4-60
Sponin	0,04-0,07	Polisakkarit	4-10
Uçucu bileşik	0,01-0,02	Lipid	2-4

Khanchive ark. (2007) ve Zuove ark. (2002) çeşitli yeşil ve siyah çay yapraklarında kafein miktarını sırasıyla 12.32-19.60 mg g^{-1} [79] ve7.44-29.60 mg g^{-1} [80] gibi geniş bir aralıkta saptamışlardır. Khokhar ve Magnusdottir (2002) ise yeşil kafein içeriğini çaylarda 11.50-19.50 mg g^{-1}, siyah çaylarda ise 22.10-28.00 mg g^{-1} olarak belirlemişlerdir [81]. Tablo 2.2 çay üretimi aşamalarında siyah çaydaki kafein miktarının değişimi verilmiştir. Çay ve çay ürünlerinin fitik asit içeriği ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Tablo 2.2. Üretim aşamalarında siyah çayın kafein içeriğindeki değişimi [71].

Üretim Aşaması	**Kafein (%)**
Taze yaprak	3,18
Soldurma	3,57
CTC kıvırma	3,75
Fermentasyon, 60 dk	3,65
Kurutma	3,58

2.1.5. Çay ve Sağlık İlişkisi

Çay lezzetli bir içecek olmasının yanı sıra, bilim çevreleri, son yıllarda çayın tedavi edici potansiyelini tekrar keşfetmiştir [82]. Yeşil çay yüzyıllar boyunca dünya çapında birçok ülkede çokça tüketilen içecek olmuştur. Kalp-damar hastalıkları ve bazı kanser türleri riskini azaltması, damar sertleşmesine ve gen mutasyonuna karşı koruma sağlaması nedeniyle sağlık için yararlı olduğu bildirilmiştir [83]. Ayrıca yeşil çayın diş çürümeleri önlediği, kolesterolü düşürdüğü, gastrointestinal sistemde lipitleri absorbe ederek, bireyleri kardiyovasküler hastalıklardan koruduğu belirtilmiştir [75].

Hem yeşil hem de siyah çayın tüketimiyle başta felç, kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, çeşitli kanser türleri olmak üzere, artirit, antiviral ve antiinflamatuar gibi hastalıklara karşı koruyucu ve kemik yoğunluğunu düzenleyici etkilerin gözlemlendiği yapılan araştırmalarca saptanmıştır. Brown ve ark.'nın (1993), yaptıkları olgu-kontrol çalışmasında, bilinen klasik kardiyovasküler risk faktörleri elimine edildikten sonra, her gün 1 fincandan daha çok içilen çayın, koroner kalp hastalıklarına karsı koruyucu etki sağladığını belirtmişlerdir [75].

2.1.5.1. Çay ve Kanser

Çay türlerinin kolon, mide, özefagus ve akciğer kanserleri başta olmak üzere birçok kanser türüne karşı koruyucu görev yaptığı bilinmektedir. In-vitro hücreler ve in-vivo hayvan modelleri kullanılarak yapılan deneysel çalışma sonuçları, hem yeşil hem de siyah çayın kolerektal kanser gelişmesine karşı koruyucu olduğu hipotezini desteklemektedir [78,83].

Yapılan bir çalışmada, 55-69 yaş arası postmenapozal kadınlar, 8 yıl boyunca günlük çay tüketimi ve kanser gelişimi açısından incelenmişlerdir. Melanon, meme, solunum sistemi, yumurtalık ve lenf gibi bazı kanserlerin çay içimi ile ilgisi olduğu, sindirim sistemi, genital, üriner sistem kanserleri ve lösemi gelişiminin çay içimi ile ters orantı gösterdiği saptanmıştır. Çalışma, günde iki bardak ya da daha fazla çay içen kadınlarda, hiç çay içmeyenlere göre sindirim sistemi kanserlerinin % 60, üriner sistem kanserlerinin % 32 oranında azaldığı göstermiştir [84].

Jian ve ark.'nın (2004) Güneydoğu Çin bölgesinde, 130 prostat kanserli hasta grubu ile 274 kişiden oluşan kontrol grubu üzerinde yaptıkları çalışmada, yeşil çay tüketiminin artısıyla prostat kanser riskinin azaldığını bulmuşlardır [85].

2.1.5.2. Çay ve Böbrek

Alessio ve ark.'nın (2002) sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda, yeşil çayın vücutta özellikle böbrekte koruyucu etkiler yaptığınıbulmuşlardır. Günde 2-3 fincan çay içiminin böbrek taşı oluşumunu %31 oranında engellediği gösterilmiştir [75,86].

Günlük 240 mL çay tüketen erkeklerde % 14, bayanlarda % 8 oranda böbrek taşı oluşum riski azaldığı yapılan araştırmalarca saptanmıştır. Kalsiyum okzalat taşının oluşum mekanizmasının tam olarak aydınlatılamamasıyla birlikte, yüksek sıvı tüketiminin (sıvının büyük bir kısmı çay olmak üzere) böbrek taşlarını önlemedeki en etkili ve ekonomik yöntem olduğu belirtilmektedir.

2.2. KURUYEMİŞ

Protein, karbonhidrat ve doymamış yağ oranı yüksek olan, mineral, vitamin, antioksidan ve fenolik maddelerce zengin kuruyemişler insan beslenmesinde önemli bir besin kaynağıdır. Ülkemizde tüketilen çerez gıdalar arasında kavrularak üretilen kuruyemiş türü çerezlerin önemli bir yeri olup, çoğunluğu geleneksel yollarla ve minimum işleme teknolojileri kullanılarak üretilmektedir. Yaygın olarak üretilen ve tüketilen kavrulmuş çerezler arasında kavrulmuş fındık, antepfıstığı, badem, yerfıstığı, ayçiçeği çekirdeği, kabak çekirdeği, sarı leblebi, beyaz leblebi, mısır, buğday ve kızartılmış (soslu) mısır yer almaktadır [9]. Tablo 2.3. çalışmada kullanılan bazı kuruyemiş türlerinin besin değerlerini göstermektedir [87].

Tablo 2.3. Bazı kuruyemiş türlerinin besin değerleri (100 g için).

	Fındık	**Fıstık**	**Ceviz**	**Badem**
Enerji (Kcal)	628	567	654	575
Karbonhidrat (g)	16,70	16,30	13,71	21,67
Protein (g)	14,95	25,80	15,23	21,22
Toplam yağ (g)	60,75	49,24	65,21	49,42
Diyetsel lif (g)	9,70	8,50	6,70	12,20
Vitamin B3 (mg)	1,80	12,066	1,125	3,385
Vitamin B5 (mg)	0,918	1,767	0,570	0,47
Vitamin B6 (mg)	0,563	0,348	0,537	0,143
Vitamin B2 (mg)	0,113	0,135	0,150	1,014
Vitamin B1 (mg)	0,643	0,640	0,341	0,211
Vitamin A (IU)	20	0	20	1
Vitamin C (mg)	6,30	0	1,30	0
Vitamin E (mg)	15	8,33	20,83	26
Sodyum(mg)	0	18	2	1
Potasyum(mg)	680	705	1,5	705
Kalsiyum(mg)	114	92	98	264
Bakır(mg)	1,725	1,144	1,5	0,996
Demir(mg)	4,70	4,58	2,9	3,72
Magnezyum(mg)	163	168	158	268
Mangan(mg)	6,17	1,934	3,4	2,285
Fosfor(mg)	290	76	346	484
Çinko (mg)	2,45	3,27	3,09	3,08
Selenyum (µg)	0	7,20	4,90	2,50

2.2.1. Kuru yemişlerin insan Sağlığı Açısından Önemi

Kuruyemişler; düzeyleri çeşitleri arasında farklılık gösteren, başta doymamış yağ asitleri olmak üzere protein, lif ve fitokimyasallar açısından zengin bir besin grubudur [88]. Bu nedenle kuruyemişler iyi bir fitokimyasal kaynağı olarak adlandırılır. Bazı destekleyici çalışmalar, sık fındık tüketimiyle koroner kalp hastalığı riskinin azalmasının birbiriyle ilişkili olduğunu bildirmiştir [89].

The Adventist Health Study' nin fındık tüketimi ile koroner kalp hastalığı arasındaki ilişkiyi 6 yıllık bir takip ile inceleyen çalışması, ilk epidemiyolojik çalışma olmuştur. Bu çalışmada, haftada 5 kez veya daha fazla fındık tüketilmesiyle önemli ölçüde ölümcül kroner kalp hastalığı ve ölümcül olmayan miyokardinfarktüs risklerinde düşüş gözlenmiştir [89]

Prineas ve ark (1993), haftada 2-4 kez fındık tüketen kadınlarda ölümcül kroner kalp hastalığı riskinin azaldığını belirtmişlerdir [90]. Haftada beş kez fındık tüketen 80.000 'den fazla kadının, % 35 oranında kalp hastalığı riskinin ve %27 oranında tip 2 diyabet riskinin düştüğü Harvard Nurses' Health Study'de raporlanmıştır [89].

Physicians' Health Study, 17 yıllık bir takibin ardından, ABD de haftada iki veya daha fazla kez fındık tüketen erkek hastalarda ani kardiyak ölümün, hiç veya nadiren fındık tüketen erkeklerle karşılaştırıldığında % 47 daha düşük risk ve toplam kroner kalp hastalığı ölüm oranının % 30 daha düşük olduğunu belirtmiştir [89].

Seventh-Day Adventists study, haftada, 1-4 kez fındık tüketenlerle hiç tüketmeyenler kıyaslandığında kolorektal kanser riskinde % 33 azalma olduğunu belirtmiştir. 10 Avrupa ülkesinde yapılan EPIC kohort çalışmasında, günlük 6,2 g'dan daha fazla fındık ve tohum tüketen kadınlarda % 31 oranında kolon kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir [91].

Ayrıca fındık, ceviz, fıstık yada badem bakımından zengin bir diyet, LDL kolesterolü düşürür ve HDL kolesterol toplam oranını azaltır [92].

3. ULTRAVİYOLE–GÖRÜNÜR BÖLGE (UV-VIS) MOLEKÜLER ABSORPSİYON SPEKTROSKOPİSİ

Elektromanyetik ışının atom, molekül ya da iyonlarla etkileşimi sonucu, bunların düşük enerjili düzeylerden daha yüksek enerji düzeylere veya tersi geçişler sırasında absorplanan veya yayılan ışınların ölçülmesi ve yorumlanması üzerine kurulmuş olan bilim dalına spektroskopi adı verilir. Elektromanyetik ışının 170-780 nm dalga boyu aralığındaki ışınların iyon veya moleküllerle etkileşimi esnasında absorplanan ışının ölçülmesi ve yorumlanması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına ise UV-Vis moleküler absorpsiyon spektroskopisi denir. Uygulanan spektroskopik yöntem ile söz konusu maddenin yapısını, fiziksel ve kimyasal özelliklerini inceleyerek kalitatif veya kantitatif analiz yapmak mümkündür [93].

3.1. IŞININ ABSORBBİYONU

Çeşitli dalga boylarında oluşan elektromanyetik ışın saydam ve şeffaf bir ortamdan geçirilirse, elektromanyetik ışının içinden bazı dalga boylarının seçici olarak kaybolduğu görülür ve bunun sonucu olarak ışın şiddetinde bir azalma meydana gelir. Bu olaya ışının absorbsiyonu denir.

Bir maddenin elektromanyetik ışını absorblaması iki basamakta meydana gelir. Birinci basamakta ışın enerjisi, maddenin iyon veya moleküllerine aktarılarak daha yüksek enerji seviyelerine çıkartılır. İkinci basamakta ise madde fazla enerjisini ısı veya ışıma şeklinde vererek tekrardan temel enerji seviyesine iner [94].

$$M + hv \longrightarrow M^*, \qquad M^* \longrightarrow M + \text{ısı}$$

Elektromanyetik ışının şeffaf çözelti ortamından geçerken şiddetindeki azalmanın nedeni ışın ile madde etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Şeffaf ortama I_o şiddeti ile gelen ışının büyük bir kısmı madde tarafından absorblanır (I_a), küçük bir kısmı ise çözelti tarafından dağıtılır (I_s), bir kısmıda cam veya kuvars hücrenin yüzeyinde yansır (I_y), geri kalan kısım ortamı I şiddeti ile terk eder. Gelen ışının şiddeti madde tarafından absorplanan ve diğer kayıpların şiddetinin toplamına eşit olmalıdır.

$$I_o = I + I_a + I_s + I_y$$

I_s ve I_y'den kaynaklanan kayıpları düzeltmek için, analit çözeltiden geçen ışının gücü yalnızca çözücü bulunan eşlenik bir hücreden geçirilir (referans) ve kıyaslanır. Dolayısı ile deneysel çalışmalarda;

$I_o = I + I_a$ olarak değerlendirilir.

Absorpsiyon olayında madde tarafından absorplanan ışının gücü direk olarak hesaplanamaz. Dolayısı ile absorplanan ışın gücü, gelen ve ortamı terk eden ışınların gücü ile ilişkilendirilmelidir. Çünkü I_o ve I deneysel olarak ölçülebilir. Ortam tarafından geçirilen ışının şiddetinin, gelen ışının şiddetinin oranına geçirgenlik denir (T).

$$T = \frac{I}{I_o}$$, geçirgenlik genellikle yüzde olarak verilir, $$\%T = \frac{I}{I_o} \text{ x } 100$$

Absorbans, geçirgenliğin eksi (- log) logaritmasıdır ve absorbans ile geçirgenlik arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir;

$$A = - \log T = -\log \frac{I}{I_o} = \log \frac{I_o}{I}$$

Normal olarak absorbans analitin derişimi ile doğrusal olarak değişir [93].

3.2. BEER YASASI

Beer Yasası, elektromanyetik ışının l cm (genellikle 1 cm) kalınlığındaki bir çözelti ortamından geçerken, geçen monokromatik ışın şiddetinin çözelti konsantrasyonuyla üstel olarak azaldığını ifade eder. Bu azalma, çözelti içerisindeki ışın ile etkileşen analit moleküllerinin birim hacimdeki sayısı ile yani konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değişmektedir

$$A = -\log T = \log \frac{I}{I_o} = \varepsilon l c$$

Burada c, çözelti içerisindeki analitkonsantrasyonunu (mol L^{-1}) ve ε ise ilgili maddenin molarabsorpsiyon katsayını (L mol^{-1} cm^{-1}) ifade eder.

Beer yasasında, konsantrasyon ile absorpsiyon arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalarla sık sık karşılaşılır. Bu sapmaların bazıları olayın doğasından ileri gelir ve Beer yasasının gerçek sınırlamalarını gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda (genel olarak>0,01 M) absorpsiyon yapan moleküller arasındaki uzaklık çok azalır ve moleküller, komşuların yük dağılımını etkiler. Bu etkileşim sonucu moleküllerin absorplama özelliği değişir. Etkileşim düzeyi derişime bağlı olduğu için bu olayın oluşumu derişim ve absorbans arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalara neden olur. Diğerleri absorpsiyon ölçümlerinin yapılış tarzı veya konsantrasyon değiştikçe oluşan kimyasal değişim sonucu oluşmaktadır. Son ikisi, bazen sıra ile aletsel veya kimyasal sapmalar olarak adlandırılırlar [93].

3.3. ULTRAVİYOLE-GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROFOTOMETRESİ

UV-Vis spektrofotometrelerde ölçümler için dar bir ışın bandı elde etmek amacıyla, bir optik ağ veya prizma tipi monokromatörler kullanılır. Spektrofotometrelerin ölçümlerde kullanılan ışının dalga boyunu sürekli şekilde değiştirme üstünlüğü vardır ve bu sayede bütün bir spektrum tayin etmeyi mümkün kılar. UV-Vis spektrofotometreler ışın geçtiği yola göre tek ışın yollu ve çift ışın yollu cihazlar olmak üzere iki şekilde dizayn edilirler.

Tek ışın yolu UV-Vis cihazında ışın tek bir yoldan gönderilir ve referans çözeltinin ve analit çözeltisinin ölçümleri arda arda gerçekleştirilir. Tek ışın yollu cihazların daha fazla enerji, daha iyi sinyal/gürültü oranı ve daha derli toplu numune bölmesi gibi doğasından gelen avantajları vardır. Fakat ışın kaynağında ve detektördeki sapma ve salımlar nedeniyle referans ve analit çözeltisi için ard arda detektör cevapları kaydederek absorbans veya geçirgenlik hesaplamaları çok başarılı değildir.

Çift ışın yolu UV-Vis cihazında ise ışın zamana karşı iki eşit parçaya ayrılarak iki koldan gönderilir. Bu ışınlardan biri referans çözeltiden geçerken diğeri analit çözeltisinden geçerek ölçümler aynı anda gerçekleştirilir. Çift ışın yollu UV-Vis cihazların çok kısa süreli değişimler hariç ışın şiddetindeki sapmaların, detektör ve yükselticideki salınımların sonuçlara etkisini önleme avantajları vardır. Ayrıca dalga boyu ile ışın şiddetindeki büyük değişimlerin etkisini de önler ve geçirgenlik veya absorbans spektrumlarının sürekli kayıt edilmesine de uygundur. Cihazın analiz performansı tek ışın yollu cihaza göre çok daha iyidir. Bu nedenle, modern UV-Vis spektrofotometrelerinin çoğu çift ışın yolludur.

3.3.1. Spektrofotometre cihazının kısımları

UV-Visbölge absorpsiyon spektroskopisi kısımları aşağıda verilmiştir.

1. Işın kaynağı,
2. Işınları dalga boyuna göre ayıran dalga boyu ayırıcı (monokromatör),
3. Çözelti ve çözücüyü koymaya yarayan şeffaf kaplar ve bu kapları hareket ettiren düzenek,
4. Işın enerjisini elektrik enerjisine dönüştüren dedektör,
5. Dedektörde dönüştürülen enerjinin şiddetini gösteren bir sinyal çıktı cihazı.

Moleküler aborpiyon ölçümleri için, oldukça geniş bir dalga boyu aralığında gücü ani olarak değişmeyen bir sürekli ışın kaynağı tercih edilir [93]. Döteryum ve hidrojen lambaları;160-380 nm dalga boyu aralığı (UV ve görünür bölgede) sürekli ışın kaynağı olarak kullanılır.

Tungusten telli lambalar; görünür bölge ışınlar için en yaygın kullanılan kaynaktır. Tungusten lambalar 320-2500 nm dalga boyu ararlığında kullanılabilmektedir. Tungusten-halojen lambaları, telin bulunduğu kuvars muhafaza içinde az miktarda iyot içerir, bu kuvartz lambanın 3500 °K sıcakta kullanımını ve bölgede hem ışın şiddetinin artışını, hem de kullanım aralığının UV bölgeye kadar genişlemesini sağlar. Ksenon ark lambaları; ksenon atmosferinden geçen elektrik akımı şiddetli ışın oluşturur. Spektrum 200-1000 nm arasında süreklidir ve 500 nm civarında en yüksek şiddete ulaşır [93,95]. Dalga boyu ayırıcısı olarak genellikle, prizmalı veya optik ağlı monokromatörler kullanılır. Optik ağlı monokromatörler ayırma performansları bakımından, prizmalımonokromatörlere karşı avantajları vardır. Numune kapıları olarak, çalışılan spektrum bölgesinde ışını geçiren maddelerden yapılır. UV-Vis bölgede kuvars ve erimiş silisten yapılan numune kapları kullanılır. Sadece Vis bölgede çalışılacaksa cam ve şeffaf plastikten yapılmış numune kapları da kullanılabilir. Detektör olarak genellikle fotovoltaik, fototüp, fotonçoğaltıcı ve silisyum diyotlu detektörler kullanılmaktadır.

