

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RENKLİ MATERYALLERDE ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C)'İN
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ**

ÖZNUR DÜLGER

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ANORGANİK KİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MAHMURE ÜSTÜN ÖZGÜR**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENKLİ MATERYALLERDE ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C)'İN
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ**

Öznur DÜLGER tarafından hazırlanan tez çalışması 19.07.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anorganik Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

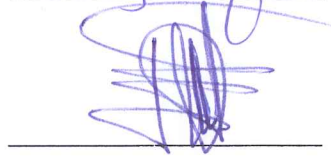
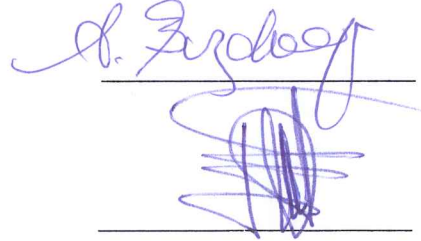
Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Abdürrezzak EMİN BOZDOĞAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Erol ERÇAĞ
İstanbul Üniversitesi



ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR'e;

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Araş. Gör. Dr. Fatma TURAK'a;

Manevi desteğiyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşım Müge GÜLELİ'ye;

Yaşamım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz, 2012

Öznur DÜLGER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTIMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiv
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	1
1.3 Bulgular.....	2
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ.....	4
2.1 Vitaminler.....	4
2.1.1 Vitaminlerin Keşfi.....	6
2.1.2 Vitaminlerin Önemi.....	8
2.1.3 Vitaminlerin Adlandırılması.....	10
2.1.4 Vitaminlerin Sınıflandırılması.....	11
2.1.5 Yağda Çözünen Vitaminler.....	11
2.1.6 Suda Çözünen Vitaminler.....	12
2.2 Askorbik Asit (Vitamin C).....	14
2.2.1 Askorbik Asidin Tarihçesi.....	15
2.2.2 Askorbik Asidin Genel Özellikleri.....	16
2.2.3 Askorbik Asidin Fiziksel Özellikleri.....	17
2.2.4 Askorbik Asidin Kimyasal Özellikleri.....	17
2.2.5 Askorbik Asidin Sentezi.....	18

2.2.6	Askorbik Asidin Metabolizması	19
2.2.7	Askorbik Asidin Fonksiyonları	20
2.2.8	Askorbik Asit Kaynakları	22
2.2.8.1	Bitkisel Askorbik Asit Kaynakları	22
2.2.8.2	Hayvansal Askorbik Asit Kaynakları	22
2.2.9	Askorbik Asidin Kullanım Alanları	24
2.2.10	Askorbik Asidin Vücuttaki Rolü	25
2.2.10.1	Metabolizmadaki Rolü	25
2.2.10.2	Farmakolojik Etkisi	25
2.2.10.3	Bilinen Bazı Fonksiyonları	25
2.3	Askorbik Asidin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	28
2.3.1	Askorbik Asit ve Kanser	28
2.3.2	Askorbik Asit ve Ateroskleroz	28
2.3.3	Askorbik Asit ve Yaraların İyileşmesi	28
2.3.4	Askorbik Asit ve Soğuk Algınlığı	28
2.3.5	Askorbik Asit ve Skorbüt	29
2.3.6	Askorbik Asit ve Hamilelik	29
2.3.7	Askorbik Asit ve Alzheimer Hastalığı	29
2.4	Askorbik Asidin Tanınması ve Tayin Yöntemleri	30
2.4.1	Tanınma Yöntemleri	30
2.4.2	Miktar Tayin Yöntemleri	31
2.4.2.1	Titrimetrik Yöntemler	31
2.4.2.2	Elektrokimyasal Yöntemler	34
2.4.2.3	Kemilüminesans Yöntemler	35
2.4.2.4	Kinetik Yöntemler	36
2.4.2.5	Florimetrik Yöntemler	36
2.4.2.6	Diğer Tayin Yöntemleri	37
2.4.2.7	Farmakolojide Kullanılan Yöntemler	37
2.4.3	Meyve ve Sebzeler İçin Kullanılan Yöntemler	38

BÖLÜM 3

ARAŞTIRMA ÇALIŞMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER HAKKINDA

GENEL BİLGİLER	40
3.1 Türev Spektroskopisi	40
3.1.1 Türev Spektroskopisi Hakkında Genel Bilgi	40
3.1.2 Spektroskopide Kullanılan Çözücüler	41
3.1.3 Ultraviyole Spektroskopisinde Absorpsiyon Değerleri	42
3.1.4 Silit Aralığının Spektruma Etkisi	42
3.1.5 Ultraviyole Spektroskopisinden Sağlanan Yararlar	43
3.1.5.1 Kalitatif Analiz	43
3.1.5.2 Kantitatif Analiz	43
3.1.5.3 Molekül Ağırlığı Tayini	45
3.2 Türev Spektroskopisi Yöntemi	45
3.2.1 Türev Spektrumunun Alınması	46
3.2.2 Türev Spektrumuna Etki Eden Faktörler	48
3.2.3 Türev Spektrumunun Değerlendirilmesi	48
3.2.4 Türev Spektroskopisinin Uygulama Alanları	50
3.2.5 Türev Spektroskopisinin Avantajları Dezavantajları	51

3.3	Fark Yöntemi	52
3.4	Modifiye Spektrofotometrik Yöntem	53
3.4.1	İlke	54
3.4.2	Standardizasyon	54
3.4.3	Tanık Deneme	55
3.4.4	Numunenin Titrasyonu	55
3.5	Yöntem Doğrulaması	56
3.5.1	Özgünlük	56
3.5.2	Doğrusallık	57
3.5.3	Konsantrasyon Aralığı	57
3.5.4	Doğruluk	57
3.5.5	Keskinlik	58
3.5.6	Deteksiyon Limiti	58
3.5.7	Kantitatif Tayin Aralığı	58
3.6	Numune Hazırlama	59

BÖLÜM 4

KULLANILAN CİHAZLAR VE MADDELER	62
4.1 Kullanılan Cihazlar	62
4.2 Numunelerin Hazırlanması	62

BÖLÜM 5

DENEYSEL ÇALIŞMA	63
5.1 Kullanılan Çözeltiler	63
5.2 Numunelerin Hazırlanması	64
5.2.1 Meyve ve Sebze Numunelerinin Hazırlanması	64
5.2.2 Meyvesuyu Numunelerinin Hazırlanması	64
5.2.3 Gazlı İçecek Numunelerinin Hazırlanması	65
5.2.4 Toz İçecek Numunelerinin Hazırlanması	65
5.2.5 Farmasötik Numunelerin Hesaplanması	65
5.2.6 Bebek Maması Numunesinin Hazırlanması	65
5.2.7 Şeker Numunesinin Hazırlanması	66
5.3 Yöntemlerin Uygulanması	66
5.3.1 Türev Spektrofotometrik Yöntem	66
5.3.1.1 Ekstraksiyon	66
5.3.1.2 Spektrumların Çizilmesi	66
5.3.1.3 Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	66
5.3.1.4 Ölçüm	67
5.3.1.5 Validasyon Çalışmaları	69
5.3.2 Fark Yöntem	69
5.3.2.1 Spektrumların Çizilmesi	69
5.3.2.2 Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	70
5.3.2.3 Ölçüm	70
5.3.2.4 Validasyon Çalışmaları	72
5.3.3 Modifiye Spektrofotometrik Yöntem	73
5.3.3.1 Spektrumların Çizilmesi	73
5.3.3.2 Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması	73
5.3.3.3 Ölçüm	74

BÖLÜM 6

BULGULAR.....	77
6.1 Türev Spektrofotometrik Yöntem.....	77
6.1.1 Askorbik Asit Tayini için Uygun Koşulların Saptanması.....	77
6.1.2 Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini.....	79
6.1.2.1 Ekstraksiyon.....	79
6.1.2.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı biber, Çilek, Kızılcık) Askorbik Asit Tayini.....	80
6.1.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı, Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini.....	84
6.1.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma Mandalina C Plus, Sırma Limom C plus) Askorbik Asit Tayini.....	88
6.1.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne, Tang Limon) Askorbik Asit Tayini.....	91
6.1.6 Farmasötik (Aspirin Plus C, Redoxor) Numunelerde Askorbik Asit Tayini.....	94
6.1.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini.....	97
6.1.8 Şekerde (Kent Olips Portakal&Limon) Askorbik Asit Tayini.....	99
6.2 Fark Yöntemi.....	101
6.2.1 Askorbik Asit Tayini için Uygun Koşulların Saptanması.....	101
6.2.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı biber, Çilek, Kızılcık) Askorbik Asit Tayini.....	102
6.2.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı, Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini.....	104
6.2.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma Mandalina C Plus, Sırma Limom C plus) Askorbik Asit Tayini.....	106
6.2.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne, Tang Limon) Askorbik Asit Tayini.....	108
6.2.6 Farmasötik (Aspirin Plus C, Redoxor) Numunelerde Askorbik Asit Tayini.....	109
6.2.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini.....	111
6.2.8 Şekerde (Kent Olips Portakal&Limon) Askorbik Asit Tayini.....	112
6.3 Modifiye Spektrofotometrik Yöntem.....	113
6.3.1 Askorbik Asit Tayini için Uygun Koşulların Saptanması.....	113
6.3.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı biber, Çilek, Kızılcık) Askorbik Asit Tayini.....	114
6.3.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı, Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini.....	116
6.3.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma Mandalina C Plus, Sırma Limom C plus) Askorbik Asit Tayini.....	118
6.3.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne, Tang Limon) Askorbik Asit Tayini.....	120
6.3.6 Farmasötik (Aspirin Plus C, Redoxor) Numunelerde Askorbik Asit Tayini.....	121
6.3.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini.....	123
6.3.8 Şekerde (Kent Olips Portakal&Limon) Askorbik Asit Tayini.....	124

6.4	Askorbik Asit Analizi İçin Numunelere Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	125
6.4.1	Meyve ve Sebze Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	125
6.4.2	Meyvesuyu Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	129
6.4.3	Gazlı İçecek Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	133
6.4.4	Toz İçecek Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	136
6.4.5	Farmasötik Numunelere Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	139
6.4.6	Bebek Maması Numunesine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	142
6.4.7	Şeker Numunesine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması	143
6.5	Validasyon Çalışmaları	145

BÖLÜM 7

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	146
KAYNAKLAR	150
ÖZGEÇMİŞ	157

SİMGE LİSTESİ

ϵ	Epsilon
A	Absorbans
1D	Birinci derece türev absorbans değeri

KISALTMA LİSTESİ

CV	Varyasyon Katsayısı (Coefficient of variation)
DCIP	Diklorofenolindifenol
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein (High-density lipoprotein)
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low-density lipoprotein)
LOD	Gözlenebilme sınırı (Limit of Detection)
LOQ	Kantitatif derişim sınırı (Limit of Quantation)
OPD	Ortofenildiamin (Orthophenyldiamine)
RSD	Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)
TLC	İnce Tabaka Kromatografi (Thin Layer chromatography)
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 L-Askorbik asit (Açık Formülü)	14
Şekil 2.2 Askorbik asidin izomerleri	15
Şekil 2.3 Askorbik asidin oksidasyon reaksiyonu	18
Şekil 2.4 Askorbik asidin sentez reaksiyonu	19
Şekil 2.5 2,6 diklorofenolindofenol'ün kullanıldığı yöntem	32
Şekil 2.6 N-bromosüksinimid'in kullanıldığı yöntem	32
Şekil 2.7 Luminolün Kemilüminesans Reaksiyonu	36
Şekil 3.1 Spektrumun slit aralılıklarına bağlılığı	42
Şekil 3.2 Çeşitli şekillerdeki Gauss Diyagramlarının türev spektrumları	47
Şekil 3.3 Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi	49
Şekil 6.1 Askorbik asit standart çözeltilerinin (2-10mg.L ⁻¹) absorpsiyon spektrumları	76
Şekil 6.2 Askorbik asit standart çözeltilerinin (2-10mg.L ⁻¹) 1.türev spektrumları	77
Şekil 6.3 (a) Kırmızı biber ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Kırmızı biber ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	80
Şekil 6.4 (a) Çilek ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Çilek ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	81
Şekil 6.5 (a) Kızılcık ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) kızılcık ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	82
Şekil 6.6 (a) Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	84
Şekil 6.7 (a) Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	85
Şekil 6.8 (a) Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. türev spektrumları	86
Şekil 6.9 (a) Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları, (b) Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve askorbik asit çözeltilerinin 1. Türev spektrumları	88

Şekil 6.10	(a) Sırma C Plus Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Sırma C Plus Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları	89
Şekil 6.11	(a) Tang Vişne ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tang Vişne ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları	91
Şekil 6.12	(a) Tang Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tang Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları	92
Şekil 6.13	(a) Redoxor Çiğneme Tablet ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Redoxor Çiğneme Tablet ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları	94
Şekil 6.14	(a) Aspirin Plus C ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Aspirin Plus C ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumlar	95
Şekil 6.15	(a) Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları	97
Şekil 6.16	(a) Kent Olips Limon&Portakal bon bon şeker ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Kent Olips Limon&Portakal bon bon şeker ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları ...	99
Şekil 6.17	Standart askorbik asit çözeltilerinin (2-10 mg.L ⁻¹) fark absorpsiyon spektrumu	100
Şekil 6.18	Kırmızı biber ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	102
Şekil 6.19	Çilek ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	102
Şekil 6.20	Kızılıcık ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	103
Şekil 6.21	Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	104
Şekil 6.22	Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	104
Şekil 6.23	Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	105
Şekil 6.24	Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	106
Şekil 6.25	Sırma C Plus Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	106
Şekil 6.26	Tang Vişne ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	107
Şekil 6.27	Tang Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	108
Şekil 6.28	Redoxor Çiğneme Tableti ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	109
Şekil 6.29	Aspirin Plus C ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	109
Şekil 6.30	Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları.....	110

Şekil 6.31	Kent Olips Limon&Portakal ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	111
Şekil 6.32	Standart askorbik asit çözeltisinin (1-10mg.L ⁻¹) absorpsiyon spektrumları	112
Şekil 6.33	Kırmızı biber ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	114
Şekil 6.34	Çilek ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	115
Şekil 6.35	Kızılıcak ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	115
Şekil 6.36	Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	116
Şekil 6.37	Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	116
Şekil 6.38	Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	117
Şekil 6.39	Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	118
Şekil 6.40	Sırma C Plus Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	118
Şekil 6.41	Tang Vişne ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	119
Şekil 6.42	Tang Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	120
Şekil 6.43	Redoxor Çiğneme Tableti ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları	121
Şekil 6.44	Aspirin Plus C ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	121
Şekil 6.45	Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	122
Şekil 6.46	Kent Olips Limon&Portakal ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları	123

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Bazı Vitamin Kaynakları ve Fonksiyonları	13
Çizelge 2. 2 Bazı bitkisel kaynaklı yiyeceklerin askorbik asit oranları	22
Çizelge 2. 3 Bazı hayvansal besinlerde bulunan askorbik asit miktarları	23
Çizelge 2. 4 Yaş ve cinsiyete göre günlük askorbik asit ihtiyacı	24
Çizelge 2. 5 Askorbik asidin tanınmasında kullanılan belirteçler	30
Çizelge 2. 6 Askorbik asit tayini için kullanılan diğer spektrofotometrik çalışmalar	39
Çizelge 6. 1 Ortalama ¹ D değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi	77
Çizelge 6. 2 Ortalama absorbans değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi.....	102
Çizelge 6. 3 Numunelerde askorbik asit tayini için kullanılan ölçü eğrilerinin Regresyon analizlerine ait parametreler	113
Çizelge 6. 4 Kırmızı biberde askorbik asit tayini	125
Çizelge 6. 5 Çilekte askorbik asit tayini	126
Çizelge 6. 6 Kızılıcıkda askorbik asit tayini	127
Çizelge 6. 7 Juss Portakal Nektarında askorbik asit tayini	129
Çizelge 6. 8 Juss Karışık Meyve Nektarında askorbik asit tayini	130
Çizelge 6. 9 Tamek Kan Portakal Nektarında askorbik asit tayini	131
Çizelge 6. 10 Sırma C Plus Mandalinada askorbik asit tayini	133
Çizelge 6. 11 Sırma C Plus Limonda askorbik asit tayini	134
Çizelge 6. 12 Tang Vişnede askorbik asit tayini	136
Çizelge 6. 13 Tang Limonda askorbik asit tayini	137
Çizelge 6. 14 Redoxor Çiğneme Tabletde askorbik asit tayini	139
Çizelge 6. 15 Aspirin Plus C de askorbik asit tayini.....	140
Çizelge 6. 16 Bebelec Elma Armut Püresinde askorbik asit tayini	142
Çizelge 6. 17 Kent Olips Limon&Portakalda askorbik asit tayini	143
Çizelge 6. 18 Validasyon çalışması	144

ÖZET

RENKLİ MATERYALLERDE ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C)'İN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