3.4. ULTRAVİYOLE VE GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİNİN KALİTATİF UYGULAMALARI

Kalitatif ölçümlerde, veriler çeşitli şekillerde grafiğe geçirilebilir. Burada dikey eksen çoğu kez geçirgenlik, absorbans, log absorbans veya molarabsorptivitedir. Yatay eksen genellikle dalga sayısı veya dalga boyu olmakla birlikte zaman zaman frekans da kullanılabilir [95]. Elde edilen spektrumlar, standart maddelerin spektrumları ile karşılaştırılarak kalitatif analizler gerçekleştirilebilir.

3.5. ULTRAVİYOLE VE GÖRÜNÜR BÖLGE SPEKTROSKOPİSİNİN KANTİTATİF UYGULAMALARI

Kantitatif analizler için en yaygın ve elverişli olan yöntemlerden biri UV-Vis spektroskopisidir. UV-Vis spektroskopisinin kantitatif analizde tercih edilmesinin sebeplerinden bazıları;

1. Hem organik, hem de inorganik maddelere uygulanabilmesi,
2. 10^{-4}-10^{-5} M, bazen de 10^{-6}-10^{-7} M duyarlığa sahip olması,
3. Oldukça spesifik olması,
4. Doğruluk derecesinin yüksek olması (%1-3 gibi bağıl hatayla sonuçlanması),
5. İstenilen analiz bilgilerine kolaylıkla ulaşılabilmesi sayılabilir.

Bir spektrofotometrik analiz, ilk adım olarak çalışma şartlarının (çözücünün cins, sıcaklık, pH vs) oluşturulması ve konsantrasyon ile absorbans arasında bir kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasına dayanır. Normal olarak spektroskopik absorbans ölçümleri analitin maksimum absorpsiyon yaptığı bir dalga boyunda yapılır. Çünkü birim değişim başına absorbans değişimi bu noktada en fazladır, bu şekilde maksimum duyarlılık sağlanmış olur [96].

Analize uygun koşullar verildikten sonra, numuneden beklenen derişim aralığını içine alacak şekilde bir seri standart çözeltiden bir kalibrasyon eğrisi hazırlamak gerekir. İdeal olarak numunedeki çeşitli bileşenlerin ölçülen absorbans üzerindeki etkilerini en alt düzeye çekmek için sadece analit derişimi yönünden değil, aynı zamanda numune matriksinde yer alan diğer türlerin konsantrasyonları açısından da kalibrasyon standartları, analizlenecek numunenin bileşimine benzemelidir. Ancak bazı analizlerde, bileşimi numunelerle tam uyum içinde standartlar hazırlamak olanaksız ya da çok güçtür. Bu durumla karşılaşıldığında matriks etkilerini dengelemek için standart ilave yöntemini uygulamak çoğunlukla iyi sonuç verir [96].

Standart ilave etme metodu çeşitli şekillerde uygulanabilir. Bunlardan spektrofotometrik analizlerde en fazla seçilen yöntem, aynı miktardaki numune kısımlarına standart bir çözeltinin giderek artan miktarlarını ilave etmektir. Daha sonra her bir çözelti, absorbans ölçümünden önce sabit bir hacme seyreltilerek absorbansları ölçülür. Analizlenen numunenin miktarı cok ise, aynı numune çözeltisi üzerine art arda standart çözelti kısımları ilave etmek ve absorbans ölçümünü orijinal çözeltide ve her ilaveden sonra yapma yoluna gidilir. Bu tarz işlem çoğunlukla voltammetri için uygundur [95].

4. KROMATOGRAFİK METOTLARA GİRİŞ

Kromatografi; iki veya daha fazla maddenin, birbiri ile karışmayan iki faz arasında farklı oranlarda dağılma özelliğinden yararlanılarak ayrılması esasına dayanır. Daha açık bir tanım getirilirse, kromatografi; kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren bir seri ayırma tekniğidir [95].

Kromatografik ayırmalar, biri sabit öteki hareketli olan iki faz arasında gerçekleştirilir. Sabit faz bir kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemin üzerine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı, hareketli faz ise sıvı, gaz veya süperkritik bir akışkan olabilir. Hareketli faz bir kolon içinde, ya normal gravitasyon (yer çekimi) kuvvetiyle veya basınçla kolondaki sabit faz üzerinden geçirilir. Bu geçiş esnasında hareketli fazda çözünmüş halde bulunan maddelerle sabit faz arasında fiziksel ve kimyasal bazı çekim kuvvetleri meydana gelir. Bu çekim kuvvetleri her madde için ayrıdır. Bundan dolayı hareketli faz, sabit faz üzerinden geçerken, hareketli faz içerisinde bulunan maddelerin kolon içindeki hızları farklı olur. Sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en az olan kolon içinde hızlı yol alırken (kolonda en önce çıkarken), sabit fazla arasındaki çekim kuvveti en çok olan, yavaş yol alır [94].

4.1. KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Kromatografik yöntemler farklı kriterlere göre sınıflandırılabilir. Bunlardan birinde, hareketli ve sabit fazların fiziksel olarak nasıl temas ettikleri esas alınır. Bu esasa göre kromatografi kolon ve düzlemsel kromatografi olarak ikiye ayrılır. Kolon kromatografide, sabit faz ince bir kolona içerisine doldurulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz üzerinden geçmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Düzlemsel kromatografi yöntemleri de, TLC, PC ve elektroforez ile elektrokromatografiyi içermektedir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Düzlemsel kromatografinin sınıflandırılması [95].

Adı	Hareketli faz	Sabit faz	Sabit faz tutma yöntemi
İnce-tabaka	Sıvı	Sıvı-katı	Bir cam levhadaki ince toz halindeki katı üzerinde
Kağıt	Sıvı	Sıvı	Kalın bir kağıdın gözenekleri içinde
Elektroforez ve Elektrokromatografi	Sıvı	Sıvı-katı	Elektrik alanda molekül ağırlığı ve elektrik yüklerine göre bir katı üzerinde

Kromatografik yöntemlerin bir başka sınıflandırması ayırma mekanizmasına göre yapılabilir. Bunlar ise (1) adsorpsiyon, (2) dağılma, (3) iyon değiştirici, (4) jel kromatografisidir. Kromatografinin daha temel bir sınıflandırması kullanılan durgun ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır. Tablo 4.2 kromatografinin üç genel tipini göstermektedir: Sıvı kromatografisi, gaz kromatografisi ve süperkritik akışkanlı kromatografi. Bu isimlerde de geçtiği gibi, bu üç teknikte hareketli faz sıra ile sıvı, gaz ve süperkritik akışkandır. Sadece sıvı kromatografisi hem kolonlarla hem de düz yüzeyler üzerinde gerçekleştirilebilir. Gaz kromatografisi ve süperkritik sıvı kromatografisi yalnızca kolonlarda gerçekleştirilir [93].

Tablo 4.2. Kolon kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması [93].

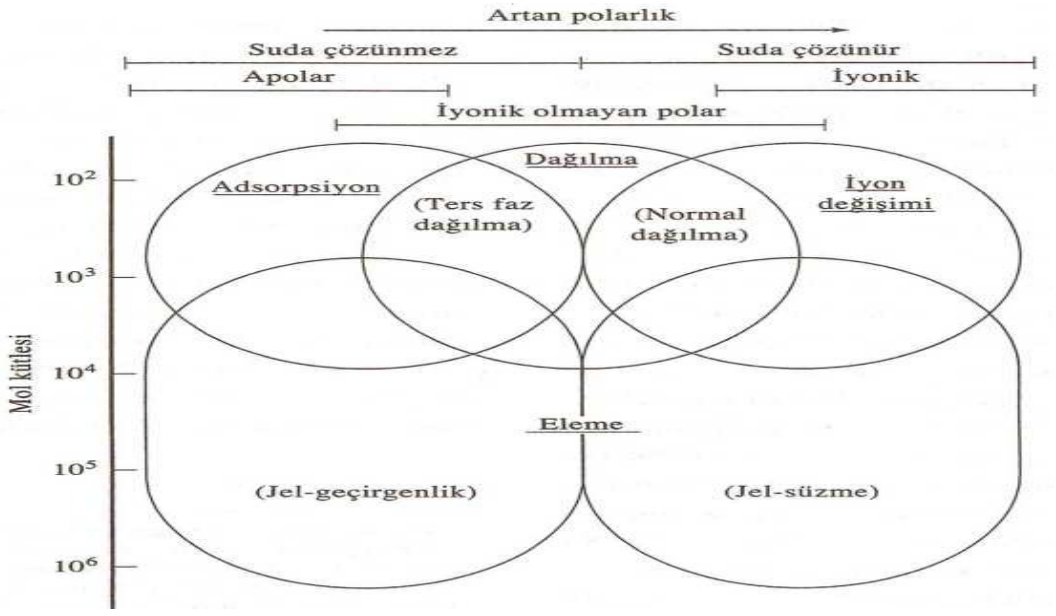
Genel Sınıf	**Özel Yöntem**	**Sabit faz**	**Denge Tipi**
Sıvı kromatografi (LC) (hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya Dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz kromatografi (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı faz	Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik-akışkanlı kromatografi (SFC) (hareketli faz : sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

4.2. YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ

4.2.1. HPLC'NINKAPSAMI

Yüksek performanslı sıvı kromatografi analitik teknikler arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.[93,95].

Şekil 4.1, sıvı kromatografi işlemlerinin, uygulama alanları bakımından birbirini tamamlama eğiliminde olduğunu göstermektedir. Örneğin, mol kütlesi 1000'den daha büyük maddeler için, her ne kadar şimdilerde bu gibi maddeleri ters-faz dağılma kromatografisi ile de incelemek mümkün ise de, eleme kromatografisi daha çok kullanılır. Daha küçük mol kütleli türler için, iyon değiştirme kromatografi yaygın şekilde kullanılır. Küçük, polar, ancak iyonik türler, en iyi dağılma yöntemleri ile incelenebilir. Ayrıca, bu işlem, homolog serilerin ayrılması için çoğu zaman kullanışlıdır. Adsorpsiyon kromatografi zaman, polar olmayan türlerin, yapısal izomerlerin ayrılması ve alifatik hidrokarbonlar gibi bileşik sınıflarının alifatik alkollerden ayrılması için seçilir [93,96].

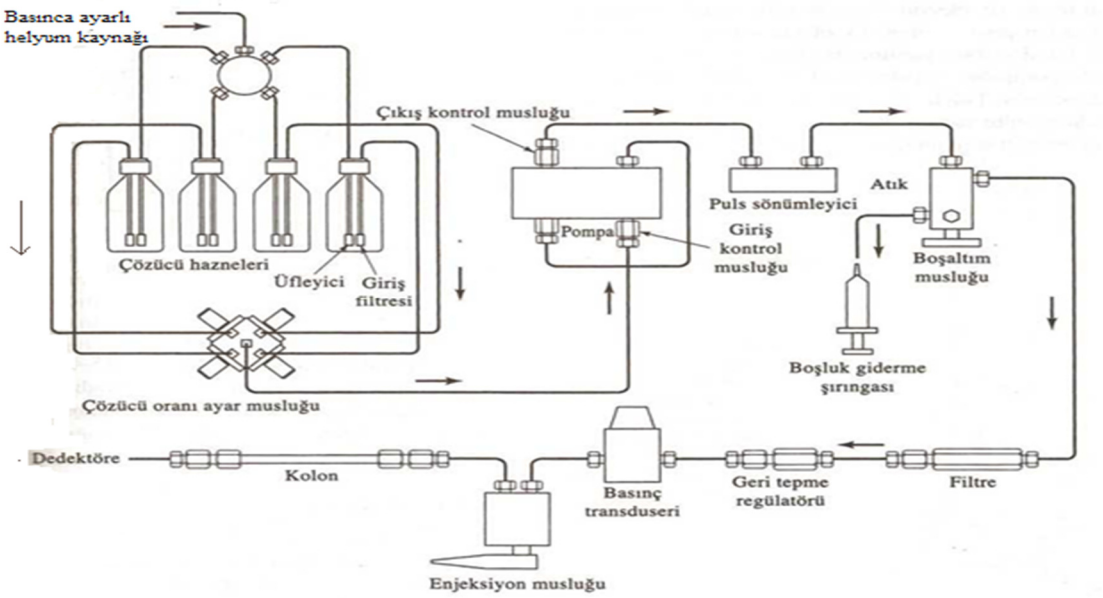


Şekil 4.1.Sıvı kromatografinin uygulamaları.

4.2.2. HPLC CİHAZI

Modern cihazlarda normal bir akış hızı elde etmek için, 3-10 µm' lik dolgu maddeleriyle doldurulmuş kolonlarda birkaç yüz atmosferlik basınç uygulamaları yapılır. Bu yüksek basınç uygulaması nedeniyle, yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazları, diğer kromatografi cihazlarına göre daha pahalı ve daha karmaşıktır [95]. Bir yüksek basınç kromatografi cihazı Şekil 4.2 de şematik olarak gösterilmiştir. Cihazın bölümleri şöyle sıralanabilir:

- Çözücü (hareketli faz) kapları (rezervuar),
- Yüksek basınç pompası, gradiyent yürütme sistemi,
- Basınç ve akış hızı kontrol sistemleri, kontrol vanaları, basınç göstergeleri, filtreler, basınç düzenleyici, sıvı karıştırıcı, hava boşaltma vanaları, vb.
- Enjeksiyon bölmesi, vana, otomatik örnek verici,
- Kolon sistemi, filtre, ön kolon, analitik kolon, iyon tutucu kolon, vb.
- Dedektör,
- Yazıcı, integratör veya bilgisayar [98].



Şekil 4.2. Bir HPLC cihazının şematik görünüşü (PerkinElmer).

4.2.2.1. Hareketli Faz Kapları ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir HPLC cihazı, bir veya daha fazla, her biri 200-1000 mL çözücü içeren camdan veya çelikten yapılmış hazne içermektedir. Bu hazneler çoğu zaman, kolonda ve

dedektör sisteminde gaz oluşturarak bant genişlemesi ve çoğu zaman detektörün performansında bozucu etkilere sebep olan çözünmüş gazların (genellikle oksijen ve azot) giderilmesi için bir cihazla donatılmıştır. Gaz giderme düzeneği, vakum pompası ve çözücüyü ısıtıp karıştıran bir sistem olacağı gibi, Sekil 4.2 'deki gibi düşük çözünürlükteki inert bir gazın geçirilmesiyle, çözünmüş gazları sürükleyen basit bir üfleyici de olabilir [93].

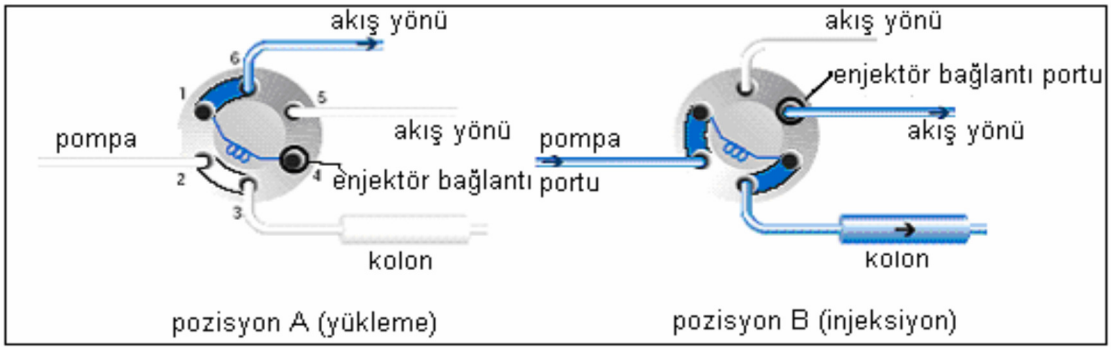
Sabit bileşimdeki tek bir çözücü kullanılarak yapılan bir ayırma izokratik elüsyon olarak adlandırılırken, polariteleri önemli derecede birbirinden farklı, iki veya üç çözücü sistemi kullanılan ayırma gradiyent elüsyon olarak adlandırılır. Gradiyent elüsyonda çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Burada elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre, bazen sürekli bazen de bir seri basamaklar halinde, çözücülerin oranı değiştirilir. [95].

4.2.2.2. Pompalama Sistemleri

Bir HPLC cihazında pompanın görevi hareketli fazın kolon boyunca akışını sağlamaktır. HPLC sisteminde kullanılan üç tip pompa vardır. Bunlar; pistonlu pompalar, şırınga veya sürgülü pompalar ve pnömatik veya sabit basınç pompalarıdır.

4.2.2.3. Numune Enjeksiyon Sistemleri

Sıvı kromatografide numune vermek için en yaygın kullanılan yöntem, Şekil 4.3 de görüldüğü gibi, numune giriş sarımlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Birçok sıvı kromatografi cihazının ayrılmaz bir parçası olan bu sarımlar, değiştirilebilir nitelikte olup 5 µl'den 500 µl'ye kadar değişen hacimlerde numune hacmi seçimine olanak tanımaktadır. Bu tipteki numune alma halkaları, numunenin 7000 psi basınca kadar, binde birkaç bağıl hata verecek kesinlikle numunenin kolona uygulanabilmesini sağlamaktadır. Hacmi 0,5–5 µl arasında olan loplar bulunan mikro numune enjeksiyon muslukları da mevcuttur [93,95].



Şekil 4.3. Sıvı kromatografide enjektör sisteminin çalışma prensibi [97].

4.2.3. Sıvı Kromatografi Kolonları

Sıvı kromatografi kolonları normal olarak düzgün iç çaplı paslanmaz çelik borulardan yapılır. Çeşitli üreticilerden, boyutları ve dolgu maddesi farklı, yüzlerce dolgulu kolon temin etmek mümkündür.

4.2.3.1. Analitik Kolonlar

Sıvı kromatografi kolonlarının büyük bir çoğunluğu 3-30 cm arasındadır. Normalde kolonlar düzdür ve gerektiği yerlerde iki veya daha fazla kolonun birbirine eklenmesiyle kolonun boyu arttırılabilir. Bazen sarmal kolonlar da kullanılır, ancak bu konfigürasyonda kolon etkinliğinde bir miktar kayıp söz konusudur. Sıvı kromatografi kolonlarının iç çapı çoğu zaman 1.3-10 mm; yaygın olarak kullanılan birçok kolon dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 2-10 µm arasındadır. Günümüzde belki de en çok kullanılan kolon, 250 mm uzunluğunda, 4,6 mm iç çapında ve 5 µm tanecik büyüklüğüne sahip dolgu maddesi doldurulmuş kolondur. Bu tip kolonlar 40000-60000 tabaka/metre içerirler [93,95].