Öznur DÜLGER

Kimya Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

Renkli materyallerde askorbik asit (Vitamin C)'in spektrofotometrik yöntem ile tayini için 3 ayrı yöntem geliştirildi ve bu yöntemlerden elde edilen bulgular doğruluk ve presizyon yönünden t ve F testleri yardımıyla %95 güvenirlilik düzeyinde istatistiksel olarak karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemler değerlendirildi. Askorbik asit içeren meyve, sebze, meyvesuyu, toz içecek, gazlı içecek, farmasötik preparat, bebek maması ve bon bon şeker örneklerinde bulunan askorbik asit türev spektrofotometrik yöntem, fark yöntemi ve modifiye spektrofotometrik yöntem ile herhangi bir ayırma işlemi uygulanmadan tayin edildi. Çalışılan numunelerden askorbik asit tayini metafosforik asit-asetik asit (%3-%8) karışımı ile ekstraksiyon, santrifüj, uygun seyreltme ile hazırlanan numune ekstresinde yapıldı. Deneysel çalışmalarda kullanılan numunelerde askorbik asit tayini için geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem için birinci derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait türev absorbans değeri, fark yöntem için absorpsiyon spektrumunda 269nm'deki maksimuma ait absorbans değeri, modifiye spektrofotometrik yöntem için ise 531nm'deki minimuma ait absorbans değeri kullanıldı. Türev spektrofotometrik yöntem, fark yöntemi ve modifiye spektrofotometrik yöntem için ölçü eğrileri sırasıyla 2-10 mg.L⁻¹, 2-10 mg.L⁻¹ ve 1-10 mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlandı.

Anahtar Kelimeler: Askorbik asit, Fark Yöntem, Türev Spektrofotometrik yöntem, Modifiye Spektrofotometrik yöntem, Titraston Yöntemi

ABSTRACT

DETERMINATION of VITAMIN C in COLOURED MATHERIALS by SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

Öznur DÜLGER

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Mahmure ÜSTÜN ÖZGÜR

To determination of ascorbic acid (Vitamin C) in color materials, three separate methods for the determination of the spectrophotometric method was developed and the findings of these methods in terms of accuracy and precision with the help of t and F tests were compared with 95% confidence level, statistically evaluated and the methods applied. Using a modified spectrophotometric method and the difference method is applied to ascorbic acid determination in samples of fruits and vegetables, fruit juice, powdered drinks, carbonated beverages, pharmaceutical preparation, baby food and bon bon sugar any separation process were determined. Determination of ascorbic acid in the samples was studied with the sample extracts were prepared by a mixture metaphosphoric acid-acetic acid (3% - 8%) of extraction, centrifugation, appropriate dilution. Samples used in the study developed for the determination of ascorbic acid derivative spectrophotometric method for the first-order derivative spectrum of the derivative of the absorbance value 258nm a minimum, the difference method for the absorption spectrum of the 269nm maximum absorbance value of the modified method for the spectrophotometric absorbance of the minimum 531nm value was used. Derivative spectrophotometric method, the difference method, and modified spectrophotometric method for the measurement curves, respectively, in the range of 2-10 mg.L⁻¹, 2-10 mg.L⁻¹ and 1-10 mg.L⁻¹ concentration was prepared.

Keywords: Ascorbic acid, Difference Method, Modified Spectrophotometric Method, Derivative Spectrophotometric Method, Titration Method

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Canlı organizmanın sağlıklı bir yaşamı devam ettirebilmesi için karbonhidrat, lipid, protein ve inorganik maddelerden başka, çok az miktarda, diğer bazı organik besin maddelerine de ihtiyacı vardır, bu maddeler vitaminlerdir. Vitaminin kelime anlamı "yaşam aminidir". Vitaminlerin diğer besin maddelerinden farkı, doku yapısına girmemeleri ve organizmaya enerji sağlamamalarıdır [1]. Vücutta büyüme, gelişme, onarım gibi birçok işlevde rol alan vitaminler, düzenli olarak her gün belirli miktarlarda alınması gerekir. Vitaminlerin gıdalardan eksik alınması, emilim bozuklukları ya da metabolik bozukluklara neden olur.

Gıdalarda vitamin analizleri; gıdadaki vitamin değerini belirlemek, mevzuata uygunluğunu araştırmak, etiket bilgilerine uygunluğunu araştırmak üzere yapılabilir. Farmasötik preparatlarda, meyve sularında, idrarda, plasmada askorbik asidin kantitatif analizi için çeşitli metodlar uygulanmıştır. Bunlardan bazıları titrasyon [2, 3], HPLC [3-6], spektrofotometri [7-16], florimetri [17, 18], türbidimetri [19] ve potansiyometri [20].

- Çeşitli materyallerde askorbik asit miktar tayin yöntemleri Bölüm 2. 7 de sınıflandırılarak bahsedildi.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada amacımız askorbik asit analizi için geliştirilen türev spektrofotometrik yöntem, fark yöntemi ve modifiye spektrofotometrik yöntemin askorbik asit içeren renkli ve renksiz olmak üzere farklı numuneler (meyve, sebze, meyvesuyu, toz içecek,

gazlı içecek, farmasötik preparat, bebek maması ve bon bon eker) de askorbik asit tayinine uygulanabilirliğinin incelenmesidir. Deneysel çalışmalarda renkli ve renksiz olmak üzere farklı numuneler seçerek askorbik asit analizi için geliştirdiğimiz yöntemlerin kullanılabilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Standart yöntem olarak kabul edilen 2,6-DCIP titrasyon yöntemi ile örnekteki vitamin C miktarının saptanması için yapılan titrasyon çalışmasında örneğin renginin pembe olması durumunda titrasyonun dönüm noktası tam olarak saptanamamaktadır. Özellikle renkli numunelerde yapılan titrasyon çalışmasında titrasyonun bitişinde titrantın mavi renginin pembe renge dönüşümü ile sonlanması standart yöntem olarak kabul edilen 2,6-DCIP titrasyon yöntemin kullanılabilirliğini zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada askorbik asit tayini için titrasyon yönteminin kullanılabilirliğin güç olduğu durumlarda askorbik asit tayini için hızlı, kolay, pratik ve kullanılabilir yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.3 Bulgular

Bu çalışmada renkli ve renksiz olmak üzere farklı numuneler seçerek askorbik asit analizi için geliştirdiğimiz yöntemlerin kullanılabilirliğinin ortaya konması amaçlandı. Bunun için askorbik asit miktarı tayin edilecek numuneler (meyve ve sebze, bebek maması, bon bon eker, farmasötik ürün) den askorbik asidin ekstraksiyonu için metafosforik asit- asetik asit (%3-%8) karışımının iyi bir ekstraksiyon çözeltisi olduğu görüldü. Numunelerden askorbik asit ekstraksiyonu için karıştırma süresinin numunenin içeriği sert ve yumuşak dokuya sahip olmasıyla değiştiği gözlemlendi ve karıştırma süresi için optimum süre uygulanması gerektiği öngörüldü. Standart askorbik asit çözeltisi ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlandı ve hazırlanan stok çözeltinin bozunma süresi izelge 6.1 de görüldüğü gibi güneşını yapılan ölçüm sonuçlarına göre 7 gün olarak belirlendi. Bu nedenle numunede askorbik asit analizi esnasında tayin edilecek askorbik asidin bozunmasının önlenmesi amacıyla numune ekstratlarının toplam hacmine tamamlanmasında tamamlama çözeltisi olarak metafosforik asit- asetik asit (%3-%8) özücü karışımının kullanılmasının uygun olduğu görüldü.

Renkli örneklere titrasyon yönteminin uygulanması konusundaki literatür çalışmalarının [21-24] incelenmesi ile ulaşılan bilgilere göre bazik ortamda mavi renkli olan titrantın (2,6-DCIP) askorbik asit ile reaksiyonunda rengin gittiği ve daha

fazla ilavesiyle ortam asidik olduğu için oluşan pembe rengin çekilebileceği titrasyonun bu şekilde sonlandırılabilceği veya organik fazla çekilen pembe rengin spektrofotometrik olarak ölçülerek askorbik asid tayininin mümkün olabileceği belirtilmektedir. Bu bildirilerden yararlanarak geliştirilecek modifiye spektrofotometrik yöntemin temelini oluşturmak için sudan daha az yoğunluğa sahip organik çözücülerin DCIP ekstrasyonu için daha etkili olduğu görüldü. Numune çözeltilerinde modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini için belirli hacimde alınan örneğin hacmine tamamlanmasında tamamlama çözeltisi olarak pH4 tampon çözeltisi kullanılmasının uygun olduğu görüldü. Bunun sebebi numune ekstresinin kendi rengini koruyarak eter fazına çekilen rengin titrant 2-6 DCIP çözeltisinin asidik ortamda oluşturduğu pembe renkten geldiğini göstermektedir.

Fark yönteminin geliştirilmesinde yapılan literatür çalışmasında birçok antosiyanin rengi pH derecesine göre değişir. pH yükseldikçe renk zayıflar. Bunun sonucu renklerini kaybeder veya renk açılır. Düşük pH değerlerinde mor-kırmızı, daha yüksek ise yeşil-mazi bir renk alır. Antosiyaninler asit ortamda açık kırmızı, nötr ortamda mor, alkali ortamda mavi-yeşil-menekşe, yüksek alkali ortamda mavi renk alır [25]. Numune ekstresi çözeltilerinde askorbik asit tayini için belirli hacimde alınan örneğin son hacmine tamamlanmasında tamamlama çözeltisi olarak pH2 ve pH5 tampon çözeltilerinin kullanılmasının uygun olduğu görüldü.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

2.1 Vitaminler

Vitamin sözcüğü Polonyalı biyokimyacı Casimir Funk tarafından 1912'de kullanılmıştır. Vita Latince, hayat demektir, -amin son eki ise amin sözcüğünü kastetmektedir. [1].

Vitaminler, hücre ve organların normal işlevleri ve sağlıklı gelişim için gereksinim duydukları, diyet yoluyla belirli düzeyde alınması gereken, yüksek biyolojik etkinliğe sahip organik bileşikler. İnsan organizması, vücudun gereksinim duyduğu miktarın çok altında ürettiği bazı vitaminler dışında vitamin üretemediği için, vitaminlerin dışarıdan alınmaları zorunlu. Yeteri kadar vitamin alınmadığı durumlarda, hücre ve dokularının işlevlerinde bozulmalar ve sonuçta sağlık sorunları ortaya çıkıyor. Vitaminler meyve, bitkisel, hayvansal kaynaklı ya da vitamin katkılı hazır gıdalar yoluyla vücuda alınıyorlar. Vitaminlerden herhangi biri vücuda alınmazsa, o vitaminin yardımcı olduğu kimyasal reaksiyon yürümeyeceğinden dolayı büyümede ve vücut çalışmalarında aksamalar olabilir [26].

Vitaminlerin vücut çalışmasındaki etkileri, biyokimyasal etkileri, biyokimyasal reaksiyonların düzenlenmesiyle ilgilidir. Vitaminlerin insan sağlığına etkisini üç grupta toplayabiliriz;

1. Büyümeye yardım
2. Sağlıklı nesillerin oluşmasına yardım
3. Sinir ve sindirim sistemlerinin normal çalışması, besin öğelerinin elverişli olarak kullanılması ve vücut direncine yardım [26].

Vitaminlerin çok az miktarlarda alınması vücut için yeterli olduğundan çeşitli yiyeceklerle, dengeli beslenen kişilerde vitamin eksikliği görülmez. Olağan koşullarda yiyeceklerdeki ile yetinmeyip gereğinden çok vitamin almanın hiçbir yararı yoktur; çünkü vitaminlerin çoğu vücutta depolanmaz ve günlük gereksinimden fazlası idrar ile dışarı atılır [27].

Bazı vitaminlerin kendilerinden başka ön maddeleri de organizmaya girerler ve burada vitaminlere çevrilirler. Bu ön maddelere provitamin denir [26].

Vitaminler gıdalarda farklı miktarlarda bulunur ve farklı dağılımlar gösterir. Bazı gıdalar bir veya birkaç vitamince oldukça zengin olmalarına rağmen bazı vitaminleri eser düzeyde içerir. Gıdaların vitamin değerleri miktarı gr/100gr ,USP ünitesi veya I.U. olarak ifade edilebilir [26].

Vitamin ailesinde iki ana grup altında 13 vitamin yer alıyor. Vitaminlerden birinci grupta yer alanlar yağda çözünen vitaminleri (A, D, E ve K), ikinci grupta yer alanlarda suda çözünen vitaminleri (B-kompleks grubu ve C vitamini) kapsıyor. B-kompleks grubu içinde, B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B3 (niasin), B5 (pantotenik asit), B6 (pidoksin) ve B12 (kobalamin) vitaminleri, biyotin ve folik asit yer alıyor. Yağda çözünen vitaminlerin, sindirim kanalından emilip (absorbsiyon), vücut tarafından kullanılabilmesi için belirli miktarda yağla birlikte alınmaları gerekiyor. Bu grupta yer alan vitaminlerin günlük olarak gerekenden fazlası, vücutta depolanıyor. A ve D vitaminleri için karaciğer dokusu, ana depo durumunda. E vitaminiyse vücutta yağ dokusunda depo ediliyor. K vitamini, vücut tarafından düşük düzeyde depo edilebiliyor. A ve D vitaminleri aşırı düzeyde alındıklarında vücut için zehirli (toksik) etkiye neden oluyorlar. B-kompleks grubunda yer alan vitaminler ve C vitamini vücutta depo edilemediklerinden, gereksinim duyulan miktarlarının günlük olarak dışarıdan diyetle alınmaları gerekiyor. Esas beslenme faktörü olan vitaminlerden bazılarının ön formları (pro-vitamin A ve D) vücutta üretiliyor. Nikotinamid de, ihtiyacı yeterli düzeyde karşılamasa da, vücut tarafından bir miktar triptofan üzerinden (aminoasit) üretilmekte. Vitaminler sadece insan sağlığı açısından değil, önemli besin kaynağımız olan çiftlik ve kümes hayvanlarının sağlığı açısından da önemli. Ancak diğer canlıların vitamin gereksinimleri insanlardan bazı yönlerden farklılık göstermekte. Örneğin, C vitamini

insan, maymun ve kobayların dışındaki canlılar tarafından, karaciğerde üretiliyor. Çift tırnaklı çiftlik hayvanları B-kompleks grubunda yer alan vitaminleri üretme yeteneğine sahipken, kuşlar K vitaminini ya hiç ya da yeterli düzeyde üretmediklerinden, bu vitaminin eksikliğine karşı oldukça duyarlılar. İnsanlar vitaminleri uzun süre ihtiyaç duyulan miktarın altında alırlarsa, vitamin yetmezliğine bağlı hastalıklar ortaya çıkıyor. Vitamin yetmezliği daha çok dünyanın yoksul bölgelerinde yaşayan insanlarda görülüyor ve protein yetmezliğiyle benzer görünüm sergilediğinden, çoğunlukla bu durumla karıştırılıyor. Tek bir vitamin yokluğuna bağlı olarak gelişen tabloya "avitaminoz", normal kabul edilen en düşük düzeyin altında vitamin alımına ise "hipovitaminoz" deniyor. Birden çok vitamin eksikliği durumu "polihipovitaminoz", aşırı düzeyde vitamin alımı da "hipervitaminoz" olarak adlandırılıyor. İnsan organizmasında yağda çözünen vitaminler daha çok hücre duvarı yapılarında, suda çözünen vitaminlerse daha çok enzimlerin işlevlerini düzenleyen ko-faktörler olarak işlev görüyorlar.

2.1.1 Vitaminlerin Keşfi

İlk olarak beslenme bozukluğu ile ortaya çıkan gece körlüğünün pişirilmiş karaciğer yedirilmesiyle ortadan kalktığı daha miladi yılın başlamasından 1500 yıl önce tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda çeşitli araştırmacılar, çoğu hastalığın taze meyve ve sebze yenilmesi ile önlenebileceği belirmişlerdir. 1800'lü yıllarda pellegra hastalığının mısır gibi yiyeceklerde ortadan kalktığı İtalyanlar tarafından ortaya atılmıştır. Yine bazı araştırmacılar, skorbit, riketsia, pellegra ve beriberi gibi önemli hastalıkların vitamin yetersizliklerinden kaynaklandığını daha o yıllarda bildirmişlerdir. 1950 li yıllarda İngiltere'de büyüme ve gelişme için gerekli olan ve vitaminler olarak adlandırılan önemli faktörlerin sütte mevcut olduğu belirlenmiştir. Beslenme uzmanı olan birçok kişi vitaminleri vital aminler veya büyüme faktörü olarak tanımlamışlardır. 1948 yılında ise B vitaminin izolasyonu ile bu konuda önemli bir aşama kaydedilmiştir. Vitaminler ,insan ve hayvanların sağlıklı büyümesi , gelişmesi ve üremesi için az miktarda (günlük olarak, mcg-mg arası) gerekli olan, organizma tarafından sentez edilemediği için besinler ile dışarıdan alınan ve değişik koenzimlerin esasını oluşturan organik maddelerdir [28].

Vitaminlerin, insan ve hayvan sağlığını koruyucu özelliğe sahip olmasından dolayı keşfi ile birlikte biyokimya ve sağlıkla ilgili bazı konularla yetersiz beslenmeden dolayı meydana gelen hastalıkların tedavisinde başarılar sağlanmıştır [28].