4.2.3.2. Koruyucu kolonlar

Analitik kolonun ömrünü arttırmak amacıyla, analitik kolondan önce genellikle kısa bir kolon yerleştirilir. Bu kolonun görevi, sadece partikül halindeki maddeleri ve çözücü içindeki yabancı maddeleri tutmak değil, aynı zamanda numune içinde bulunan ve durgun faza tersinmez olarak bağlanan bileşenleri de tutmaktır [93].

4.2.3.3. Kolon Dolgu Maddelerinin Tipleri

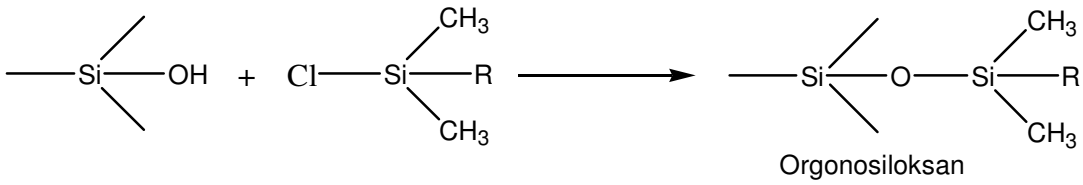
Sıvı kromatografide temel olarak iki tip kolon dolgu maddesi kullanılmaktadır. Bunlar, film dolgular ve gözenekli dolgulardır. Film dolgular; küresel, gözeneksiz, çapları 30-40 µm olan cam veya polimer tanelerinden oluşur. Bu tanelerin yüzeyine, silis, alumina, polistirendivinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden oluşan ince gözenekli bir film kaplanır. Bazı uygulamalar için, bu yüzeye, absorbsiyon ile yüzeye tutunan uygun bir sıvı, durgun faz olarak ilave bir katman halinde kaplanır.

Sıvı kromatografide kullanılan gözenekli dolgu maddeleri; çapları 3-10 µm arasında olan gözenekli partiküllerdir. Partiküller, silis, alumina, polistiren-divinil benzen sentetik reçinesi veya bir iyon değiştirici reçineden meydana gelmiştir. Silis, sıvı kromatografide en yaygın kullanılan bir dolgu maddesidir. Silis partikülleri, mikron altı silis partiküllerini oldukça uniform yarıçapta

daha büyük partiküller oluşturacak koşullarda bir araya toplanmasıyla hazırlanır. Elde edilen partiküller çoğu zaman, yüzeye kimyasal olarak veya fiziksel olarak bağlanan, ince bir organik film ile kaplanır.

4.2.3.4. Bağlı-Faz Dolgu Maddeleri

Bağlı faz dolgu maddelerinin çoğu bir organoklorosilanın, sıcak seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde hidrolizlenerek yüzeyine OH grubu bağlanmış silisyum dioksit ile reaksiyona sokulmasıyla hazırlanır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün bir organosiloksandır. Katı parçacık yüzeyinde bulunan böyle bir SiOH ile meydana gelen reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:



Şekil 4.4. Kolon dolgu maddesinin temel yapısı [97].

Burada R, genellikle düz zincirli oktil- veya oktildesil- grubudur. Silis yüzeylerine bağlanan diğer organik fonksiyonlu gruplar alifatik aminler, eterler, nitriller, aromatik hidrokarbonlar ve siyano gruplarıdır. Böylelikle çok farklı polaritede durgun faz elde etmek mümkündür.

Bağlı faz dolgu maddeleri, fiziksel olarak yüzeye tutturulmuş dolgulara göre daha kararlı olma gibi bir üstünlüğe sahiptir. Yüzeye fiziksel olarak tutturulmuş dolgular, zamanla hareketli fazda çözünerek sürüklendikleri için sık sık yeniden kaplanmaları gerekir. Ayrıca bu dolgularda, hareketli fazdaki çözünme problemi nedeniyle, gradiend elüsyon tekniği uygulamak pratik değildir. Bağlı faz dolgularının başlıca sakıncası, biraz sınırlı numune kapasitesine sahip olmalarıdır.

4.2.3.5. Normal-Faz ve Ters-Faz Dolgu Maddeleri:

Durgun faz ile hareketli fazın bağıl polaritelerine göre normal faz ve ters faz dağılma kromatografileri olmak üzere iki tip dağılma kromatografisinden söz edilir.

4.2.3.5.1. Normal-Faz Dağılma Kromatografisi

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz (dolgu malzemesi) polar (silika veya polimer yapı üzerine bağlanmış -Diol, glikol, -CN, -NO_2 veya -NH_2fonksiyonel gruplu dolgu maddeleri) yapıya sahip olup, hareketli faz apolar yada kolon dolgu malzemesinden düşük polariteye sahip (etileter, kloroform, hekzan vb.) çözücüler ve karışımlarını içermektedir.

Normal faz sıvı koromatografisinde düşük polariteye sahip maddeler kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip maddeler hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolon dolgu malzemesi ile etkileşimi düşük olduğunda kolonda kısa süreli tutularak kolondan ilk önce çıkar. Bu durumda, hareketli faz polaritesinin değiştirilmesi ile alıkonma zamanı üzerinde oynanabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için hareketli fazın polaritesi azaltılırken, alıkonma zamanını arttırmak için hareketli fazın polaritesi artırılabilir.

4.2.3.5.2. Ters-Faz Dağılma Kromatografisi:

Ters faz sıvı kromatografisinde, sabit faz (dolgu malzemesi) apolar (silika veya polimer yapı üzerine bağlanmış -C3, -C8, -C18, -C_6H_5, -NH_2 gruplu dolgu maddeleri) yapıya sahip olup, hareketli faz polar (metanol, etanol, asetonitril, tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları) çözücüler içerir.

Ters faz sıvı kromatografisinde yüksek polariteye sahip maddeler kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip maddelerhareketli fazda çok iyi çözünür ve kolon dolgu malzemesi ile etkileşimi düşük olduğunda kolonda kısa süreli tutularak kolondan ilk önce çıkar Bu durumda, hareketli faz polaritesinin değiştirilmesi ile alıkonma zamanı üzerinde oynanabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için hareketli fazın polaritesi azaltılırken, alıkonma zamanını arttırmak için hareketli fazın polaritesi artırılabilir.

4.2.4. Dedektörler

HPLC sisteminde en önemli bileşenlerden biri dedektördür. Kromatografik yöntemle ayrılan herhangi bir moleküle ilişkin anlamlı sonuç üretebilmek için nitel ve nicel yönden değerlendirilmesi gerekir. Bir dedektörün işlevi örneğin derişimiyle orantılı olacak şekilde elektrik sinyali üretmektir. İdeal bir dedektör, yaygın olarak kullanılan eluentler için (tampon, organik modifiyerler, vb) ya çok az ya da hiç sinyal üretmemelidir. Bu nedenle hareketli fazda ve

kromatografik sınırlar içinde seçimlilik ve duyarlılık açısından en iyi saptanabilen bölge seçilmelidir [99].

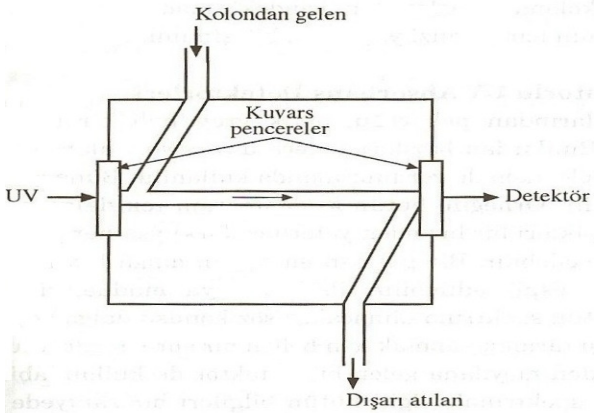
4.2.4.1. İdeal Bir Dedektörün Özellikleri

Sıvı kromatografi için ideal bir dedektör; yeterli duyarlık, iyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik, geniş bir doğrusal çalışma aralığı, akış hızından bağımsız küçük cevap zamanı, yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı, her türden analite benzer cevap alınmalı veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verme özelliği olmalı, numuneyi parçalamamalı, bant genişlemesini azaltmak amacıyla, minimum iç hacimde olmalıdır.

HPLC de kullanılan dedektörler;

- Ultraviyole/ Görünür Bölge (UV-Vis) dedektörleri,
- Kırılma indisi (RL) dedektörleri,
- Fluoresansdedektörleri,
- Elektrokimyasal dedektörler,
- Işık saçılmasına dayalı dedektörler olarak sınıflandırılabilir.

UV-VisDedektörler: Kolondan gelen hareketli faz birkaç mikrolitre hacimli bir hücreden geçirilir. Bu hücre üzerine görünür bölge veya ultraviyole ışını düşürülür. Meydana gelen absorpsiyon elektronik sinyal haline dönüştürülür. Bu elektronik sinyalin zamana karşı grafik halinde çizilmesi ile kromatogram elde edilir. 200-800 nm aralığında ışınların absorplanabilmesi için örnek kromofor gruplar içermelidir. Bu grupların bulunmaması halinde uygun bir reaktifle tepkimeye sokularak kromofor grup bağlanır. Kromofor grup bağlanma işlemine derivatizasyon adı verilir. Ultraviyole dedektörlerin en küçük tayin sınırı 10-80 µg mL^{-1} düzeyine inerken doğrusal çalışma bölgesi 10^5 dolaylarındadır.



Şekil 4.5. UV dedektör.

4.3. KROMATOGRAFİNİN UYGULAMALARI

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılan cihazdır. Kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

4.3.1. Kalitatif Analiz

Bir kromatogram, bir numunedeki her bir tür hakkında kalitatif bilgi sağlar. Bu bilgi söz konusu maddenin alıkonma süresi ya da belli bir elüsyon süresinden sonra sabit fazda bulunduğu yerdir. Gerçekte kromatografi ne oldukları bilinen sınırlı sayıdaki olası maddeleri içeren karışımların bileşenlerinin var olup olmadığını belirtmede sıklıkla kullanılan bir araçtır. [93,97].

Kromatogramlar bir maddenin varlığını kesin olarak göstermeseler bile, bunların yokluğunu kesin olarak gösterirler. Buna göre aranan bir madde aynı şartlarda standardın gösterdiği alıkonma zamanında pik vermiyorsa, bu madde numunede yok veya konsantrasyonu kromatografik tayin sınırının altında demektir [93,97].

4.3.2. Kantitatif Analiz

Kromatografide kantitatif analiz, analiz yapılan maddenin pik yüksekliğinin veya pik alanının bir veya birkaç standardın yükseklikleri veya pik alanlarıyla kıyaslanmasına dayanır. Şartlar iyi ayarlanabilirse, bu şekilde bulunan alanlar konsantrasyonla doğru orantılıdır [93,97].

4.3.2.1. Pik Yüksekliğine Dayalı Analizler

Bir kromatografi pikinin yüksekliği, pikin her iki tarafındaki taban çizgilerinin düz bir çizgi ile birleştirilmesi ve bu çizgiden pik tepesine dikey mesafesinin ölçülmesi ile elde edilir. Bu ölçüm genellikle yüksek kesinlikle yapılabilmektedir. Bununla birlikte pik yüksekliklerinin pik genişlikleriyle ters orantılı olduğuna dikkat etmek gerekir. Bu nedenle pik yüksekliklerini kullanarak doğru sonuçlar ancak kolon koşullarındaki değişikliklerin numunenin ve standartların kromatogramlarını elde etmek için gerekli olan sürede pik genişliklerini değiştirmediği durumda elde edilir. Bu değişkenler; kolon sıcaklığı, eluent akış hızı ve numune enjeksiyon hızıdır. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmemesine de dikkat edilmelidir. [93,97].

4.3.2.2. Pik Alanına Dayalı Analizler

Pik alanları, pik yüksekliğine dayalı analizlerde söz konusu olan değişkenlere bağlı olan bant genişlemesi etkilerinden bağımsızdır. Bu bakış açısına göre, alanlar pik yüksekliklerine göre daha iyi bir analitik değişkendir. Diğer yönden pik yükseklikleri daha kolay ölçülür ve dar pikler için daha doğru bir şekilde tayin edilebilir.

Modern kromatografi cihazlarının çoğu pik alanlarının kesin olarak bulunmasına olanak sağlayan dijital elektronik integral hesabı yapan cihazlarla donatılmıştır. Böyle bir donanım yoksa elle hesap yapılabilir. Uygun genişlikleri olan simetrik pikler için iyi sonuç veren basit bir yöntem pik yüksekliğini, pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği ile çarpmaktır. Genellikle elle yapılan integral hesabı teknikleri % 2 ile % 5 düzeyinde tekrarlanabilen alanlar sağlar, dijital integral hesaplayıcılar en az bir ondalık mertebesinde daha kesindir [93,97].

4.3.2.3. Kalibrasyon ve Standartlar

Kantitatif analizler için en dolaysız yöntem, bilinmeyenin bileşimine benzeyen bir seri standart çözelti hazırlanmasını içerir. Bundan sonra standartların kromatogramları alınır ve pik yükseklerı veya alanları derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Analizler bu grafiğe dayandırılır. Yüksek doğruluk için sık sık yeniden kalibrasyon grafiklerinin oluşturulması gereklidir [93,97].

4.3.2.4. İç Standart Yöntemi

En kesin Kromatografik kantitatif değerler, iç standart kullanılmak suretiyle elde edilir. Bu metotta iyi çözülmüş aynı miktarda iç standart hem numuneye hem de standartlara ilave edilir. Analitin iç standardın pik yüksekliğine veya alanına oranı bir analitik parametre olarak kullanılır. Bu metottan iyi sonuç alabilmek için iç standardın pikinin, numunede bulunan diğer maddelerin piklerinden iyi ayrılmış (Rs> 1,25) ve analitin pikine çok yakın olması gerekir. Uygun bir iç standart kullanılarak kesinliği %1'den daha düşük değerlere indirmek mümkündür.

4.4. HPLC Kullanırken Alınması Gereken Önlemler

4.4.1. Hareketli Faz Çözücüleri için Önlemler

1. Çözücünün degaze edilmesi: HPLC'de, eğer hava, hareketli fazda yüksek basınç altında çözünürse, pompa başında veya dedektör hücresinde, doğru analize imkan vermeyen hava kabarcıkları oluşturur. Bu yüzden mobil faz olarak kullanılan çözücü tamamen degaze

edilmelidir. Degaze işlemi özellikle, gazların kolayca çözündüğü su, alkol ve asetonitril veya bunların karışımı için gereklidir.

2. Çözücünün süzülmesi: HPLC çözeltileri, kullanılmadan önce daima süzülmelidir. Eğer süzülmeden kullanılırlarsa, kolon filtresi ve kolon başı tıkanabilir. Bunun sonucunda duyarlığın azalması, basıncın artması ve kolon ömrünün azalması gibi değişik problemler ortaya çıkabilir. Sulu ortamda süzme selüloz ester karışımı 0.22 μm gözenek büyüklüğüne sahip filtrelerle, organik ortamda ise 0.2 μm gözenek büyüklüğündeki politetrafloroetilen filtrelerle yapılır.

3. Çözücülerin değişimi: Eğer çözücü değiştirilecek olursa, diğer çözelti ilkiyle iyi karışabilir olmalıdır. Bu durum yalnızca pompanın düzensiz çalışmasına yol açmaz, aynı zamanda kolon ve dedektörü de kararsız hale getirir. Bir tampon kullanıldıktan hemen sonra organik bir çözücü kullanılırsa, HPLC sistemi tuzların çökmesi yüzünden çalışamaz hale gelir. Bu kolonun ömrünü de etkileyebildiğinden, organik çözücü kullanılmadan önce sistem su veya ara polaritede bir çözücü ile temizlenmelidir.

4.4.2. Kolon Kullanımı için Önlemler

1. Koruyucu Kolon Kullanımı: Hareketli faz, pompa çıkışından sonra, ayırmayı sağlayan kolon ile aynı sabit fazı içeren bir ön-kolondan geçirilir. Bu uygulamanın amacı, hareketli fazdaki safsızlıkları toplamak ve hareketli fazı sabit faz ile doygunluğa getirmek ve analitik kolonların ömrünü uzatmasıdır.

2. Kolon Teorik Plaka Sayısının Bozulması: HPLC sistemi çalıştırılmaya başlanınca akış hızı yavaş yavaş arttırılmalıdır. Aynı uygulama sistem kapatılırken de izlenmelidir. Böylece kolon teorik plaka sayısı bozulmaksızın kolon basıncının artması sağlanır.

3. Kolonun Korunması: Kolonlar rutubetli ve çok yüksek veya çok düşük sıcaklıkların olduğu yerlerde saklanmamalıdır. Kolonların özel bir çözücü ile saklanması, kirlenmeyi azaltır ve kolon ömrünü artırır. Bazı tamponlar (özellikle halojen tuzlarını içeren tamponlar) kolonun paslanmaz çelik duvarını aşındırır. Bu nedenle kolon saklanmadan önce uygun bir çözücüyle temizlenmelidir.

4. Kolonun Rejenerasyonu (yenilenmesi): Kolon performansı azaldığında en iyisi kolonu rejenere etmektir. Normal faz kolonları kullanıldığında, kolon önce çok az polarlıkta bir çözücü geçirilerek yenilenebilir ve sonra tekrar hareketli fazla dengeye getirilir. Ters faz kolonları metanol, THF, CH_2Cl_2 gibi çözücülerle yenilenebilir [95].

5. MATERYAL VE METOT

5.1. UV-VIS BÖLGESPEKTROSKOPİSİİLE FİTİK ASİT TAYİNİ

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Deneylerde, UV-VisSpektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35 ve Jasco V-530) ve 1 cm'lik kuartz küvetler, Synergy Water Prufication System (Millipore, Elix 5), homojenizator (Homogenizer Standart Unit) ve santrifüj cihazı (EBA 20 Hettich Zentrifugen) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup, demir(III) klorür ($FeCl_3$.6 H_2O), 5-sülfosalisilik asit ($HO_3SC_6H_3$-2-$(OH)CO_2H$·$2H_2O$), hidroklorik asit (HCl) Merck'ten, fitik asit (Inositolhezga fosforik asidin sodyum tuzu, IP6, $C_6H_{18}O_{24}P_6$) ve kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$) Sigma'dan temin edilmiştir.



Şekil 5.1. Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis Spektrofotometre.

5.1.2. Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan, kabuklu fındık, iç fındık, kavrulmuş fındık, iç fıstık, kavrulmuş fıstık, iç badem, kavrulmuş badem, ceviz, kestane gibi kuruyemiş ürünlerinin yanı sıra; çay yaprağı, yeşil çay, poşet yeşil çay, turist çay, altınbaş çay, filiz çay gibi çay ürünleri marketlerden satın alınmıştır.

5.1.3. Materyalin Hazırlanması

Kuruyemiş ve kuru çay örnekleri ilk önce uygun bir bıçak yardımı ile küçük parçacıklara ayrılır ve bir havanda ince toz haline gelinceye kadar öğütülerek homojen hale getirilir. Demleme çay örnekleri ise; kuru çay ürünlerine 25 mL 100 °C ultra deiyonize saf su eklenerek 100 °C' de 20 dakika demlenmeye bırakılarak hazırlanmıştır.

5.1.4. Deney Uygulamaları

5.1.4.1. Örneklerin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon çözeltisinin seçiminde Camire ve ark. (1982) ve Tokul ve Dost'un (2006) yapmış olduğu çalışmalardan yararlanılmıştır [22,100]. Bu çalışmalarda, fitik asidin ektraksiyonu için en uygun çözeltinin HCl çözeltisi olduğu saptanmıştır. HCl çözeltisi ile ektraksiyon yapıldığında hem santrifujleme işlemi daha kısa bir sürede gerçekleştirilerek ayrılma tam olarak sağlanabilmekte, hem de bekletilme gibi ek bir işleme de gerek kalmamaktadır. Yani HCl çözeltisi ile ekstraksiyon işlemi daha kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmalardan esinlenerek, çalışmamızda fitik asitin kuruyemiş ve çay ürünlerinden ekraksiyonu için 0.5 M HCl çözeltisi kullanılmıştır.

Deneylerde; kuruyemiş ürünleri için 1 g' lık, çay ürünleri için ise 0,5 g' lık 3 paralel örnekile çalışılmıştır. Üç ayrı örnek 50 mL'lik beher içerisinde tartılır, her bir örneğin üzerine 0,5 M 25 mL HCl çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat süre ile manyetik karıştırıcı ve bar kullanılarak karıştırılmıştır. Demleme çay örnekleri ise; 100 °C'de 20 dakika demlenen kuru çay ürünlerinin demlerinin toplam hacmi 25 mL, ortam asitliği 0,5 M olacak şekilde derişik HCl çözeltisi ile asitlendirilip oda sıcaklığında 1 saat süre ile manyetik karıştırıcı ve bar ile karıştırılarak hazırlanır. Daha sonra örnekler 5 dakika su banyosunda bekletilip, karıştırılmaya devam edilmiştir. Örnekler cam tüplere alınarak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. 0,2 µm çapındaki filtreden süzülerek süpernatant ayrılır ve kahverengi şişelerde buzdolabında saklanır.

5.1.4.2. Standartların Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Deneylerde 500 mg L^{-1}'lik stok çözeltiden 2; 3; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125 mg L^{-1}'lik fitik asit içerecek şekilde hesaplanıp hazırlanan fitik asit standartları kullanılmıştır.

Stok Fitik Asit Çözeltisi: 0,1250 g fitik asit tartılarak 250 mL'ye tamamlandı.

Wade ayıracı (Demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksi): 60 mg L^{-1} Fe^{3+} içerecek şekilde hesaplanan $FeCl_3$. $6H_2O$ tuzundan 0,1448 g 100 mL'lik bir beher içinde tartılır ve 100 mL kadar ultra deiyonize saf suda çözülür. Çözelti içerisinde bulunan 60 mg L^{-1}'lik demirin tamamının 5-sülfosalisilikasit ile kompleks oluşturabilmesi amacıyla tartılan demir miktarının 10 katı kadar 5-sülfosalisilikasit alınmalıdır. Bu nedenle 1,6869 g 5-sülfosalisilikasitdihidrat 100 mL' lik bir beher içinde tartılır ve yaklaşık olarak 100mL ultra deiyonize saf suda çözülür. Daha sonra 500 mL'lik bir balon içerisine hazırlanan her iki çözelti de boşaltılır ve 750 µL derişik HCl ilave edilerek

çözeltinin hacmi 500 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 60 mgL^{-1} demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksi içermektedir.

Hazırlanan her fitik asit standardından belirlenen hacimlerde mikro pipet yardımıyla çekilir ve 10 mL'lik cam tüpler içerisine alınır. Her bir tüpün üzerine 2 mL 60 mg L^{-1} Fe^{3+} içeren Wade ayracından eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra deiyonize saf su ile tamamlanır. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için 40 °C'lik su banyosunda bekletilir. Demirin fitik asit ile kompleks oluşum reaksiyonu endotermik bir reaksiyondur. Kompleks oluşumu için ortama ısı verilmesi gerekmektedir. Ancak fitaz enzimlerinin aktif hale geçmesini önlemek amacıyla sıcaklığın 50 °C'nin üzerine çıkması engellenmelidir. Bu nedenle sıcaklığı arttırmak yerine reaksiyon süresinin arttırılması uygun bulunmuştur. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulup 4000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildikten sonra 500 nm dalga boyunda fitik asit ilavesi ile demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.1.4.3. Örneklerin Analizi

Her bir örnek ekstraktından 10 mL'lik cam tüpler içerisine 0,2 mL'lik kısımlar bir mikro pipet yardımıyla alınır, üzerlerine 2.8 mL ultra deiyonize saf su ve 2 mL 60 mg L^{-1} Fe^{3+} içerecek şekilde hazırlanan Wade ayıracından ilave edilir. Birkaç dakika iyice çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C civarında bekletilir. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulup 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra 500 nm dalga boyunda örnek ekstraktlarının ilave edilmesi ile demir-5-sülfosalisilik asit kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.1.4.4. Kafein Analizi:

Kafein çözeltisinin hazırlanması (M: 194,2 g mol^{-1}) **:** 0.0250 g kafein az miktardaki saf su ile çözülür ve yine saf su ile 50 mL'ye seyreltilerek 500 ppm kafein çözeltisi hazırlanır.

İlk aşamada 50 ppm kafein çözeltisi içerecek şekilde 500 ppm kafein çözeltisinden belirlenen hacimde mikro pipet yardımıyla çekilir ve 10 mL'lik cam tüpler içerisine alınır. İkinci aşamada ise10 mL'lik cam tüp içerisine 50 ppm kafein çözeltisi içerecek şekilde 500 ppm kafein çözeltisinden ve 50 ppm fitik asit içerecek şekilde 500 ppm fitik asit çözeltisinden belirlenen hacimlerde alınır.

Her bir tübün üzerine 2 mL 60 mg L^{-1} Fe^{3+} içeren Wade ayracından eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra deiyonize saf su ile tamamlanır. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)–kafein veya demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C'ye kadar ısıtılır. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutularak 500 nm dalga boyunda fitik asit ilavesi ile demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.2. HPLC İLE FİTİK ASİT TAYİNİ

5.2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

HPLC deneylerinde, Perkin Elmer Series 200 Marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz; Spherisorb S5 CN; siyanopropil kolon (kolon uzunluğu: 250 mm, kolon iç çapı: 4.6 mm, tanecik büyüklüğü: 5 µm), Perkin Elmer Series 200 UV-VIS dedektör, Perkin Elmer Series 200 izo-kritik akış pompası, 7725 i Rheodyne enjektör sistemi ve 50 µL'lik loop içermektedir. Ayrıca Synergy Water Prufication System (Millipore), Homojenizator (Homogenizer Standart Unit) Santrifuj cihazı (EBA 20 Hettich Zentrifugen) Evaporasyon cihazı (IKA Werke RW 06-ML) da çalışmalarda kullanılmıştır. Mobil faz; 0,1 M HNO_3 içeren % 30'luk asetonitril çözeltisidir. Bu amaçla 300 mL saf asetonitril çözeltisine der HNO_3 çözeltisinden 7 mL ilave edilir ve ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır. HPLC cihazının akış hızı; 1 mL dak^{-1}, kullanılan UV-Vis dedektörün dalga boyuda 460 nm'dir. Deneylerde kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır ve bunlar; $FeCl_3.6H_2O$ (Merck), HCl (Merck), Fitik asit (Inositolhezga fosforik asidin sodyum tuzu, IP6):$C_6H_{18}O_{24}P_6$ (Sigma), Amonyum tiyosiyanat (Merck), Asetonitril (Merck), HNO_3 (Merck), kafein, $C_8H_{10}N_4O_2$ (Sigma) dir.



Şekil 5.2. Perkin Elmer Series 200 Marka HPLC cihazı.

5.2.2. Materyal

Deneysel çalışmalarda kullanılan, kabuklu fındık, iç fındık, kavrulmuş fındık, iç fıstık, kavrulmuş fıstık, iç badem, kavrulmuş badem, ceviz, kestane gibi kuruyemiş ürünlerinin yanı sıra; çay yaprağı, yeşil çay, poşet yeşil çay, turist çay, altınbaş çay, filiz çay gibi çay ürünleri marketlerden satın alınmıştır.

5.2.3. Materyalin Hazırlanması

Kuruyemiş ve kuru çay örnekleri ilk önce uygun bir bıçak yardımı ile küçük parçacıklara ayrılır ve bir havanda ince toz haline gelinceye kadar öğütülerek homojen hale getirilir. Demleme çay örnekleri ise; kuru çay ürünlerine 25 mL 100 °C ultra deiyonize saf su eklenerek 100 °C'de 20 dakika demlenmeye bırakılarak hazırlanılır.

5.2.4. Deney Uygulamaları

5.2.4.1. Örneklerin Ekstraksiyonu

HPLC örnek ekstratları, UV-Vis Spektroskopisi yönteminde belirtildiği gibi 0,5 M HCL çözeltisi ile hazırlanmıştır.

5.2.4.2. Standartların Hazırlanması ve Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Stok Fitik Asit Çözeltisi: 1.0000 g fitik asit tartılıp az miktarda saf suda çözüldükten sonra 1 L'ye saf su ile tamamlanarak hazırlanır. Deneylerde 1000 mg L^{-1}'lik stok çözeltiden hazırlanan 1; 5; 10; 25; 50; 75; 100; 125 mg L^{-1}'lik fitik asit standartları kullanılmıştır.

Demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin hazırlanması: 100 mg L^{-1} Fe^{3+} içerecek şekilde hesaplanan $FeCl_3.6H_2O$ tuzundan 0,0483 g, 50 mL'lik bir beher içerisinde tartılır ve 25 mL kadar ultra deiyonize saf suda çözülür. Çözelti içerisinde bulunan 100 mg L^{-1}'lik demirin tamamının tiyosiyanat iyonları ile kompleks oluşturabilmesi amacıyla tartılan demirin mol miktarının en az 5 katı kadar amonyum tiyosiyanat alınmalıdır. Bu nedenden dolayı 0,1358 g amonyum tiyosiyanat 50 mL'lik bir beher içersinde tartılır ve 25 mL kadar ultra deiyonize saf suda çözülür. Daha sonra 100 mL'lik bir balon içerisine hazırlanan her iki çözeltide boşaltılır ve 200 µL derişik HNO_3 ilave edilerek çözeltinin hacmi 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan çözelti 100 mgL^{-1} demir(III)-tiyosiyanat kompleksi içermektedir.

Hazırlanan her fitik asit standardından 1 mL'lik kısımlar mikro pipet yardımıyla çekilir ve 10 mL'lik cam tüpler içerisine alınır. Her bir tüpün üzerine 2 mL 100 mgL^{-1} Fe^{3+} içeren demir(III)-tiyosiyanat kompleksinden ilave edilir. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C'ye ısıtılır. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek HPLC'ye enjekte edilir ve 460 nm dalga boyunda fitik asit ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.2.4.3. Örneklerin Analizi

Her bir örnek ekstraktından 10 mL'lik cam tüpler içerisine 0,2 mL'lik kısımlar bir mikro pipet yardımıyla alınır, üzerlerine 800 µL ultra deiyonize saf su ve 2 mL 100 mgL^{-1} Fe^{3+} içerecek şekilde hazırlanan demir(III)-tiyosiyanat kompleksinden ilave edilip iyice çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C civarında bekletilir. Oda sıcaklığına kadar soğutulan örnekler 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek HPLC sistemine enjekte edilir ve 460 nm dalga boyunda örnek ekstraktlarının ilave edilmesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.2.4.4. Kafein Analizi:

İlk aşamada 50 ppm kafein çözeltisinden 1 mL mikro pipet yardımıyla çekilir ve 10 mL lik cam tüpler içersine alınır. İkinci aşamada ise 1 mL çözeltide 50 mg L^{-1} kafein ve 50 mg L^{-1} fitik asit olacak şekilde belirlenen hacimlerde alınıp 10 mL'lik cam tüp içersine konulur. Her bir tüpün üzerine 2 mL 100 mg L^{-1} Fe^{3+} içeren demir(III)-tiyosiyanat kompleksinden ilave edilir. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)–kafein veya demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C'ye kadar ısıtılır. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek HPLC'ye enjekte edilir ve 460 nm dalga boyunda fitik asit ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülür.

5.2.4.5. Sabunlaşma

Fındık, fıstık, ceviz gibi yağlı tohumlarda bulunan yağ, kolon dolgu maddesinde tıkanmaya sebep olduğundan kolon içi basıncın artmasına, kolonun bozulmasına sebep olur. Bu sebepten dolayı yağın uzaklaştırılması gerekir. Çalışmada İdeli ve Dost'un (2007) kullandığı metottan yararlanarak sabunlaştırma yapılmıştır [96]. Yönteme göre 10 mL örnek ekstratı, 7 g

NaOH içeren 50 mL metanol:toluen (2:1 v/v) ortamında 60-70 °C de 3 saat karıştırılır. Karışım soğutulduktan sonra sabun fazı ayrılır. 70–80 °C'de evaporasyon işlemi gerçekleştirilir. Elde edilen çözeltiden 1 mL'lik kısım alınıp, 10 mL'lik cam tüp içersine konulur. Her bir tüpün üzerine 2 mL 100 mg L^{-1} Fe^{3+} içeren demir(III)-tiyosiyanat kompleksinden ilave edilir. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C'ye kadar ısıtılır. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek HPLC' ye enjekte edilir. Kolon içi basınç değişimi ölçülür.

5.2.4.6. Sıcaklık Kontrolü

100 °C'de 45 dakika bekletilen 50 ppm fitik asit standardı ve oda sıcaklığındaki 50 ppm fitik asit standardından 1 mL'lik kısımlar mikro pipet yardımıyla çekilir ve 10 mL'lik cam tüpler içerisine alınır. Her bir tüpün üzerine 2 mL 100 mg L^{-1} Fe^{3+} içeren demir(III)-tiyosiyanat kompleksinden ilave edilir. Daha sonra her tüpün ağzı sıkıca kapatılarak hızlı bir şekilde birkaç dakika çalkalanır ve 2,5 saat demir(III)-fitat kompleksinin oluşması için su banyosunda 40 °C'ye kadar ısıtılır. Tüplerdeki karışım oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek HPLC' ye enjekte edilir ve 460 nm dalga boyunda fitik asit ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin derişimindeki dolayısıyla da absorpsiyondaki azalma ölçülürek sıcaklığın fitik asit üzerindeki etkisi incelenir.

6. SONUÇLAR VETARTIŞMA

Kuruyemiş ve çay ürünlerindeki fitik asit miktarlarının tayinlerinde Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) yöntemleri kullanılmıştır. Fitik asidin UV-Vis bölgede absorpsiyonu olmadığı için, her iki yöntemde de analizler metal yer değiştirme reaksiyonu üzerine kurulmuştur. UV-Vis yönteminde, demir(III)-5-sülfosalislik asit, HPLC'de ise demir(III)-tiyosiyanat renkli kompleksleri üzerine fitik asit ilavesiyle, renkli komplekslerdeki demir(III) iyonunun yer değiştirilmesiyle demir(III)-fitik asit kompleksi oluşturulmaktadır. Söz konusu komplekslerde ki metal yer değiştirme reaksiyonları şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir.

Demir(III)-5-sülfosalisilik asit + fitik asit $\rightleftharpoons$ demir(III)-fitat + 5-sülfosalisilik asit

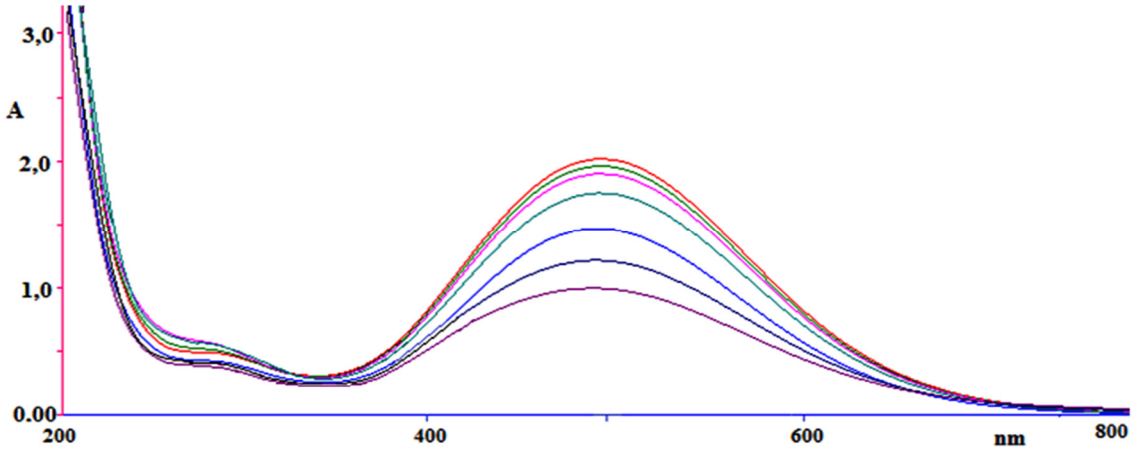
Demir(III)-tiyosiyanat + fitik asit $\rightleftharpoons$ demir(III)-fitat + tiyosiyanat

Absorpsiyon değerleri; fitik asit ilavesiyle, UV-Vis'de demir(III)-5-sülfosalisilik asit, HPLC'de ise demir(III)-tiyosiyanat komplekslerinde ki demir(III) iyonunun fitik aside bağlanması sonucu komplekslerin konsantrasyonlarındaki azalma ve bunun sonucu olarak renkteki değişimlerin 500 ve 460 nm'de ölçülen değerleridir.

6.1. UV-VIS BÖLGESPEKTROSKOPİSİ İLE FİTİK ASİT TAYİNİ

UV-Vis spektroskopi yönteminde, kuruyemiş ve çay ürünleri içerisindeki fitik asit miktarlarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon grafiğini oluşturmak için, 2-100 mg L^{-1} aralığında değişen standart fitik asit çözeltiler kullanılmıştır. Yedi farklı fitik asit standart çözeltilerinin demir(III)-5-sülfosalisilik asit çözeltisi ile muamelesinden sonra elde edilen çözeltilerin (son hacim içerisinde 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 mg L^{-1} fitik asit olacak şekilde) UV-Vis dalga boyu taramalarına ait spektrum Şekil 6.1 ve okunan absorpsiyon değerleri ise Tablo 6.1'de verilmiştir.