Makro besinlerden olan karbonhidrat, lipid ve proteinlere fazla miktarda ihtiyaç vardır. Çünkü bu maddeler vücut için gerekli olan enerji sentezinde ve yapı taşı olarak kullanılır. Buna karşılık vitaminlere olan ihtiyaç çok az miktarlardadır. Enzimler gibi vitaminlerin de inaktif şekilleri dokularda çok az miktarlarda bulunur. Vitamin noksanlığında değişik bozukluklar görülür. Hafif derecedeki vitamin yetersizliklerinde hipovitaminoz, ağır derecedeki yetersizliklerde avitaminoz, zarar verecek şekilde fazla alınmasında ise hipervitaminoz görülür. Herhangi bir vitamin yetersizliğini veya fazlalığını belirtmek için o vitaminin baş harfi yukarıdaki kelimelerin başına getirilir [28]. (A hipotavitaminoz, A avitaminoz gibi)

İnsan ve birçok hayvan türlerinin düzenli bir biçimde büyüme ve metabolik fonksiyonlarını sürdürebilmeleri için gerekli 13 tane farklı vitamin bilinmektedir. İnsan, hayvan, bitki ve mikroorganizmaların tümünde vitaminlerin varlığı ve aynı biyokimyasal fonksiyona sahip olduğu bilindiği halde besinlerle alınması gerekli olan vitamin miktarı henüz bilinmemektedir. Örneğin, insan ve bazı hayvanlar glikozdan vitamin C sentez etmek için gerekli enzime sahip değillerdir. Bazı vitaminlerin fonksiyonları 1930'lu yıllarda anlaşılmıştır. 1935'de Alman biyokimyacı Warburg, hücredeki enzim katalizleri sırasında oksidasyon ve redüksiyon olaylarında gerekli olan Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat diye adlandırılan ve koenzim olarak bilinen bu yapıyı izole etmeyi ve tanımlamayı başarmıştır [29].

Hastalıkların tedavisinde diyetin yeri ve önemi, diyetle hastalıklar arasında kurulan ilişki, antik çağlara kadar uzanır. Hastalıkların ortaya çıkmasında diyetin yeri ve önemi tarih boyunca insanların ilgisini çekti ve onları arayışlara yöneltti. "En iyi doktor diyetir", "Can boğazdan gelir" gibi ifadelerin zamanımızda da halk arasında kullanılması, toplum hafızasındaki diyetin önemini çok güzel açıklıyor. Her ne kadar vitaminler konusundaki bilimsel bilgi ve araştırmalar 20. yüzyıl öncesinden başlamış olsa da, kimyasal yapılarının ve biyolojik önemlerinin ortaya çıkması 20. yüzyılın başından ortalarına kadar geçen dönemi kapsar. Bu yüzden de biyolojik bilimlerin tarihinde bu döneme bazı araştırmacılar "vitamin çağı" adını vermişler. Bu dönemde

onlarca araştırmacı ve bilim adamı, başarılı vitamin araştırmalarından ötürü Nobel Ödülü aldılar [29].

1950'li yıllardan sonra vitamin araştırmacıları, vitaminlerin insan ve hayvan sağlığındaki bilinen önemlerinin yanında, mikroorganizmalar için de beslenme faktörü olduğunu ortaya çıkardı [29].

Önceleri, besinlerle insanların gereksinim duydukları tüm vitaminleri alabildikleri ve sağlıklı bireyler için fazladan vitamin takviyesine ihtiyaç olmadığı görüşü ağırlıktaydı. Zamanımızdaysa, bu görüş değişerek insanlar eskiye göre daha çok vitamin tüketmeye başladılar. Bu nedenle, diğer besinsel faktörlerin (mineraller gibi) yanında vitamin üretimi de, ilaç üretiminde önemli bir sektöre dönüştü. Vitaminlerin gerek tekli, gerekse de çoklu hazırlanan preparatları, özellikle de ekonomik ve teknolojik açıdan gelişmiş olan ülkelerin ilgili bilimsel kuruluşlarının RDA (günlük alınması gereken) önerileri doğrultusunda kitlelerin yoğun kullanımına sunuldu. Zamanımızda vitamin sektörü, ilaç endüstrisi içinde önemli bir yer işgal etmekte ve sağlık harcamalarındaki payı da gittikçe artmakta. Son 15-20 yıl içinde özellikle vitaminlerin, yaşlılık, kronik ilaç kullanımı ve birçok hastalığın tedavisine olan olumlu katkıları bilimsel araştırmalara konu olduğu gibi, insanların da yoğun ilgisini çekiyor [29].

2.1.2 Vitaminlerin Önemi [30]

Vitaminler, geçmişte ve günümüzde birçok mesleğin ilgi alanına girdi. Bu meslek grupları içinde tıp ve kimya ile uğraşan araştırmacılar, biyokimyacılar, fizyologlar, beslenme bilimcileri, farmakologlar yer alıyor. Özellikle son yıllarda yaşlanma bilimcileri (geriatriştler), estetik tıp alanıyla ilgilenen araştırmacılar, gıda ve ilaç sanayinde çalışan araştırmacılar da vitaminlerle ilgileniyorlar. Vitamin konusundaki bilgilerimiz antik çağlara kadar gitmesine ve özellikle de 19. yüzyılın ikinci yarısı ve 20. yüzyılın başlarından itibaren yoğunluk kazanmasına, kimyasal yapıları, metabolizmaları ve hastalıklarla olan ilişkileri üzerinde sayısız araştırma ve keşiflerin ortaya konulmuş olmasına karşın, vitaminler, insanlığın ilgisini hiç bir zaman günümüz dünyasında olduğu kadar çekmedi. Özellikle son yıllarda beslenme ve değişik hastalıklarla vitaminlerin ilişkisini içeren on binlerce araştırma ve makale, bunu kanıtlıyor.

Ayrıca İnternet ortamında her yönüyle vitaminler konusundaki bilgilere kolaylıkla ulaşılabilecek site sayısının gün geçtikçe artıyor olması da bu düşüncenin diğer bir kanıtı sayılabilir. Geçmişte vitamin eksikliklerinin birçok hastalıkla olan ilişkisi ortaya konulmuş olmasına karşın, günümüzde bu ilişki tekrar değişik boyutlarda ve yeni yaklaşımlarla gündeme taşınıyor. Zamanımızda insanların sağlıklı ve uzun yaşama isteği, tedavisi mümkün olmayan bazı hastalıklar karşısında hasta ve hekimlerin içinde buldukları psikoloji ve arayışların da vitaminlere olan ilginin artmasına katkı sağladığı düşünülebilir. Vitaminler konusunda günümüzde en çok ilgi duyulan konu başlıkları şunlar:

- Kanserden korunma ve değişik kanser türlerinin tedavisinde vitaminlerin yeri ve önemi
- Vitaminler ve ilaçların etkileşimi
- Doğuştan metabolik bozuklukların önlenmesinde vitaminlerin yeri ve önemleri. Çoklu (multi) yada yüksek (mega) doz vitamin kullanımı
- Sağlıklı yaşamak için alınması gerekli günlük vitamin düzeyleri: yaşlılıkta, hamilelikte, emzirme döneminde, menopoz sonrası döneminde vitamin alınmasının önemi.
- Merkezi sinir sistemi hastalıkları, felç, kalp-damar hastalıklarına karşı (hipertansiyon) korunmada ve psikiyatride vitaminlerin koruyucu rolleri
- Kronik alkoliklerin tedavisinde, sürekli ilaç kullananlarda ve yatalak hastalar için vitaminlerin tedaviye katkıları
- İlaç bağımlılığı, sigara tiryakileri ve sıkı vejeteryen diyet uygulayanlar, radyasyon ya da kemoterapi alanların fazladan vitamin almalarının gerekliliği
- Özellikle sindirim kanalıyla ilgili olarak ameliyat geçiren hastalar, hemodiyaliz hastaları, yüksek kan kaybına uğrayanlar için vitamin alımının ne kadar önemli olduğu
- Genel anlamda hastalıklara (grip ve soğuk algınlığı başta olmak üzere) karşı savunma gücümüzün (bağışıklık) artırılmasında vitaminlerin yeri

- Çevre kirliliği ve tüketilen sebze, meyve ve tahıllarla aldığımız tarımsal ilaç kalıntılarına karşı vücudumuzun korunmasında vitaminlerin bir öneminin olup olmadığı
- Vitamin kullanımında suistimal konusu ve vitaminlerin yüksek dozda alınmaları durumunda zararlı (toksik) etkileri
- Estetik tıpla ilgili konularda vitaminlerin yeri ve önemi

Kuşkusuz, yukarıda sıralananların dışında daha birçok hastalıkla vitaminler arasındaki ilişkiden söz edilebilir.