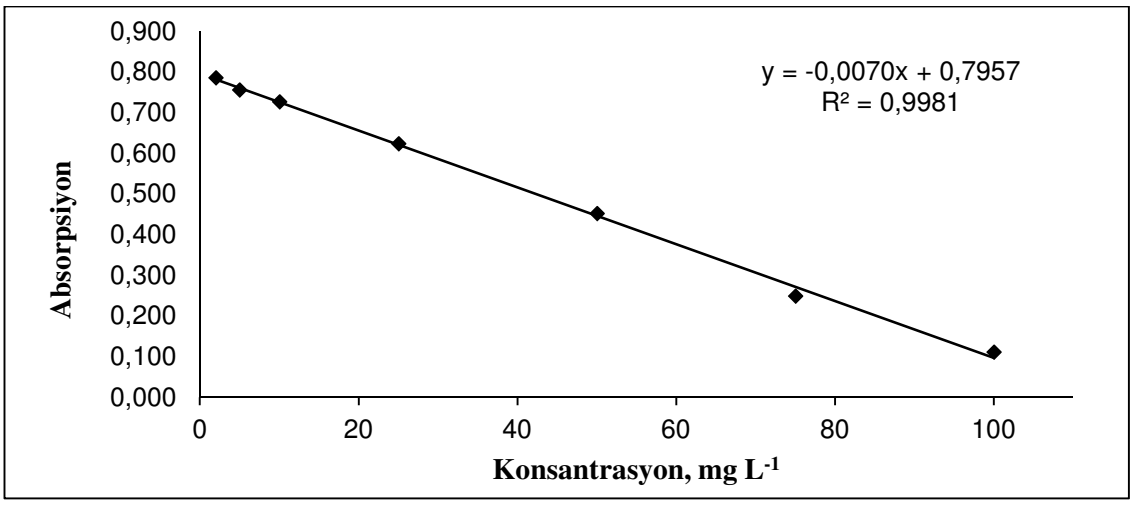
UV-Vis spektrumlarında, fitik asit konsantrasyonu artışı ile absorpsiyonu ölçülen demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksi absorpsiyonundaki azalmalar orantılı bir şekilde meydana geldiği görülmektedir. Elde edilen bu absorpsiyon değerleri ile fitik asit konsantrasyonlarının grafiğe alınması ile oluşturulan kalibrasyon grafiği (Şekil 6.2) çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusallığının oldukça iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.1. Fitik asit standartlarının ilavesi ile demir(III)-5 sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişim.

Tablo 6.1. Fitik asit standartlarının ilavesiyle demir(III)-5 sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonu değerleri.

Derişim (mg L^{-1})	**Absorpsiyon**
2	0.786
5	0.756
10	0.727
25	0.624
50	0.452
75	0.249
100	0.111



Şekil 6.2. Fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi.

Tablodaki değerlerle R^2 değeri 0,9981 olan bir kalibrasyon grafik elde edilmiştir. Bu değer yöntemin doğrusallığının çalışılan konsantrasyon aralığında oldukça iyi olduğunu ve hesaplamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Örneklerin analizine geçmeden önce, UV-Vis yöntemin ölçüm tekrarlanabilirliğini tespiti amacıyla iki ayrı deney tüpüne alınan ve standartların absorpsiyon ölçümleri için uygulanan işlemlerden geçirilen 100 mg L^{-1} ve 50 mg L^{-1}' lik standart fitik asit çözeltilerinin demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksi ile muamelesi sonucunda elde edilen çözeltilerin 500 nm dalga boyunda on kez alınan absorpsiyon değerleri ile ölçümlerin standart sapmasının ve bağıl standart sapmasının hesaplanmasında kullanılan ilgili veriler Tablo 6.2 ve Tablo 6.3'de gösterilmiştir

Tablo 6.2. 100 mg L^{-1} fitik asit standardı için UV-Vis yöntemin ölçüm tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler.

Ölçümler	**X_i**	**$X_{ort} - X_i$**	**$(X_{ort} - X_i)^2$**
1	0.111	0.121-0.111	1.0×10^{-4}
2	0.111	0.121-0.111	1.0×10^{-5}
3	0.115	0.121-0.115	3.6×10^{-5}
4	0.118	0.121-0.118	0.9×10^{-6}
5	0.117	0.121-0.117	1.6×10^{-5}
6	0.123	0.121-0.123	0.4×10^{-6}
7	0.126	0.121-0.126	2.5×10^{-5}
8	0.128	0.121-0.128	4.9×10^{-5}
9	0.128	0.121-0.128	4.9×10^{-5}
10	0.130	0.121-0.130	8.1×10^{-5}
	$X_{ort} = 0.121$		$\Sigma = 46.90 \times 10^{-5}$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma(X_{ort} \quad X_i)^2}{N-1}} \text{ ise } \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{46.90 \times 10^{-5}}{10-1}} \text{ ise}$$

Standart Sapma (SD) = 7.21×10^{-3}

$$\text{Bağıl Standart Sapma (RSD)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \text{ ise } \text{RSD} = \frac{7.21 \times 10^{-3}}{0.121} \times 100$$

RSD= 5.95 %

Tablo 6.3. 50 mg L^{-1} fitik asit standardı için UV-Vis yöntemin ölçüm tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı	X_i	$X_{ort} - X_i$	$(X_{ort} - X_i)^2$
1	0.4612	0.4605-0.4612	4.9×10^{-7}
2	0.4612	0.4605-0.4612	4.9×10^{-7}
3	0.4610	0.4605-0.4610	2.5×10^{-7}
4	0.4607	0.4605-0.4607	4.0×10^{-8}
5	0.4608	0.4605-0.4608	9.0×10^{-8}
6	0.4604	0.4605-0.4604	1.0×10^{-8}
7	0.4604	0.4605-0.4604	1.0×10^{-8}
8	0.4602	0.4605-0.4602	9.0×10^{-8}
9	0.4598	0.4605-0.4598	4.9×10^{-7}
10	0.4593	0.4605-0.4593	1.4×10^{-6}
	$X_{ort} = 0.4605$		$\Sigma = 3.4 \times 10^{-6}$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma (X_{ort} - X_i)^2}{N - 1}} \text{ ise } \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{3.4 \times 10^{-6}}{10 - 1}} \text{ ise}$$

Standart Sapma (SD) = 6.15×10^{-4}

$$\text{Bağıl Standart Sapma (RSD)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \text{ ise } \text{RSD} = \frac{6.15 \times 10^{-4}}{0.4605} \times 100$$

RSD= 0.13 %

Bu iki RSD değerleri göz önünde bulundurulduğunda daha düşük fitik asit konsantrasyonlarında yöntem tekrarlanabilirliğinin daha iyi olduğu görülmektedir. Genel olarak, yöntem tekrarlanabilirliğini RSD olarak % 6'dan daha düşük olduğu görülmektedir.

Yer değiştirme reaksiyonunun tekrarlanabilirliğinin bulunması için üç ayrı tüp içerisinde hazırlanan 50 mg L^{-1} fitik asit çözeltisi yöntem prosedüründe belirtildiği gibi demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksi ile muamele edilerek yer değiştirme reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta elde edilen çözeltinin UV-Vis ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç elde edilen değerler Tablo 6.4'de, hesaplamalarla ilgili veriler Tablo 6.5'de verilmiştir.

Tablo 6.4. Üç ayrı 50 mg L^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyon değerleri.

Numune	Absorpsiyon	Ortalama Absorpsiyon
Standart 1	0,4580	0,4579
	0,4578	
	0,4580	
Standart 2	0,4600	0,4600
	0,4601	
	0,4600	
Standart 3	0,4612	0,4610
	0,4610	
	0,4609	

Tablo 6.5. Yer değiştirme reaksiyonunun tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı	X_i	$X_{ort} - X_i$	$(X_{ort} - X_i)^2$
1	0.4579	0.4596 – 0.4579	2.89×10^{-6}
2	0.4600	0.4596 – 0.4600	1.60×10^{-7}
3	0.4610	0.4596 – 0.4610	1.96×10^{-6}
	$X_{ort} = 0.4596$		$\Sigma = 5.01 \times 10^{-6}$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma (X_{ort} - X_i)^2}{N - 1}} \text{ ise } \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{5.01 \times 10^{-6}}{3 - 1}} \text{ ise}$$

Standart Sapma (SD) = 1.58×10^{-3}

$$\text{Bağıl standart sapma} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \text{ ise } RSD = \frac{1.58 \times 10^{-3}}{0.4596} \times 100$$

RSD= 0.34 %

RSD'ye göre yer değiştirme reaksiyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir.

UV-Vis Spektroskopi yönteminin doğruluğunu tespit etmek amacıyla 50 mg L^{-1}'lik standart için alınan absorpsiyon değerleri Şekil 6.2'deki kalibrasyon eğrisine ait denklem kullanılarak konsantrasyon ve buna bağlı olaraktan bağıl hata bulunmuştur.

Kalibrasyon Grafiğinin Denklemi→ y= - 0.0070 x + 0.7957

50 mg L^{-1}'lik standart için alınan absorpsiyon ölçümü sonucu →

Olçüm ortalaması = 0.4596

0.4596 = - 0.0070 x + 0.7957

X = 48.01mg L^{-1}

Bağıl Hata = $\frac{(G.D. \quad D.D.)}{G.D.}$ x 100

G.D. = gerçek değer ; D.D. = deneysel değer olarak ifade edilmiştir.

Bağıl Hata = $\frac{(50 - 48.01)}{50}$ x 100

Bağıl Hata = % 3.99

Yöntem doğruluğu, fitik asit miktarının tayini için güvenilir bir şekilde kullanılabilir düzeydedir.

6.1.1. Numune İçerisindeki Fitik Asit Miktarlarının Hesaplanması

Numune içerisindeki fitik asit miktarlarının hesaplanmasında aynı gün içerisinde oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Örnek olması amacıyla yeşil çay numunesi için yapılan hesaplama aşağıda verilmiştir. Diğer hesaplamalar da aynı şekilde yapılmış olup her bir örneğe ait spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 6.6'da mg g^{-1} cinsinden verilmiştir.

Yeşil çay için alınan ölçüm sonuçları: 0.161; 0.161; 0.158

$x_{ort} = \frac{(0.161 + 0.161 + 0.158)}{3} = 0.160$

y= - 0.0070 x + 0.7957 ise 0.160 = - 0.0070 x + 0.7957

x = 90.798 mg L^{-1}

1000 mL'de 90.798 mg fitik asit bulunuyorsa 0.2 mL numunede ki madde miktarı,

90.798 mg $\frac{1}{1000 \text{ mL}}$ x 0.2 mL = 0,018 mg $\frac{1}{0,2 \text{ mL}}$

25 mL ekstraksiyon çözeltisinde ki madde miktarı,

$0.018 \text{ mg} \frac{1}{0.2 \text{ mL}} \text{ x } 25 \text{ mL} = 2.27 \text{ mg}$

Numuneler 1/5 oranında seyreltildiğinden dolayı örnekteki madde miktarı,

2.27 mg x 5 = 11.35 mg

1 g numunede ki fitik asit miktarı; $\frac{11.35\ \text{mg}}{0.5\ \text{g}}$ = 22.70 mg.g $^{-1}$ olarak bulunur.

Tablo 6.6. Tüm örneklerin UV-Vis spektrofotometre ölçümü ile hesaplanan fitik asit miktarları.

Ürün Adı	Fitik Asit Miktarları, mg g^{-1}
Kabuklu fındık	6.95 ± 0.16
İç fındık	6.55 ± 0.10
Kavrulmuş fındık	3.35 ± 0.09
İç fıstık	3.79 ± 0.06
Kavrulmuş fıstık	2.70 ± 0.05
İç badem	5.97 ± 0.01
Badem	5.95 ± 0.01
Ceviz	6.61 ± 0.04
Kestane	2.56 ± 0.03
Çay yaprağı	25.01 ± 0.02
Yeşil çay	22.70 ± 0.002
Poşet yeşil çay	21.68 ± 0.01
Altınbaş çay	17.76 ± 0.002
Turist çay	17.42 ± 0.002
Filiz çay	15.89 ± 0.01
Demlenmiş çay yaprağı	21.14 ± 0.01
Demlenmiş yeşil çay	22.49±0.01
Demlenmiş poşet yeşil çay	20.01±0.41
Demlenmiş altınbaş çay	17.15 ± 0.01
Demlenmiş turist çay	15.83 ± 0.02
Demlenmiş filiz çay	15.68 ± 0.004

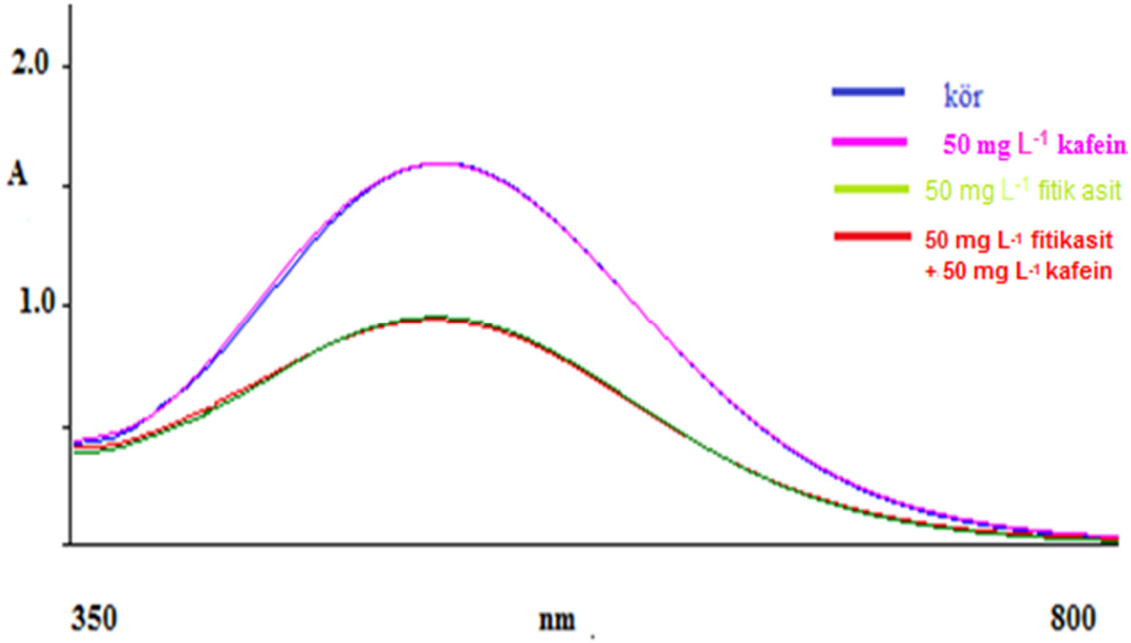
6.1.1.1. Kafein analizi

Çay ürünleri içerisinde bulunan kafeinin kullanılan dalga boyunda bir girişim yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla, ayraç çözeltisi içerisine, hazırlanan kafein çözeltisi ve fitik asit standardı eklendiğindeki demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişimi değerleri Tablo 6.7'de verilmektedir. İlgili analizin absorpsiyon spektrumu Şekil 6.3'te görülmektedir. Buna göre çayın içersinde bulunan kafein; demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyon değerindeki değişim analizin gerçekleştirildiği dalga boyunda bağıl

hata cinsinden %1'den daha düşüktür. Bu sonuç, çay içerisindeki kafeinin fitik asit tayini üzerine önemli bir girişim yapmadığını göstermektedir.

Tablo 6.7. Standart fitik asit çözeltisi ve kafein ilavesiyle demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişimi.

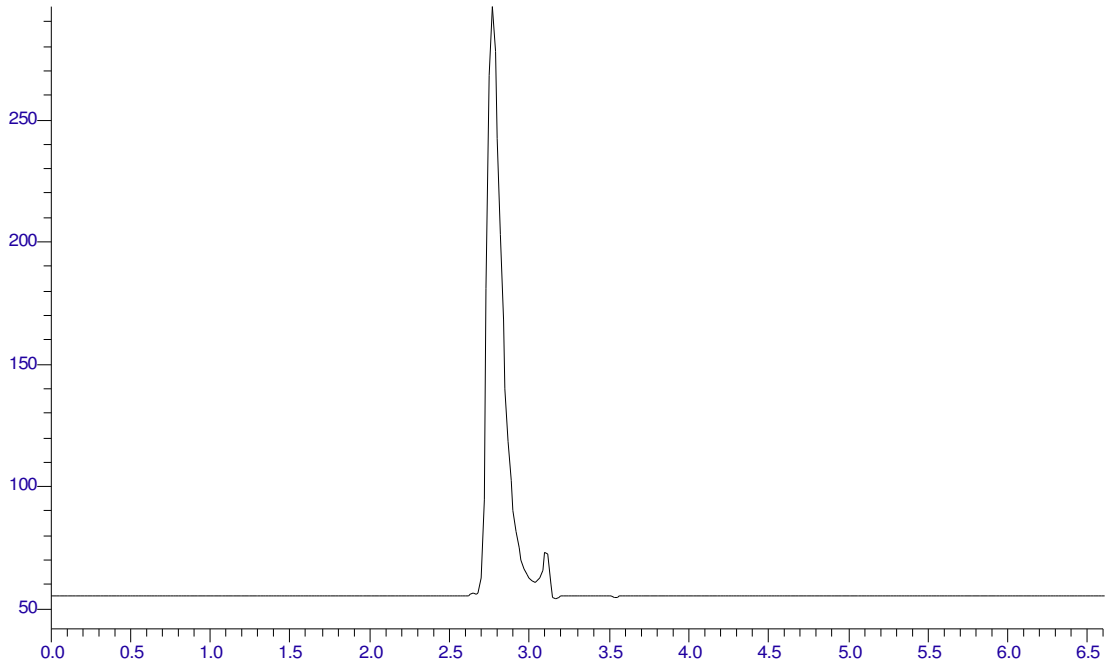
Numune	Absorpsiyon
Ayıraç (kör)	1.6258
50 ppm kafein + Ayıraç	1.6261
50 ppm fitik asit + Ayıraç	1.0040
50 ppm kafein + 50 ppm fitik asit + Ayıraç	0.9974



Şekil 6.3. Kafein çözeltisi ile fitik asit standardının ilavesi ile demir(III)-5-sülfosalisilik asit kompleksinin absorpsiyonundaki değişim.