Zengin ülkelerde, ekonomik ve sosyal refahın ve yaşam standardının yüksek oluşunda insanlara sağlanan sağlık hizmetlerinin payı oldukça önemli olup, sağlık harcamalarında vitamin harcamalarının payı gün geçtikçe artıyor. Özellikle erişkin ve sağlıklı insanlar, bu ülkelerde alışveriş merkezlerinde kombine ve çok değişik biçimlerde hazırlanmış vitamin ve mineral tabletlerin satıldığı reyonlar yoluyla vitamin ve mineral takviyesine adeta zorlanıyorlar. Bizde de büyük şehirlerde alışveriş merkezlerinde bu tip vitamin ve mineral tabletlerinin satıldığı reyonlara rastlanılmaya başlandı. Ancak bireylerin hekim kontrolü olmadan reçetesiz olarak aldıkları bu vitamin ve mineral preparatlarından nasıl yararlanacakları konusunda, hiç olmazsa temel bazı bilgilere sahip olmaları gerekmekte. Bu konuda yeterli bilgiye sahip olmadan gelişigüzel ve bilinçsiz vitamin kullanılması, yarar yerine sağlık sorunlarına da yol açabilir. Yalnızca hastalığa yakalandıktan sonra değil, hastalıklara karşı vücudun savunmasını güçlendirmede de vitaminlerin yeri ve önemi konusunda bilgi sahibi olmak, çağımızda artık bir zorunluluk.

2.1.3 Vitaminlerin Adlandırılması [31]

Vitaminlerin adlandırılması, ilk olarak B vitaminin izole edilmesiyle başlamış ve bulunan bu ilk vitamini, Beri Beri hastalığını tedavi edici özelliğinden dolayı bu hastalığın baş harfi verilmiş. Bundan sonra bulunan vitaminler için de, öncelik A harfine verilecek şekilde, alfabetik sıra izlenmiş. Bu sınıflandırmaya uymayan K vitamininin adıysa kan pıhtılaşmasındaki rolünden geliyor. K harfi, pıhtılaşma anlamına gelen terim olan “koagülasyon” kelimesinin baş harfi.

B vitaminleri, önceleri tek bir vitamin olarak düşünül­düğü için, onlara da alt indislerden oluşan numaralar verilmiş. Günümüzdeyse artık çoğu B vitaminin özel adları var: tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), pantotenik asit (B5), piridoksin (B6), biyotin, folik asit, vs. Diyeceksiniz ki arada neden B4 yok.

Bir kısım bileşikler, önceden B grubu vitaminlerden oldukları düşün­ül­düğü için, daha önce bu grupta yer alıyorlarmış. Örneğin, ilk izole edildiklerinde B4 vitamini olarak adlandırılan adenin ve B8 vitamini olarak adlandırılan adenilik asit. Bu bileşiklerin artık B vitamini grubuna ait olmadıkları biliniyor. Dolayısıyla da bu gruplandırmadan çıkarılmış durumdadır. Bu nedenle de gruplandırmanın o basamaklarında boşluklar bulunuyor.

Grupta ayrıca, bizim adlarına alışık olduklarımızın dışında vitaminler de bulunuyor. Örneğin tavuklarda tüylenme faktörü olan paraaminobenzoik asit B10, yine tavuklarda bir büyüme faktörü olan folasin pterilheptaglutamik asidi B11, sıçanlar için önemli bir bileşik olan orotik asit B13, pangamik asit adlı bileşik B15, bununla ilişkili diğer bir madde olan dimetilglisin de B16 vitaminleri olarak adlandırılırlarken, laetril ve amigdalin bileşikleri de bazı araştırmacılarca B17 vitaminleri olarak kabul ediliyorlar.

2.1.4 Vitaminlerin Sınıflandırılması

Vitaminler, yağda eriyen vitaminler ve suda eriyen vitaminler olarak 2 gruba ayrılır. Bu tip sınıflamada fizyolojik olarak vitaminler arasında bir ilişki yoktur, fakat organizmada emilmemeleri, dağılımları ve depolanmaları bakımından birbirlerine benzer olanlar bir arada gruplandırılmıştır. Bu sınıflamaya göre yağlarla alınan ve safranın etkisi ile bağırsaklardan emilen vitaminlere yağda eriyen vitaminler denmektedir.

Vitaminler, koenzim fonksiyonu olan vitaminler ve koenzim fonksiyonu olmayan vitaminler diye de sınıflandırılabilir. Bu grupların dışında bir de vitamin benzeri etki yapan maddeler var.

2.1.5 Yağda Çözünen Vitaminler

A, D, E ve K vitaminleri yağda çözündüklerinden dolayı, yağda çözünen vitaminler olarak anılırlar. Sağlık için gerekli olmakla birlikte her birinin vücutta çok önemli fonksiyonları vardır. Yağda çözünen vitaminler yağlarla birlikte barsaklardan dolaşıma

emilirler. Yağ emilimini etkileyen her hastalık veya bozukluk bu vitaminlerin eksikliğine neden olur. Dolaşıma geçtikten sonra karaciğer dokusuna taşınırlar. Bu vitaminler başlıca karaciğer ve yağ dokusunda depolanırlar. A, D ve K vitaminleri karaciğerde depolanırlarken, E vitamini vücudun yağ dokularına dağıtılır. Bu vitaminler çeşitli oranlarda depo edilebildiklerinden dolayı, kısa dönemde eksikliklerinin ortaya çıkması, suda eriyenlere göre daha az muhtemeldir. K vitamini istisna olmak üzere, yağda çözünen vitaminler suda çözünenlere göre vücuttan daha yavaş elimine edilirler. Vitamin A ve D vücutta birikebilir ve toksik etkilere neden olabilirler [32].

2.1.6 Suda Çözünen Vitaminler

Suda çözünen vitaminler bağırsakta emildikten sonra kullanılacakları dokuya kan dolaşımı ile taşınır. Her birinin suda çözünürlük dereceleri farklıdır [33]. Bu farklılık vücuttaki dağılımlarında etkiler. Bu vitaminler gereğinden fazla alınır, dokularda belirli bir ölçüde depolandıktan sonra dışarı atılır [34].

B vitamini serbest halde etkinlik göstermez. Vücuttaki işlevlerini yerine getirebilmesi için pek çok kimyasal süreçten geçmesi gerekir. Başka maddeler ya da molekül parçalarının eklenmesiyle koenzim işlevini yerine getirir [34].

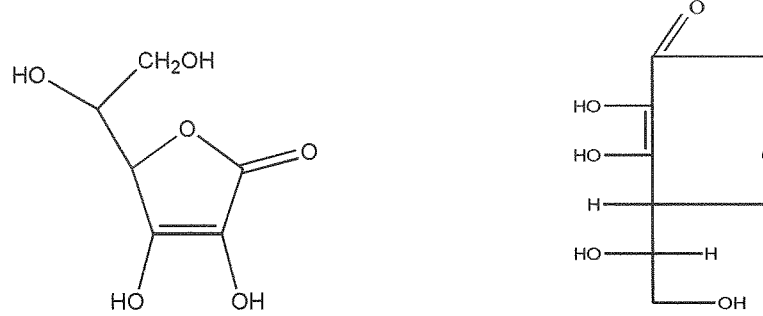
C vitaminin fizyolojik işlevleri iyi bilinse de, metabolizma mekanizması çok açık değildir. Vitamin C diş ve kemiklerin büyümesi, yaraların iyileşmesinde gereklidir. Vücuda yararlı daha birçok etkisi vardır [34].

P vitaminin başlıca etkisi kapiler duvarlarının geçirgenliğini azaltmasıdır. Böyle bir madde ilk defa bir tür kırmızı biberde (paprika) keşfedildiği ve kapiler duvarların geçirgenliği (permeabilitesi) üzerine etki ettiği için buna *P vitamini*, sentetik C vitamini ile iyileşmeyen kapiler kanamalarının limon özsuyla ile iyileşmesi dolayısıyla da *sitrin* adı verilmiştir. P vitamininin eksikliği insanda görülmemiştir [26].