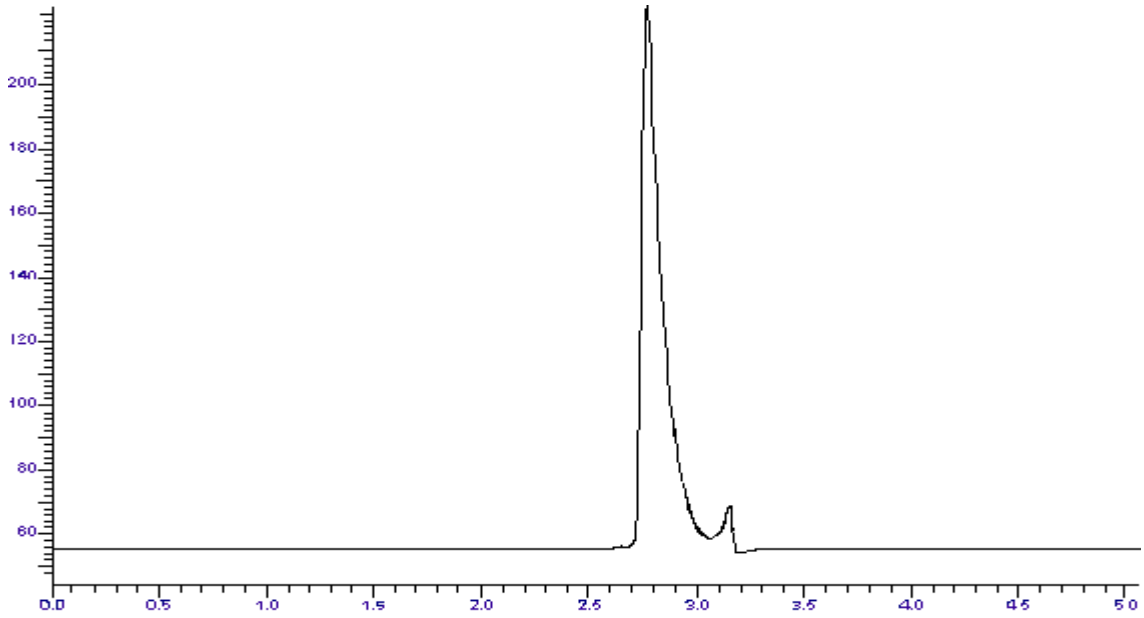
6.2. HPLC İLE FİTİK ASİT TAYİNİ

Kuruyemiş ve çay ürünlerinde bulunan fitik asidin tayinine yönelik uyguladığımız ikinci yöntem HPLC yöntemidir. Dost ve Tokul'un (2006) [22] kullanmış olduğu yöntemden faydalanarak uygulanan HPLC yönteminde, mobil faz olarak 0.1 M HNO_3 içeren % 30'luk asetonitril çözeltisi kullanılmış ve akış hızı 1 $mLdak^{-1}$. olacak şekilde ayarlanmıştır. Dedektör UV-Vis dedektördür. Bu şartlar altında demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin alıkonma süresi 2.82 dakika olup; fitik asit ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksindeki azalma 460 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Alıkonma süresinin 2.8 ± 0.2 dak. gibi çok kısa süre alması, klasik HPLC çözgenlerinden biri olan asetonitril çözeltisinden yalnızca %30'luk oranında kullanılması ve çözelti karışımlarının yüksek miktarlarını gerektirmemesi gibi yönleriyle yöntem üstünlük taşımaktadır. Şekil 6.4'de optimum şartlarda elde edilen demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin piki görülmektedir. Pik; istenildiği şekilde keskin, simetrik ve 3 dak. gibi kısa bir analiz zamanını gerektirmektedir.



Şekil 6.4. Demir(III)-tiyosiyanat kompleksine fitik asit ilavesi sonucu elde edilen kromatogramı.

Şekil 6.5. yeşil çay örneğine ait pikini göstermektedir. İzlenen pik demir(III)-tiyosiyanat kompleksine ait olduğundan pikin görünümü standartlarınki ile aynı şekildedir. Seçilen dalga boyunda örneğin dışında herhangi bir maddenin varlığı görülmemektedir.



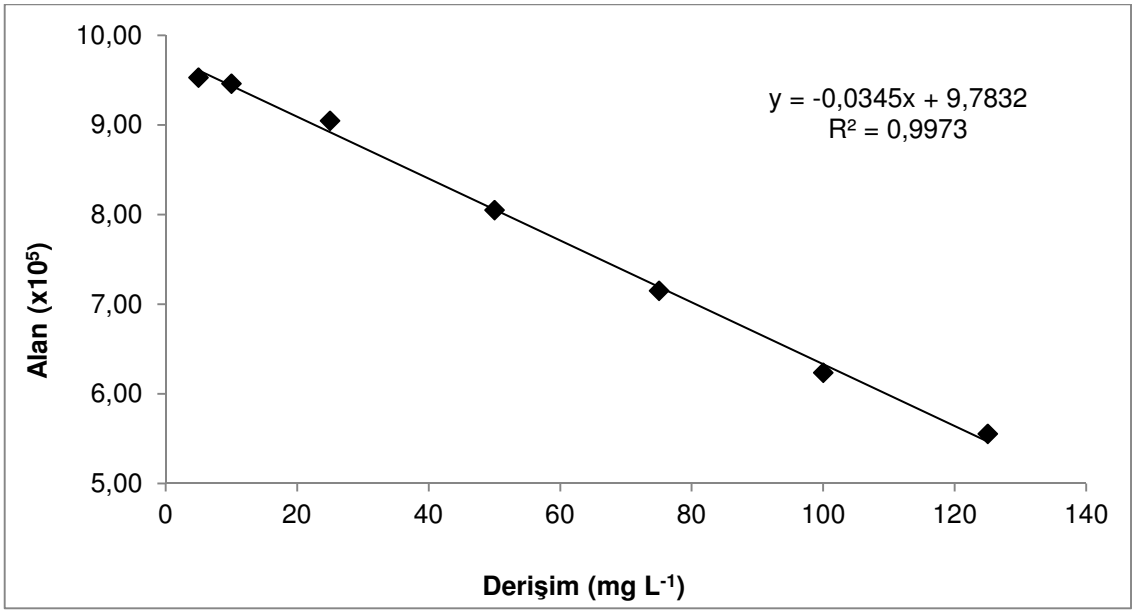
Şekil 6.5. Yeşil çay örneğine ait kromatogramı.

Çalışmada öncelikle HPLC cihazında döteryum lamba kullanılmış sonrasında yöntemin hassasiyetini arttırmak amacıyla Vis lamba kullanılmıştır.

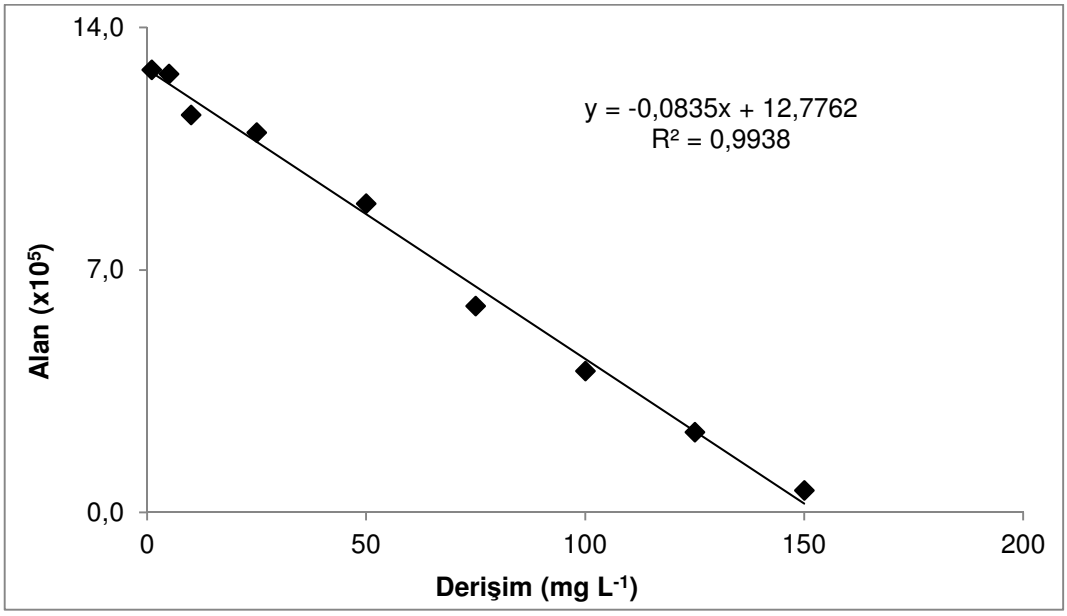
Çalışmada kullanılan fitik asit standartların konsantrasyonları 1-150 mg L^{-1} arasında değişmektedir. Dokuz farklı standart (son çözelti içerisinde fitik asit konsantrasyonu 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 mg L^{-1}) fitik asit çözeltilerinin demir(III)-tiyosiyanat çözeltisi ile muamelesi ile metal yer değiştirme reaksiyonu sonrası demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin ve bunun sonucu olarak renk değişimi ile döteryum lamba ve Vis lamba kullanıldığında ölçülen absorpsiyon değerleri Tablo 6.8'de gösterilmiştir. Şekil 6.8 ve Şekil 6.9.'de elde edilen absorpsiyon değerleri ile fitik asit standartlarının grafiğe geçirilmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri çalışılan konsantrasyon aralığında, yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla verilmiştir. Ölçümler Vis lamba kullanımının iki bakımdan avantaj sağladığını göstermektedir. Birinci olarak, çalışılan doğrusallık aralığının daha geniş olmasına ve ikinci olaraktan duyarlığın artmasına neden olmuştur. Bunun için ölçümler Vis lamba kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numuneler içerisindeki fitik asit miktarları, analizin yapıldığı gün oluşturulan kalibrasyon grafikleri ile hesaplanmıştır.

Tablo 6.8. Fitik asit standartlarının pik alanları.

Döteryum Lamba		**Vis Lamba**	
Derişim (mg/L)	**Pik Alanları**	**Derişim (mgL^{-1})**	**Pik Alanları**
		1	1278184.00
5	952965.62	5	1265749.67
10	945885.06	10	1147875.00
25	904479.11	25	1097219.33
50	805114.27	50	891564.11
75	714891.53	75	596528.67
100	623341.45	100	408344.33
125	555235.88	125	232101.33
		150	63705.00

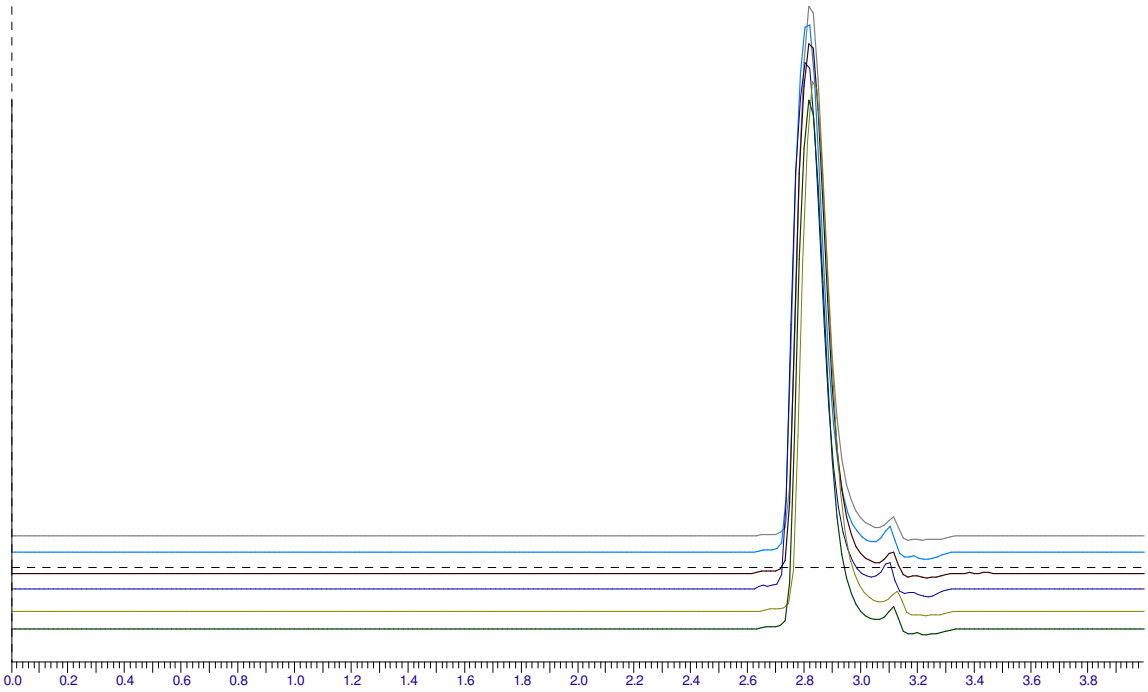


Şekil 6.6. Döteryum lamba kullanıldığında fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 6.7. Vis lamba kullanıldığında fitik asit standartlarına ilişkin kalibrasyon eğrisi.

Tablodaki değerlerle R^2 değeri 0,9938 olan bir grafik elde edilmiştir. Bu değer yöntemin doğrusallığının çalışılan konsantrasyon aralığında oldukça iyi olduğunu ve hesaplamalarda kullanılabileceğini göstermektedir. Şekil 6.8.'de kalibrasyon grafiği elde etmek için kullanılan standartlara ait piklerin çakıştırılmış HPLC kromatogramları gösterilmiştir.



Şekil 6.8. Fitik asit standartlarının ilavesi ile demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin absorpsiyonundaki değişime ait HPLC kromatogramı.

Örneklerin analizine geçmeden önce HPLC yöntemin tekrarlanabilirliğini tespit etmek amacıyla 50 mg L^{-1} ve 5 mg L^{-1} fitik asit çözeltileri ayrı ayrı iki deney tüpüne alınarak yöntem prosedüründe belirtildiği gibi demir(III)-tiyosiyanat çözeltisi ile muamele edilerek standartların kromatogramlarının elde etmek için yapılan işlemler tekrar edilir. Ard arda alınan 10 ölçüm ile pik alanları türünden standart sapma, bağıl standart sapma değerleri hesaplanır. 460 nm dalga boyunda demir(III)-tiyosiyanat kompleksindeki azalmadan elde edilen pik alanları değerleri ile yöntemin standart sapmasının ve bağıl standart sapmasının hesaplanmasında kullanılan ilgili veriler Tablo 6.9 ve Tablo 6.10'da gösterilmiştir.

Tablo 6.9. 50 mg L^{-1} fitik asit standardı için HPLC yöntemin tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı (50 mg L^{-1})	**Pika Alanı, X_i**	**$X_{ort} - X_i$**	**$(X_{ort} - X_i)^2$**
1	775978	662685,4-775978	1.28×10^{10}
2	735711	662685,4-735711	5.3×10^{9}
3	665534	662685,4-665534	8.1×10^{6}
4	652771	662685,4-652771	9.8×10^{7}
5	639754	662685,4-639754	5.3×10^{8}
6	646322	662685,4-646322	2.7×10^{8}
7	641882	662685,4-641882	4.3×10^{8}
8	637924	662685,4-637924	6.1×10^{8}
9	616307	662685,4-616307	2.2×10^{9}
10	614671	662685,4-614671	2.3 x 109
	Xort : 662685.4		$\Sigma = 2.46 \times 10^{10}$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma\left(X_{ort} - X_i\right)^2}{N-1}} \text{ ise;} \qquad \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{2{,}46 \times 10^{10}}{9}}$$

Standart Sapma (SD) =52281.29

$$\text{Bağıl Standart Sapma (RSD)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \text{ ise } RSD = \frac{52281.29}{662685} \times 100$$

RSD = % 7.88

Tablo 6.10. 5 mg L^{-1} fitik asit standardı için HPLC yöntemin tekrarlanabilirliğinin hesaplanmasına ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı (5mg L^{-1})	X_i	$X_{ort} - X_i$	$(X_{ort} - X_i)^2$
1	1136889	1022655.5-1136889	1.3×10^{10}
2	1048430	1022655.5-1048430	6.6×10^{8}
3	1042394	1022655.5-1042394	3.9×10^{8}
4	1031150	1022655.5-1031150	7.2×10^{7}
5	1020468	1022655.5-1020468	4.8×10^{6}
6	996075	1022655.5-996075	7.1×10^{8}
7	996216	1022655.5-996216	6.9×10^{8}
8	999574	1022655.5-999574	5.3×10^{8}
9	979221	1022655.5-979221	1.8×10^{9}
10	976138	1022655.5-976138	2.2×10^{9}
	X_{ort} =102265.5		$\Sigma=2.02 \times 10^{10}$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma (X_{ort} - X_i)^2}{N-1}} \quad \text{ise;} \quad \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{2.02 \times 10^{10}}{9}}$$

Standart Sapma (SD)= 47375.57

$$\text{RSD} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \quad \text{ise} \qquad \text{RSD} = \frac{47375.57}{1022655.5} \times 100$$

RSD= 4.63%

Bu iki RSD değerleri göz önünde bulundurulduğunda daha düşük fitik asit konsantrasyonlarında yöntem tekrarlanabilirliğinin daha iyi olduğu görülmektedir.

Yer değiştirme reaksiyonunun tekrarlanabilirliğinin bulunması için üç ayrı tüp içerisinde hazırlanan 50 ve 5 mg L^{-1} fitik asit çözeltisi yöntem prosedüründe belirtildiği gibi demir(III)-tiyosiyanat çözeltisi ile muamele edilerek yer değiştirme reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçta elde edilen çözeltinin HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaç elde edilen değerler Tablo 6.11 ve Tablo 6.13'de verilmiştir.

Tablo 6.11. Üç ayrı 50 mg L^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin pik alanı değerleri.

Numune	Pik alanı	Ortalama Alan
Standart 1	893560	887125.67
	888825	
	878992	
Standart 2	926447	902571.67
	890851	
	890417	
Standart 3	891841	884995.00
	883312	
	879832	

Tablo 6.12. Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı	X_i	$X_{ort} - X_i$	$(X_{ort} - X_i)^2$
1	887125.67	891564.11-887125.67	$1.97x10^7$
2	902571.67	891564.11-902571.67	$1.21x10^8$
3	884995.00	891564.11-884995.00	$4.32x10^7$
	X_{ort} = 891564.11		$\Sigma=1.84 \times 10^8$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma(X_{ort} - X_i)^2}{N-1}} \quad \text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{1.84 \times 10^8}{3-1}} \text{ ise}$$

Standart Sapma (SD) = 7831.97

$$\text{Bağıl Standart Sapma (RSD)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \times 100 \text{ ise } \text{RSD} = \frac{7831.97}{891564.11} \times 100$$

RSD= 0.88 %

Tablo 6.13. Üç ayrı 5 mgL^{-1} fitik asit standardının ilavesiyle demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin pik alanı değerleri.

Numune	Pik alanı	Ortalama Alan
Standart 1	1271916	1262789.33
	1252314	
	1264138	
Standart 2	1289584	1274621.00
	1264152	
	1270127	
Standart 3	1271275	1259838.67
	1261477	
	1246764	

Tablo 6.14. Yöntemin tekrarlanabilirliğine ilişkin veriler.

Ölçüm Sayısı	X_i	$X_{ort} - X_i$	$(X_{ort} - X_i)^2$
1	1262789.33	1265749.67-262789.33	$8.8x10^6$
2	1274621.00	1265749.67-1274621	$7.9x10^7$
3	1259838.67	1265749.67-259838.67	$3.5x10^7$
	X_{ort} = 1265749.67		$\Sigma=1.2x10^8$

$$\text{Standart Sapma} = \sqrt{\frac{\Sigma(X_{ort} - X_i)^2}{N-1}} \text{ ise Standart Sapma} = \sqrt{\frac{1.2 \times 10^8}{3-1}} \text{ ise}$$

Standart Sapma (SD) = 7823.17

$$\text{Bağıl Standart Sapma (RSD)} = \frac{\text{Standart Sapma}}{X_{ort}} \text{ x 100 ise } \text{RSD} = \frac{7823.17}{1265749.67} \text{ x 100}$$

RSD= 0.62 %

RSD'ye göre yer değiştirme reaksiyonunun etkin bir şekilde gerçekleştiği görülmektedir.