Çizelge 2.1 Bazı Vitamin Kaynakları ve Fonksiyonları

Vitamin	Vücuttaki fonksiyonları	Doğal Kaynak
A vitamini (Retinol)	Diş ve kemiklerin büyümesi, cilt güzelliği ve müköz membranlar için.	Tereyağı, yumurta sarısı.
Beta Karoten	A vitamini prekürsörüdür. Oksijen radikallerini inhibe eder, yaşlanmayı yavaşlatır.	Çiğ havuç ve havuç rengi meyveler.
E vitamini (Tokoferol)	Antioksidandır, kas ve sinir dokularının sağlıklı kalmasına yardımcı olur.	Yağ, margarin, karaciğer
B1 vitamini (Tiamin)	Sinir sisteminin vitaminidir. Vücut dokularının sağlıklı olmasını ve büyümesini sağlar.	Domuz eti, sebzeler ve kurutulmuş meyve
B2 vitamini (Riboflavin)	B vitaminlerinin ana üyesidir. A vitamini ile birlikte etki yapar.	Hububat, balık, meyve.
B8 vitamini (Biotin)	Hücre ihtiyaçlarına cevap verir. Sağlıklı cilt ve saç için gereklidir.	Sebzeler, çikolata, ceviz, fıstık.
B9 vitamini (Folik asit)	Anti-anemiktir ve özellikle yenidoğanlar ve hamileler için önemli olan kırmızı hücrelerin yapımına yardımcı olur.	Kuşkonmaz, havuçrengi sebze ve meyveler.
C vitamini (Askorbik asid)	İnsan organizmasının doğal direncini stimule eder.	Turunçgiller (portakal, limon) sebzeler, sakatat.

2.2 Askorbik Asit (Vitamin C)



Şekil 2.1 L- Askorbik asit (Açık Formülü)

Kapalı formül: $C_6H_8O_6$

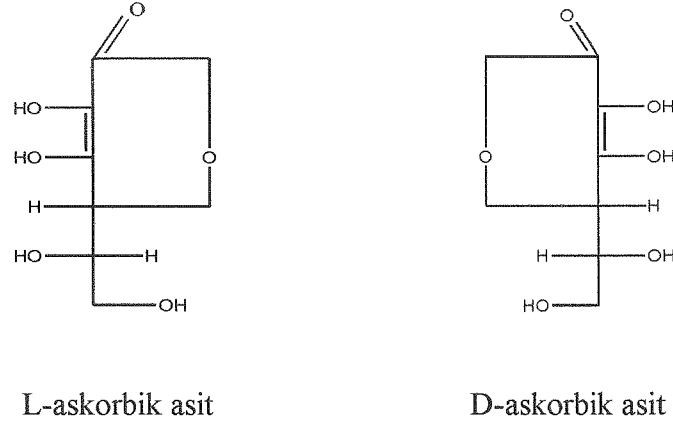
Molekül ağırlığı: $176.12g.mol^{-1}$

Askorbik asit ve vitamin C, L-ksiloaskorbik asidin günümüzde yaygın olarak kullanılan iki ismidir. Bununla beraber tarihsel gelişimi sırasında cevitamik asit, antiskorbutik vitamin, heksuronik asit, skorbutamin ve redoxon olarak adlandırılmıştır. Diğer kimyasal isimleri; L-Askorbikasit 3-Oxo-L-glufuranolaktone(enolform), L-3-ketotreohexuronikasitlakton'dur [35].

C vitamini oda sıcaklığında renksiz kokusuz tadı tam ekşi (E.N 192⁰ C) suda kolay çözünen kristaller halindedir. Su ile karışabilen organik çözücülerde iyi çözünürler. Diğer organik çözücülerde çözünmezler [36].

C vitamini çeşitli izomerleri olan bir bileşik olup doğal formu, L-askorbik asittir. Hem asit hem de kuvvetli indirgen özelliktedir. Sudaki çözünürlüğü yüksektir. Bu özellikleri, lakton halkasındaki karbonil grubu ile konjuge olan enediol yapıdan kaynaklanmaktadır [37]. C vitamin'inin "+" ve "-" olmak üzere iki formu vardır."+" olan "D-askorbik asit", "-" olan ise "L-askorbik asit" olarak tanımlanır [38]. D izomeri, L izomerinin yaklaşık %10'u düzeyinde bir aktiviteye sahiptir [37]. Diğer bir izomer olan D-izo-askorbik asit (eritorbik asit) ise, vitamin aktivitesine sahip değildir. Fakat birçok gıda redoks

sistemlerinde L-askorbik asit gibi davrandığı için gıdalarda antioksidant olarak kullanılmaktadır [39].



Şekil 2.2 Askorbik asidin izomerleri

2.2.1 Askorbik Asidin Tarihçesi

Askorbik asit kimyasal olarak tanınmadan önce hastalıklarla ilişkisi bilinmekteydi. Askorbik asidin yetersizliğine bağlı skorbüt hastalığını Hipokrates 450 yıllarında diş etlerinin kangreni diş kaybı ve askerlerin ayaklarında şiddetli ağrılar gibi belirtilerle tanımlanmıştır. İskoçyalı bir doktor olan James Lind 1753’ de portakal ve limonla askerlerdeki skorbüt hastalığının önlendiğine dair deneme ve gözlemlerini yayınlamıştır [35].

Askorbik asit üzerine ilk bilimsel araştırmalar 1907’de Holst ve Frolich tarafından yapılan deneylerle başlar. Holst ve Frolich birçok besin maddelerinin, özellikle yeşil sebze ve meyvelerin skorbüt hastalığını önleyici etkileri olduğunu bulmuşlardır. C. Funk 1912’de skorbüt hastalığının besinlerde bulunan bir faktörün eksikliği sonucu oluştuğu düşüncesini ortaya koymuş ve bu maddeye “Antiskorbütik vitamin”adını vermiştir. Daha sonra Drummond 1920’de antiskorbütik vitamin için “Vitamin C” adını kullanmıştır. Zilva ve çalışma arkadaşları limondan antiskorbütik faktörü yoğunlaştırma üzerinde çalışmışlar ve hemen hemen saf askorbik asit bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenerek izole edilmiştir [35]. Zilva bu çalışmalarını esnasında 2,6-diklorofenolindofenolün (2,6-DCPIP) vitamin çözeltisi tarafından indirgendini de bulmuştur.

Zilva deneylerini sürdürürken Szent-Gyorki 1928 yılında portakal, lahana ve hayvanların adrenal bezlerinden askorbik asidi ayırmış fakat 1932 yılına dek bu maddenin antiskorbüt vitamini olduğunu anlayamamıştır. Buluşunu yayımlamadan King bu araştırmadan habersiz heksuronik asit ile aynı olduğunu kabul ettikleri kristal maddenin limon suyundan izolasyonunu bildirmiştir. Bundan sonra birçok bağımsız araştırmacılar özellikle Tillmans, Vedder, Nelson, Harris ve Von Vargha vitaminin kimliğini saptamışlar ve glikozdan sentezini gerçekleştirmişlerdir. Askorbik asit ismi Szent-Gyorki'e izafeten verilmiştir.

2.2.2 Askorbik Asidin Genel Özellikleri [40]

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, beyaz, dikdörtgen kristallerdir. Çok hafif özel bir kokusu vardır. Ekşi tatta ve asit reaksiyondadır. Optikçe aktiftir. Polarize ışığı sağa çevirir. Asetonda çok zor çözünür. Eter, petrol eteri, benzen, kloroform ve yağlarda çözünmez.

C vitamini kimyasal olarak askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. Ticari C vitamini genelde askorbik asit kristallerinden veya askorbik asidin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır.

C vitamini (askorbik asit) omurilik, akciğer ve göz gibi pek çok hayvansal dokunun sulu bölümlerinde oldukça yüksek yoğunlukta (milimolar ve üstü) bulunur. Bazı meyveler yüzde 1'den fazla (~6 mM) içerebilir. İnsan kanı plazmasında normal olarak 0,1 mM düzeyinde bulunur. Çoğu organizma C vitaminini sentezleyebilmesine rağmen, insanlar dahil birkaçı onu diyetle almak zorundadırlar. Eneiol yapısından ötürü, hayli düşük bir ilk pKa sergiler (4,2 civarında) ve buna bağlı olarak da çoğu dokularda monoanyon olarak varolur. 3- pozisyonundaki hidrojendeki en asidik olanıdır, tek elektronlu oksidasyon reaksiyonlarında çıkarılan hidrojen atomudur.

C vitamininin kesin ölçümü hem onun biyokimyasal hem de farmakokinetik özellikleri için zorunludur. Biyolojik sistemlerde askorbik asidin rolü, C vitamininin in vivo fonksiyon ve gerekleri iki faktörle birlikte ele alınmalıdır: Birincisi, C vitamininin hem antioksidan hem de bir enzim kofaktörü olarak hareket etme yeteneği dahil

biyokimyasal özellikleridir. İkincisi, bağırsakta emilmeyi, serum konsantrasyonunu, hücresel dağılımı, kullanım ve dışarı atılımını içeren farmakokinetiğidir.