HPLC yönteminin doğruluğunu tespit etmek amacıyla 50 mgL^{-1}'lik standart için alınan absorpsiyon değerleri, analiz gününe ait kalibrasyon eğrisine ait denklem kullanılarak konsantrasyon ve buna bağlı olaraktan bağıl hata bulunmuştur.

Kalibrasyon Grafiğinin Denklemi→ y= - 8349.99 x + 1277623.84

50 mgL^{-1}'lik standart için alınan absorpsiyon ölçümü sonucu → Olçüm ortalaması = 884995

884995 =-8349.99 x + 1277623.84

X = 47.02 mg L^{-1}

$$\text{Bağıl Hata} = \frac{(\text{G.D.} - \text{D.D.})}{\text{G.D.}} \text{ x } 100$$

G.D. = gerçek değer ; D.D. = deneysel değer olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Bağıl Hata} = \frac{(50 - 47.02)}{50} \text{ x } 100$$

Bağıl Hata = % 5.96

Yöntem doğruluğu, fitik asit miktarının tayini için güvenilir bir şekilde kullanılabilir düzeydedir.

6.2.1. Numune İçersindeki Fitik Asit Miktarlarının Hesaplanması

Numune analizine geçmeden önce; çay ürünleri içerisinde bulunan kafeinin, kullanılan dalga boyunda bir girişim yapıp yapmadığını belirlemek amacıyla ayraç çözeltisi içerisine, hazırlanan kafein çözeltisi ve fitik asit standardı eklenip pik alanı değerleri ölçülmüştür. Bulunan değerlere göre çayın içerisinde bulunan kafein; demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin pik alanı değerini önemli ölçüde değiştirmediğinden çalışılan dalga boyunda bir girişim yapmadığı söylenebilir.

Numuneler içerisindeki fitik asit miktarlarının hesaplanması için ekstrakte edilen örneklere ait pik alanları ölçülerek aynı gün içerisinde oluşturulan kalibrasyon grafiği denklemi yardımıyla konsantrasyon hesabı yapılır. Örnek olması amacıyla yeşil çay numunesi için yapılan hesaplama aşağıda verilmiştir. Diğer hesaplamalar da aynı şekilde yapılmıştır.

Yeşil çay için alınan ölçüm sonuçlarında, üç ayrı ekstraktan elde edilen piklerin ortalama pik alanı alanı 158958,50 dir.

y= - 14632.25 x + 1845599.74

158958.50 = - 14632.25 x + 1845599.74

X=115.27 mg L^{-1}

1000 mL'de 115.27 mg fitik asit bulunuyorsa 3 mL çözeltide,

$$115.27\ \text{mg}\ \frac{1}{1000\ \text{mL}}\ \text{x}\ 3\ \ \text{mL} = 0.3458\ \ \frac{\text{mg}}{3\ \text{mL}}$$

0.2 mL'lik numunede ki madde miktarı, $\frac{0.3458\ \text{mg}}{3\ \text{mL}}$ x 0.2 mL = 0.0231 mg

25 mL ekstraksiyon çözeltisinde ki madde miktarı; $\frac{0.0231\ \text{mg}}{0.2\ \text{mL}}$ x 25 mL = 2.88 mg

Numuneler 1/5 oranında seyreltildiğinden dolayı örnekteki madde miktarı,
2.88 x 5 = 14.41 mg

1 g numunede ki fitik asit miktarı; $\frac{14.41\ \text{mg}}{0.5\ \text{g}}$ = 28.82 mg.g $^{-1}$ olarak bulunur.

Tablo 6.15. Tüm örneklerin HPLC ölçümü ile hesaplanan fitik asit miktarları.

Ürün Adı	**HPLC Ölçümü Sonucu mg g^{-1}**
Kabuklu fındık	9.74 ± 0.29
İç fındık	9.57 ± 0.09
Kavrulmuş fındık	7.49 ± 0.09
İç fıstık	5.79 ± 0.17
Kavrulmuş fıstık	1.54 ± 0.18
İç badem	3.69 ± 0.29
Badem	3.39 ± 0.16
Ceviz	8.74 ± 0.17
Kestane	3.83 ± 0.22
Çay yaprağı	28.33 ± 0.01
Yeşil çay	28.82 ± 0.01
Poşet yeşil çay	27.67 ± 0.01
Altınbaş çay	21.96 ± 0.10
Turist çay	21.31 ± 0.01
Filiz çay	20.49 ± 0.01
Demlenmiş çay yaprağı	29.49 ± 0.03
Demlenmiş yeşil çay	29.84 ± 0.001
Demlenmiş poşet yeşil çay	29.51 ± 0.04
Demlenmiş altınbaş çay	27.40 ± 0.02
Demlenmiş turist çay	27.39 ± 0.02
Demlenmiş filiz çay	26.53 ± 0.04

6.2.1.1. Fitik AsitinSıcaklıkla Bozunması

Demirin fitik asit ile kompleks oluşum reaksiyonu endotermik bir reaksiyondur. Kompleks oluşumu için ortama ısı verilmesi gereklidir. Ancak ısıtma sıcaklığının 50 °C'yi geçmemesi gerekmektedir. Çünkü bu sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda fitik asit gıda örneklerinden gelebilecek fitaz enzimleri tarafından parçalanarak miktarlarında önemli azalmalara neden olacaktır. Bu nedenle sıcaklığı yükseltmek yerine reaksiyon süresini arttırmak daha uygun olmaktadır.

Fitik asidin yüksek sıcaklıkla bozunmasını kontrol etmek amacıyla, hazırlanan 50 $mgL^{-1'}$ lik iki ayrı fitik asit çözeltisi 100 °C'de ve oda sıcaklığında 45'er dakika bekletildikten sonra, prosedüründe belirtildiği gibi demir(III)-tiyosiyanat çözeltisi ile muamele edilmiş ve sonuçta elde edilen çözeltinin HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 100 °C 'de 45 dakika bekletilen standart fitik asit çözeltisinin, aynı derişimdeki oda sıcaklığında bekletilen standart fitik asit çözeltisinden %6'lık bir oranda daha az miktarda fitik asit içerdiği görülmektedir. Bu durum da fitik asidin sıcaklıkla bozunduğunu kanıtlar niteliktedir.

6.2.1.2. Sabunlaşma ile basınç değişimi:

Fındık, fıstık, ceviz gibi yağlı tohumlarda bulunan yağ, kolon dolgu maddesinde tıkanmaya sebep olduğundan kolon içi basıncın artmasına, kolonun bozulmasına sebep olur. Bu sebepten dolayı yağın uzaklaştırılması gerekir. Çalışmada, İdeli ve Dost'un (2007) kullandığı metottan yararlanarak [96] sabunlaştırma işlemi sonucunda hazırlanan numuneler**,** yöntem prosedüründe belirtildiği gibi demir(III)- tiyosiyanat çözeltisi ile muamele edilmiş ve sonuçta elde edilen çözelti HPLC sistemine enjekte edilmiş ve enjeksiyon sırasında kolon basıncında düşme meydana geldiği görülmüştür. Dolayısıyla, yağ oranı yüksek örneklerde HPLC analizine geçmeden önce yağın uzaklaştırılması kolon basıncının kontrolü açısından oldukça önemlidir.

UV-Vis spektroskopisi ve HPLC ile analiz edilen çay ve kuruyemiş ürünlerindeki fitik asit miktarları Tablo 6.16'de birlikte verilmiştir.

Tablo 6.16. UV-Vis ve HPLC yöntemleri ile kuruyemiş ve çay ürünlerinde tayin edilen fitik asit miktarları.

Ürün Adı	UV-Vis Spektrofotometre Fitik Asit Miktarı, mg g^{-1}	HPLC Fitik Asit Miktarı, mg g^{-1}
Kabuklu fındık	6.95 ± 0.16	9.74 ± 0.29
İç fındık	6.55 ± 0.10	9.57 ± 0.09
Kavrulmuş fındık	3.35 ± 0.09	7.49 ± 0.09
İç fıstık	3.79 ± 0.06	5.79 ± 0.17
Kavrulmuş fıstık	2.70 ± 0.05	1.54 ± 0.18
İç badem	5.97 ± 0.01	3.69 ± 0.29
Badem	5.95 ± 0.01	3.39 ± 0.16
Ceviz	6.61 ± 0.04	8.74 ± 0.17
Kestane	2.56 ± 0.03	3.83 ± 0.22
Çay yaprağı	25.01 ± 0.02	28.33 ± 0.01
Yeşil çay	22.70 ± 0.002	28.82 ± 0.01
Poşet yeşil çay	21.68 ± 0.01	27.67 ± 0.01
Altınbaş çay	17.76 ± 0.002	21.96 ± 0.10
Turist çay	17.42 ± 0.002	21.31 ± 0.01
Filiz çay	15.89 ± 0.01	20.49 ± 0.01
Demlenmiş çay yaprağı	21.14 ± 0.01	29.49 ± 0.03
Demlenmiş yeşil çay	22.49±0.01	29.84 ± 0.001
Demlenmiş poşet yeşil çay	20.01±0.41	29.51 ± 0.04
Demlenmiş altınbaş çay	17.15 ± 0.01	27.40 ± 0.02
Demlenmiş turist çay	15.83 ± 0.02	27.39 ± 0.02
Demlenmiş filiz çay	15.68 ± 0.004	26.53 ± 0.04

Tablo 6.16'te görüldüğü gibi fitik asit miktarlarının en yüksek olduğu çay ürünleri; çay yaprağı, yeşil çay ve poşet yeşil çaydır. Bu ürünlerde HPLC ile saptanan fitik asit miktarları sırayla 28.33, 28.82 ve 27.67 $mg.g^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Buna karşın işlenmiş olan altınbaş, turist ve filiz çaylardaki fitik asit miktarları yeşil çaya nazaran daha düşük olup sırasıyla 21.96, 21.31 ve 20.49 $mg.g^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Yeşil ve siyah çaylar arasındaki fitik asit miktarları arasındaki fark % 22-26 olarak hesaplanmıştır. Buradaki farkın çay işleme prosesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yeşil ve siyah çaylardaki fitik asit miktarları, her bir değerin

standart sapmaları göz önüne alınıp değerlendirildiğinde arada çok önemli farklılıkların olmadığı düşünülmektedir. Literatürde çaylarda fitik asit miktarlarının tayini ile ilgili herhangi bir veri olmadığında değerlerin karşılaştırlması ile ilgili bir çalışma yapılamamıştır.

Kuruyemiş ürünlerindeki en yüksek fitik asiti miktarının kabuklu fındık, iç fındık ve cevizde olduğu görülmektedir. Bu ürünlerdeki fitik asit miktarları sırasıyla 9.74, 9.57 ve 8.74 $mg.g^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu ürünlerin kavrulmuş hallerindeki fitik asit miktarları beklenildiği gibi daha düşük çıkmıştır. Aradaki fark % 25'ler civarındadır. Bu durum, fitik asitin kavurma esnasında bozunduğunu göstermektedir. Aynı durum bademde de görülmektedir.

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda ceviz, badem ve fıstık örneklerinde fitik asit miktarları 16.0, 10.0 ve 6.68 $mg.g^{-1}$ [5,101] olarak bulunmuş, elde ettiğimiz veriler bu çalışmayla tutarlılık göstermektedir.

Demlenmiş çaylarda HPLC ile tayin edilen fitik asit miktarlarına bakıldığında, yeşil çaylarda çok önemli değişim olmadığı siyah çaylarda ise fitik asit miktarının arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum fitik asitin sıcaklıkla bozunduğu görüşü ile tezatlık göstermektedir. Fakat, UV-Vis sonuçları beklenilen doğrultuda fitik asitin, sıcaklıkla bozunma çalışmasında olduğu gibi % 6-15 aralığında bozunduğunu göstermektedir. HPLC sonuçlarının da benzer sonuçlar vermesi beklenirken aksi bir durum ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni, aynı seri ürünler aynı gün içerisinde ekstrakt ve analiz edildiğinden, demlenmiş çayların analizine başlanması için yaklaşık 1.5-2 saatlik bir zaman gecikmesi olmaktadır. Bu zaman gecikmesi süresinde demir(III)-tiyosiyanat kompleksinin bir miktar bozunduğu düşünülmektedir. Bu durumla tekrarlanabilirlik çalışmasındada karşılaşılmıştır. Her bir enjeksiyon sonunda demir(III)-tiyosiyanat pikinin pik alanında düşme gözlemlenmiştir. Siyah çayda ise demir(III)-tiyosiyanatın bozunmasının yanında bekleme ile çayın rengindeki koyulaşmanın da etkili olduğu düşünülmektedir.

Bundan dolayı demleme çayların tayini için UV-Vis yönteminin daha doğru sonuçlar verdiği görülmektedir. Diğer bir hususda HPLC analizlerinin ekstraksiyondan hemen sonra beklemeden yapılması önem arz etmektedir.

Çay ve kuruyemiş örneklerindeki fitik asit miktarlarının UV-Vis spektroskopi ve HPLC yöntemleri ile hesaplanan sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında, iki yöntemde elde edilen değerler kabul edilebilir düzeyde birbirleri ile uyum içerisindedir. Bazı sonuçlar arasındaki fark oldukça yüksek ve dolayısıyla hata oranıda yüksek gözükmektedir. Bunun nedeni, HPLC analizlerinin UV-Vis analizlerinden sonra yapılmasından kaynaklanan zaman gecikmesi ve bu

süre içerinde demir(III)-tiyosiyanat kompleksindeki bozunma olarak düşünülebilir. Sonuçlar, HPLC yönteminin tekrarlanabilirlik ve duyarlık bakımından UV-Vİs yöntemine göre üstünlük sağladığını göstermektedir. Fakat elde edilen sonuçlar doğrultusunda, doğruluk bakımında UV-Vis yöntemi üstünlük sağlamaktadır. Bu durum analizlerin ekstraksiyondan hemen sonra yapılması ile çok rahatlıkla giderilebilecektir.

6.3. SONUÇ

Uygulanan HPLC çalışması 2,8 dak gibi kısa bir analiz süresi içermesi, mutlak hatasının ve RSD değerinin düşük oluşu ve ayrıca UV-Vis spektroskopi yöntemi sonuçlarının HPLC sonuçlarını desteklemesiyle, HPLC yönteminin çay ve kuruyemiş ürünlerindeki fitik asit tayinleri için kabul edilebilir bir uygulama olmuştur.

HPLC ile elde edilen sonuçlara göre değerlendirme yapıldığında, en fazla fitik asit içeren ürünlerin yine UV-Vis spektroskopisi yönteminde olduğu gibi çay yaprağı olduğu görülmektedir. HPLC yöntemi hesaplanan çay yapraklarındaki fitik asit miktarları 27.65 - 28.33 $mg.g^{-1}$, aynı ürünlerin UV-Vis analizlerinde ise 21.7- 25.15 $mg.g^{-1}$olarak bulunmuştur. Siyah çaylarda fitik asit miktarları HPLC ile 20.49– 21.96 $mg.g^{-1}$, UV-Vis ile 15.89-17.76 $mg.g^{-1}$. Kuruyemiş ürünlerinde ise en yüksek fitik asit miktarı hem HPLC hem de UV-Vis ile kabuklu findikta görülmüştür. Diğer ürünlerdeki fitik asit miktarları Tablo 6.16'de görülmektedir. Her ne kadar, fitik asit miktarları HPLC'de UV-Vis'e göre bir miktar yüksek çıksada, fitik asit miktarları artış ve azalış bakımından parallelik göstermektedirler.

Çiğ badem ve kavrulmuş bademdeki fitik asit miktarları karşılaştırıldığında, kavrulan bademdeki fitik asit miktarı, çiğ badem örneklerinin miktarının altında bulunmuş ve pişirme etkisiyle fitik asit miktarının azaldığını ortaya koymuştur. Aynı şekilde çay yaprağının işlenmesiyle elde edilen çay ürünlerinde, çay yaprağına göre daha düşük miktarda fitik asit bulunması; fitik asitin, mekanik ve ısısal işlemlere uğratıldığında bozunduğunu kanıtlar niteliktedir.

Literatür verileri, uygulanan UV-Vis ve HPLC yönteminden elde edilen verilerin birbirleriyle tutarlı olması, uygulanan HPLC prosedürünün de fitik asit analizleri için kullanılabilir olduğunu doğrulamaktadır.

Çay ürünleri içersinde bulunan kafeinin, fitik asit tayini üzerinde etkisini araştırmak için yapılan çalışmada kafeinin kullanılan dalga boyunda bir girişim yapmadığını göstermiştir.

Kafeinin metal iyonlarıyla bağlanmasını inceleyen bir çalışmada da demir ve kafeinin çok düşük oranda kompleks yaptığı belirtilmiştir [102].

Çay yaprağının fitik asit miktarının saptanması, fitik asitin böbrek taşı oluşumuna karşı engelleyici bir etki göstermesinden dolayı, insan sağlığına yararıyla tıp alanında ilaç sanayisinde kullanılabilir.

Bazı yazarlar fitik asitin antibesinsel faktörlerini nitelendirirken bazıları da fitik asitin tedavi amacıyla kullanılabileceğini savunmuştur. Sonuç olarak çalışma, toplumca çok sık rastlanan çay ve kuruyemiş ürünleri tüketimi için bir rehber olabilir.

KAYNAKLAR

1. Gargari, B.P., Mahboob,S., Razavieh,S.V., Content of Phytic Acid and its Mole Ratio to Zinc in Flour and Breads Consumed in Tabriz, Iran, *Food Chemistry*, 100, 1115-1119,2007.

2. Zhang, H., Yang,Q., Lin, H.,Ren, X., Zhao,L., Hou, J., Phytic Acid Enhances Biocontrol Efficacy of Rhodotorula Mucilaginosa Against Postharvest Gray Mold Spoilage and Natural Spoilage of Strawberries, *Food Science and Technology*, 52, 110-115, 2013.

3. Coulibaly A.,Kouakou,B., Chen,J., Phytic Acid in Creal Grains: Structure, Healty or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutrional Quality, *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology*, 1, 1-22, 2011.

4. Erkek,R., Ünlü, H.B., Fitaz Enziminin Etlik Piliçlerin Beslenmesinde Kullanımı, *Hayvansal Üretim*,44(2), 10-19, 2003

5. Bayraktar, A., Akbulut,G., Dibetes Mellitus'un Tıbbi Beslenme Tedavisinde Fitik asit: Faydalı mı? Zararlı mı?, *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2,150-168, 2013.

6. Garcia-Estapa,R.,M., Guerra-Hernandez,E.,Garcia-Villanova, B., Phytic acid content in milled cereal products and breads, *Food Research International*, 32, 217-221,1999.

7. Lasztity, R., Lasztity, L., Phytic acid in cereal technology In Advances in Cereal Science and Thechnology 10, Pomeranz, Y., Ed, American Association of Cereal Chemist Publ., St. Paul, MN, Chapter 5, 309-360, 1990.

8. Ozkaya, B., Ekmeğin Fitik Asit Miktarına Çeşit ve Ekstraksiyonunun Etkisi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, no:2002-07-11-064, 2004.

9. Oğuz, A., Bazı Çerez ve Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri, Gazi Osmanpaşa Ünversitesi,Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2008.

10. Plaami, S., Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Food and Effect in Nutrition, *LWT-Food Science and Technology*, Review Article, 30(7), 633-647,1997.

11. Graf, E., Eaton, J.W., Antioksidant Functions of Phytic Acid, *Free Radical Biology and Medicine,* Review Article 8, 61-69,1990.

12. Philippy, B.Q., Lin, M., Rasco, B., Analysis of Phytate in Raw and Cooked Patatoes, *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 217-226,2004.

13. Muraoka, S., Miura, T., Inhibition of Xanthine Oxidase by Phytic Acid and its Antioksidative Action, *Life Siciences*, 74, 217-226,2004.

14. Shamsuddin, A.,M.,Anticancer Function of Phytic Acid, *İnternational Journal of Food Science and Technology*, 37, 769-782, 2002.

15. Minihane, A.,M., Rimbach, G., Iron Absorption and the Iron Binding and the Iron Binding and Antioksidant-Properties of Phytic Acid, *İnternational Journal of Food Science and Technology*, 37, 741-748,2002.

16. Norhaizan, M.E., Faizadatul A., Determination ofPhytate, Iron, Zinc, Calcium Contents and Their Molar Ratios in Commonly Consumed Raw and Prepared Food in Malaysia,*Malaysian Journal of Nutrition*, 15(2), 213 - 222, 2009.

17. Wu, P., Zhao, T., Tian, J., Phytic Acid Contents of Wheat Flours from Different Mill Streams, *Agricultural Sciences in China*, 9(11), 1684-1688, 2010.

18. March, J.G., Simonet, B.M., Grases, F., Determination of Phytic Acid by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy: Application to Biological Samples, *Journal of Chromatography B*, 757, 247-255, 2001.

19. Ohkawa, T., Ebisuno, S., Kitagawa, M., Morimoto, S., Miyazaki, Y.,Yasukawa,S., Rice Bran Treatment for Patients with Hypercalciuric Stones : Experimental andClinical Studies, *The Journal of Urology*, 132, 1140-1145, 1984.

20. Grases, F., Perello, J., Isern, B., Prieto, R.M., Determinationof Myo-Inositol Hexakisphosphate (Phytate) in Urine by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, *Analytica Chimia Acta*,510, 41-43, 2004.

21. March, J., Simonet, B., M., Grases, F., Salvador, A., Indirect Determination of Phytic Acid in Urine, *Analytica Chimia Acta*, 367, 63-68, 1998.

22. Dost, K., Tokul, O., Determination of Phytic Acid in Wheat and Wheat Products by Revers Phase High Performace Liquid Chromatography, *Analytical Chimica Acta*, 558, 22-27, 2006.

23. Angel, R., Tamim, N.M., Applegate, T.J., Dhandu, A.S., Ellestad, L.E., Phytic Acid Chemistry: Influence on Phytin-phosphorus Availability and Phytase Efficacy, Journal of Applied Poultry Research, 15(4), 471-480, 2002.

24. Oatway,L., Vasanthan, T., Helm, J.H., Phytic Acid, *Food Reviews International*, 17(4), 419-431,2001.

25. Viskari, P.J., Colyer, C.I., Seperation and Quantitation of Phycobiliproteins Using Phytic Acid in Capilary Electrophoresis with Laser-Incuded Florescence Detection, *Journal of Chromatography A*, 972, 269-276,2002.

26. Xu, P., Price, J., Aggett, P.J., Recent Advances in Methodology for Analysis of Phytate and Inositol Phosphates in Foods, *Progress in Food and Nutrition Science*, 16, 245-262,1992.

27. Chen, Y., Chen, J., Ma, K., Cao, S., Chen, X., Fluorimetric Determination of Phytic Acid in Urine Based on Replacement Reaction, *Analytica Chimica Acta*, 605,185-191,2007.

28. Çay, P.,Kepekli Ekmeğin Fitik Asit Miktarına Prosesin Etkisi, Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi,Ankara, 2008.

29. Neevel, J.G., Phytate: A Potential Conservation Agent for the Treatment of İnk Corrosion Caused By Irongall Inks, *Restaurator*, 16, 143-159, 1995.

30. Zhou, J.R., Erdman, J.W., 1995,. Phytic acid in Health and Disease, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(6), 495-508,1995.

31. Park, H., Ahn, H., Kim, S., Lee, C., Byun, M., Lee, G., Determination of the Phytic Acid Levels in İnfant Foods Using Different Analitical Methods, *Food Control*, 17, 727-732, 2006.

32. Yılmaz, G., Sezgin, Ü.S., Durum Buğday ve Ürünlerinin Fitik Asit Miktarı ve İşleme ile Meydana Gelen Değişmeler, Makarnalık Buğday ve Mamülleri Sempozyumu, Ankara Üniversitesi FBE, 1992.

33. Bilgiçli, N., Tarhananın Fitik Asıt İçeriği ve Bazı Besin Öğeleri Üzerine Maya, Malt ve Fitaz Katkılarının Etkileri, Selçuk Üniversitesi, Doktora Tezi,Konya, 2004.

34. Ozkaya,H., Buğday Kepeğinin Definizasyonu İçin Uygun Yöntemin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, no:2002-07-11-062, 2004.

35. Yanga, C., Hsua, C., Tsaia, M., Effect of Crosslinked Condition on Characteristics of Chitosan/Tripolyphosphate/Genipin Beads and Their Application in the Selective Adsorption of Phytic Acid From Soybean Whey, *Carbohydrate Polymers*, 86, 659-665, 2011.

36. Ertaş, N., Akay, A., Farklı Çinko Seviyelerinin Nohutun Fitik Asit Miktarına Etkisi, Türkiye 10. Gıda Kongresi 21-23 Mayıs, Erzurum, 2008.

37. Söğüt, A., Sroyler Rasyonlarına Katılan Fitaz enzimi ve Sitrik Asidin Verim Performansı, Bazı Kan ve Kemik Mineral Düzeyleri İle Tibial Diskondraplazi Üzerine Etkisi, Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, Ankara, 2008.

38. Jongbloed, A.W., Kemme, P.A.,Van Der Klis, J.D., The İmpact of Microbiyal Phytase on the Nutrition of Monogastrics and the Environment, *Ciheam*, 26, 135-147, 1997.

39. Güngör, İ., Fitik AsitBeslenmeye Etkisi, *Gıda*, 29(6), 405-409, 2004.

40. Graf E., Eaton J.W., Effects of Phytate on Mineral Bioavailability In Mice. *Journal of Nutrition*, 114, 1192-1198, 1984.

41. Forbes R.M., Parker H.M., Erdman J.W., Effects of Dietary Phytate, Calcium and Magnesium Levels on Zinc Bioavailability to Rats,*Journal of Nutrition*, 114, 1421-1425, 1984.

42. Shi J., Arunasalam K., Yeung D., Kakuda Y., Mittal G., Phytate From Edible: Chemistry, Processing and Health Benefits, *Journal of Food Science*,7, 67-78, 2004.

43. Samsuddin A.M., Inositol Phosphates Have Novel Anticancer Function. *Journal of Nutrition*, 125, 725-732, 1995.

44. Harland B.F., Morris E.R., Phytate: a Good or Bad Food Component,*Nutrition Research*, 15,733-754, 1995.

45. Obata. T., Phytic Acid Supresses 1-methyl-4phenylpyridinium Ion-Induced Hydroxyl Radical Genaration in Rat Striatum, *Brain Research*, 978, 241-244,2003.

46. Evans, W.J., Martin, C.j., The Intreactions of Inositol Heexakisphosphate with Fe(III) and Cr (III), A Calorimetric İnvestigation XV, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 41, 245-252, 1991.

47. Uppström,B., Svensson, R., Determination of Phytic Acid in Rapesseed Meal, *Journal of Science Food Agricultural*, 31, 651-656,1980

48. Talamond, P., Galon, G., Treche,S., Rapid and Sensitive Liquid Chromatographic Method Using a Conductivity Detector for Determination of Phytic Acid İn Food, *Journal of Chromatography A*, 805,143-147,1998.

49. Duffin, P.A., The Effect of Phytate on Mineral Bioavailability and Hevavy Metal Contaminants, University of Surrey, 1989.

50. Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, Böbrek ve İdrar Yolu Taşları, www.tyih.gov.tr/TR,4162/bobrek-ve-idrar-yollari-taslari.html, Ocak 2014,

51. Pieras, E., Costa-Bauza, A., Ramis, M., Grases, F., Papillary and Nonpapillary Calcium Oxalate Monohydrate Renal Calculi: Comparative Study of Etiologic Factors, *The scientific World Journal*, 6, 2411-2419,2006.

52. www.kimyamuhendisi.com/Kalsiyum Oksalat Kristalizasyonu, Ocak 2014.

53. Tokul, Ö., Doğal Ürünlerde Fitik Asit (inositol Hegza Fosforik Asit) Analizleri, Celal Bayar Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Manisa, 2005.

54. Taylor, E.N., Curhan, G.,C., Role Of Nutrıtıon In The Formation Of Calcium-Containing Kidney Stones,*Nephron Physiol*, 98,55–63, 2004.

55. Grases, F., Isern,B., Sanchis, P.,Perello, J., Phytate Acts As An İnhibitor in Formation of Renal Calculi, *Frontiers in Bioscience,* 12, 2580-2587, 2007.

56. Kızılyer. A.,Matriks GLA Protein (MGP) Geni Çokyapılılığının Böbrek Taşı Hastalarında Araştırılması, Gaziantep Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi,Gaziantep, 2007.

57. Grases, F., García-Ferragut, L., Costa-Bauzá,A., Development of Calcium Oxalate Crystals on Urothelium: Effect of Free Radicals, *Nephron*,;78, 296-301, 1998.

58. Schafer, G., Schenk, U., Ritzel, U., Ramadori, G., Leonhardt U., Comparison of the Effect of Dried Peas with Those of Potatoes in Mixed Meals on Postprandial Glucose and Insulin Concentrations in Patients with Type 2 Diabetes, *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 99-103, 2003.

59. Yoon J.H., Thompson L.U., Jenksin D.J.A., The Effect of Phytic Acid on in Vitro Rate of Starch Digestiblity and Blood Glucose Response. American Journal of Clinical Nutrition, 38, 835-842, 1983.

60. Shi J., Arunasalam K., Yeung D., Kakuda Y., Mittal G., Phytate From Edible: Chemistry, Processing and Health Benefits, Journal of Food Science, 7, 67-78, 2004.

61. Rounds, M.A., Nielsen, S.S., Anion Exchange High Performance Liquid Chromatography with Post-Column Detection for Analysis of Phytic Acid and Other Inositol Phosphates, *Journal of Chromatography A*, 653, 148-152, 1993.

62. Jariwalla, R.J., Sabin, R., Lawson, S. and Herman, Z.S., Lowering of Serum Cholesterol and Triglycerides and Modulation of Divalent Cations by Dietary Phytate, *Journal of Applied Nutrition*, 42,18-28, 1990.

63. Brigaud, A.B., Dange, C., Fauconnier, N., Gerard, C., ^{31}P NMR, Potentiometric and Spectrophotometric Studies of Phytic Acid Ionization and Complexation Properties Toward Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , $Zn^{'2}$, and Cd^{+2}, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 75, 71-78, 1999.

64. Ekholm,P., Virkki, L., Ylinen, M., Johansson, L., The Effect of Phytic Acid and Some Natural ChelatingAgent on TheSolubility ofMineral Elements in Oat Bran, *Food Chemistry*, 80, 165-170, 2003.

65. Hambidge, M., Miller, L., Westcott, J., Sheng, X., Krebs, N., Zinc Bioavailability and Homeostasis, Journalof Clinical Nutrition, 91, 1478–1483,2010.

66. Sandberg, A.S., Larsen, T., and Sandstrom B.,High Dietary Calcium Level Decreases Colonic Phytate Degradation in Pigs Fed a Rapeseed Diet, *Journal of Nutrition*, 123, 559-566, 1993.

67. Reddy, N.R., Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K., Phytates in Legumes and Cereals,*Advances in Food Research*, 28, 1-92, 1982.

68. Hussain, R., Patwardhan, V.N.,The İnfluence of Phytate on the Absorption ofİron, Indian Journalof Medical. Research, 47, 676-682,1959.

69. Food Phytates,Reddy, N.R. and Sahte, S.K., Ed., CRC Press, New York, p257, 2002.

70. Özkaya, B., Fitik Asit ve Tahıl Ürünlerindeki Önemi, Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi, 3-4 Kasım, Gaziantep, 2002.

71. Türkmen, N., Farklı Sınıf Çaylarda Kıvırma Proseslerinin ve Değişik Hasat Dönemlerinin Çayın Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşimine Etkisi, Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, Ankara, 2007.

72. L., Yao, X., Liu, Y., Jiang, N., Caffin, B., D'Arcy, R., Singanusong, N., Datta, Y., Xu, Compositional Analysis of Teas from Australian Supermarkets, *Food Chemistry,* 94, 115-122, 2006.

73. Khatiwada, J.,Verghese, M., Walker, L.T., Shackelford, L.,Chawan, C.B., Sunkara, R., Combination of Green Tea, Phytic Acid, and İnositol Reduced the İncidence of Azoxymethane-İnduced Colon Tumors in Fisher 344 male rats, *LWT*, 39, 1080–1086, 2006.

74. Ju, J., Lu, G.,Lambert,J., Yang,C., Inhibition of Carcinogenesis by Tea Constituents, *Seminars in Cancer Biology*, 17, 395–402, 2007.

75. Çelik., F., Çay (Camellia sinensis); İçeriği, Sağlık Üzerindeki Koruyucu Etkisi ve Önerilen Tüketimi, *Türkiye Klinikleri Journalof Medical Sciences*, 26, 642-648,2006.

76. www.caykur.gov.tr/Caykur/2/19/72/cay-uretimi.aspx, Kasım 2013.

77. www.ulusalcaykonseyi.org.tr,Karaca,E., Yeşil çay**,** Şubat 2014.

78. Çalıkoğlu, E., Bayrak,A., Siyah Çayda Aroma Maddelerinin Oluşumu, *Gıda* ,33, 137-142, 2008.

79. Khanchi, A.R., Mahani, M.,K., Hajihosseini, M., Maragheh, M.,G., Chaloosi, M., Bani, F., Simultaneous Spectrophotometric Determination of Caffeine and Theobromine in Iranian Tea by Artificial Neural Networks and Its Comparison with PLS, *Food Chemistry*, 103,1062-1068,2007.

80. Zuo,Y., Chen, H., Deng, Y., Simultaneous Determination of Catechins,Caffeine and Gallic Acids in Green, Oolong, Black and Puerh Teas Using HPLC with a Photodiode Array Detector,*Talanta*, 57, 307-316, 2002.

81. Khokhar, S., Magnusdottir,S., Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50,565-570,2002.

82. Fisunoğlu, M., Besler, H.T., Çay ve Sağlık İlişkisi ,Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Şubat 2008.

83. Naheed,Z., Barech, A.R.,Sajid,M., Effect of Rolling, Fermentation and Drying on the Quality of Black Tea, *Sarhad Journal of Agriculture*, 23, (3), 2007.

84. Erturan, İ., Baysal, V., Çay ve Deri, T Klin J Dermatol, 14:55-60,2004.

85. Jian, L., Xie, L.,P., Lee, A.,H., Binns, C.,W., Protective Effect of Green Tea Against Prostate Cancer: A Case-Control Study in Southeast China, Int J Cancer, 108**:**130-5, 2004.

86. Allessio, H.,M., Hagerman, A., E., Romanello, M., Consumption of Green Tea Protects Rats From Exercise Induced Oxidative Stres in Kidney and Liver, Nutrition Research, 22:1177-88,2002.

87. http://www.nutrition-and-you.com/nuts_nutrition.html, Ocak 2014.

88. Rainey,C., Nyquist, L., Nuts – Nutrition and Health Benefits of Daily Use, Nutrition Today, 32,157–163,1997.

89. Yang, J., Liu, R., Halim, L., Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Edible Nut Seeds, Food Science and Technology, 42,1, 1-8, 2009.

90. Prineas, R.J., Kushi, L.H., Folsom, A.R., Bostick, R.M., Wu, Y., Walnuts and Serum Lipids, The New England Journal of Medicine, 329, 359–360, 1993.

91. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 4026-4037,2004.

92. Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D. ,Bonanome, A., Coval, S.M. et al., High-Monounsaturated Fatty Acid Diets Lower Both Plasma Cholesterol and Triacylglycerol Concentrations, American Journal of Clinical Nutrition, 70, 1009–1015,1999.

93. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., 1998. Principles of Instrümental Analysis, fifth edition, In: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık Ankara, 1998.

94. Gündüz T., İnstrümental Analiz, Altıncı Baskı, Gazi Kitapevi Ankara, 2002

95. Skoog D.A., West D.M. , Holler F.J., Fundamentals of Analytical Chemistry, In: Kılıç E., Köseoğlu F. seventh edition, Analitik Kimya Temelleri, Bilim Yayıncılık Ankara, 1999

96. İdeli, C., Bazı Gıda Maddeleri ve Bitkisel Yağlarda Poliaromatik Hidrokarbonların (PAH) Analizleri, Celal Bayar Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 2007.

97. Aydın.Z., Çeşitli Örneklerde Vanadyum HPLC-AAS ile Türlemesi ve Arsenik Tayini, Erciyes Üniversitesi, Doktora Tezi, 2009.

98. Özcimder, M., Demirci, A., Gaz ve Sıvı Kromatografileri, Kırıkkale,2004.

99. Henden E., Gökçel İ. , Ertaş N., Eser Analiz Yaz Okulu, İzmir, 25-29 Haziran 2001.

100. Camire , A. L., Clydesdale, F. M., 1982. Analysis of Phytic Acid in Food by HPLC, *Journal of Food Science*, 47: 575-578, 1982.

101. Chen, Qingchuan, Determination of Phytic Acid and Inositol Pentakisphosphates in Foods by High-Performance Ion Chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 52, 4604-4613, 2004.

102. Kolaylı, S., Ocak, M., Küçük, M., Abbasoğlu, R., Does Caffeine Bind the Metal Ions?, *Food Chemistry*, 84, 383-388, 2004.

ÖZ GEÇMİŞ



ADI SOYADI: Gülçin KARACA

DOĞUM YERİ VE TARİHİ:İzmir**-** 22.02.1988

EĞİTİM DURUMU:

2002-2006: Çimentaş Lisesi (YDA)

2007-2011: Celal Bayar Üniversitesi - Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

2010- 2012: Celal Bayar Üniversitesi- Pedagojik Formasyon Eğitimi

2011-2014: Celal Bayar Üniversitesi- Fen Bilimleri Enstitüsü- Analitik Kimya

İLETİŞİM:

e-mail: gulcinkaraca@yandex.com