2.2.3 Askorbik Asidin Fiziksel Özellikleri

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Renksiz, beyaz ve dikdörtgen kristallerdir. Çok hafif ve özel bir kokusu vardır, ekşi tatta ve asit reaksiyondadır

Erime noktası: 189-192 °C' dir.

Optikçe aktiftir ve polarize ışığı sağa çevirir.

$[\alpha]^{20}$, +23° (suda)

$[\alpha]^{23}$, +48° (metanol'de) dir.

Sudaki çözünürlüğü: 33g/100g; etanoldeki çözünürlüğü 2g/100g; Gliserindeki çözünürlüğü 1g/100g'dır. Asetonda çok zor çözünür. Eter, petrol eteri, benzen kloroform ve yağlarda çözünmez [35].

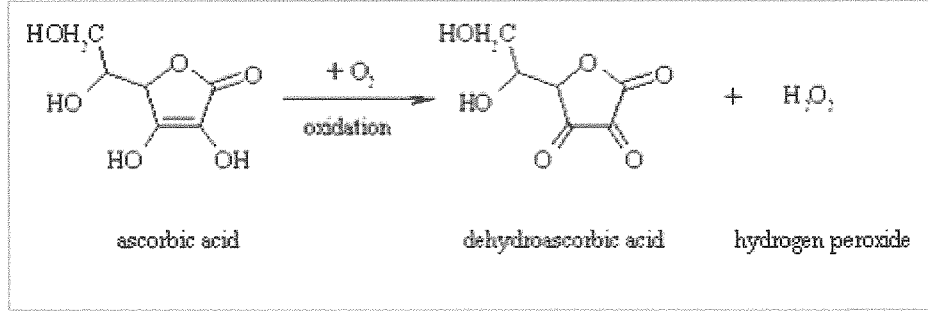
UV Spektrumu: Ultraviyole absorpsiyonu pH ve çözücüye bağlıdır. Asidik çözeltilerde 245 nm'de, nötral çözeltilerde 265nm'de metanolde 244 nm ve etanolde 245 nm'de maksimum gösterir [35].

IR Spektrumu(KBr disk ile): 3510,3405,3306 cm⁻¹ OH bandı;1755,1670 cm⁻¹'de C=O; 1025 cm⁻¹'de C-O-C bantları görülür [35].

2.2.4 Askorbik Asidin Kimyasal Özellikleri

Kimyasal adı 2-oxo-L-therero-hexeno-1,4-lactone-2,3-enediol veya L-3 hetothreohexuoronic acid lactone'dur [38]. Hidroksil grupları ve oksijen atomları yapıya erime noktası kazandırır. Ayrıca yapının su gibi polar moleküllerde çözünebilmesini sağlar [39]. Vitamin C'nin asit karakteri en-diol gruplarından ileri gelir ve tek değerli bir asittir. Yani en-diol grubunun tek hidrojeni dissosie olur [41]. C vitamini kimyasal olarak askorbik asidin ışığı sola döndüren enantiyomeridir. Ticari C vitamini genelde askorbik asit kristallerinden veya askorbik asitin kalsiyum veya sodyum tuzlarından oluşmaktadır. Askorbik asit, serbest oksijeni gıdadaki okside

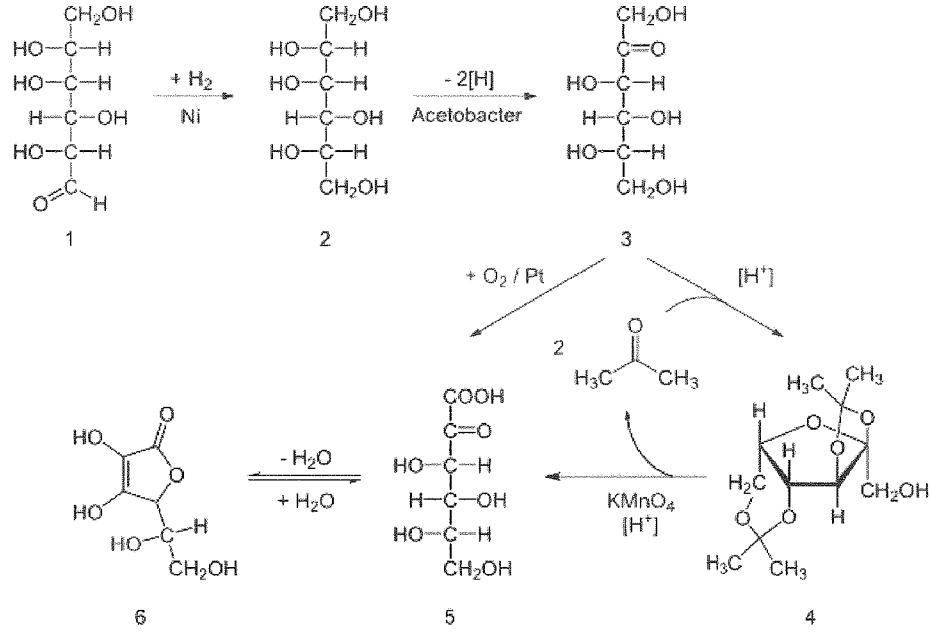
olabilen yapılardan daha önce yakalayarak koruma sağlarlar. Askorbik asidin en önemli kimyasal özelliklerinden birisi de redoks potansiyeli olup, indiren ajan ve serbest radikal yakalayıcısı olarak davranmasına neden olur ve bir H iyonu vererek serbest radikal zincirini inhibe eder.



Şekil 2.3 Askorbik asidin oksidasyon reaksiyonu

2.2.5 Askorbik Asidin Sentezi

Piyasada yalnız sentezle elde edilmiş askorbik asit vardır. Bugün geniş ölçekte uygulanmış yöntem Reichstein ve arkadaşları tarafından bulunmuştur. Bu sentez yönteminde D glikozdan yola çıkılır, bunun katalitik hidrojenlenmesiyle aldehit grubu primer alkol grubuna indirgenerek D sorbid meydana gelir. Bunun *Acetobacter xylinum* ile biyokimyasal yükseltgenmesiyle L –sorboz oluşur. Bu madde C5 ve C6 atomlarında L-askorbik asit biçimlenmesindedir. Bunun platin katalizörü ile birlikte doğrudan doğruya oksijenle veya diaseton türevinin alkali ortamda potasyum permanganatla yükseltgenmesiyle, diaseton 2 keto-L-gulonik asit meydana gelir. Bunun suda ısıtılmasıyla aseton ayrılır, serbest 2-keto –L-gulonik asit meydana gelir. Aynı madde L-gulonik asidin kromik asit veya vanadyum katalizörü ile birlikte kloratlarla seçimli olarak yükseltgenmesiyle de elde edilir. Bunun da seyreltik anorganik asitlerle kaynatılmasıyla laktonlaşma ve enolleşme meydana gelir [42].



Şekil 2.4 Askorbik asidin sentez reaksiyonu

2.2.6 Askorbik Asidin Metabolizması

Askorbik asit metabolizması, alım yoluna, alınan miktara ve beslenme gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. İnsanda askorbik asit gastrointestinal sistemde enerji gerektiren sodyum bağımlı aktif transport mekanizması ile absorbe edilir. Aktif transport sistemi insanda ve kobaylarda doygunluğa ulaşabilir ve alımı arttıkça absorpsiyon azalabilir. Hamster ve sıçanlarda ise askorbik asit konsantrasyona bağımlı olarak bağırsak duvarından pasif difüzyon ile geçebilmektedir. Yaklaşık aynı Km değerine sahip, insan ve kobay bağırsağındaki vitamin C transportu, iki türde de benzer transport mekanizması olduğunu göstermektedir. İnsanlarda bu transport sisteminin aktivitesi en yüksek jejunumda, kobaylarda ise ileumdadır. Ayrıca ince bağırsak duodenal ve proksimal duvarı da kobaylarda absorpsiyon bölgesi olarak bildirilmiştir [43]. Askorbat iyonu küçüktür ve renal glomerular filtrelerin porlarından rahatlıkla geçer. Serum konsantrasyonu 1.6 mg/dl'ye ulaşınca tubuler reabsorpsiyon doyuma ulaşır ve bu değer bireysel farklılıklar göstermekle birlikte 2.5 mg/dl'ye ulaştığında askorbik asit idrarla atılmaya başlar. Lökosit ve dokulardaki vitamin C konsantrasyonu serum konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterir [44]. Askorbik asit, vücudun spesifik dokularında yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Örneğin adrenal bezler, hipofiz, timus,

korpus luteum ve retina konsantrasyonları plazmadan 100 defa daha yüksek, beyin testis, troid, ince barsak mukozası, lenf bezleri, akciğer, karaciğer, dalak, akyuvarlar, pankreas ve tükürük bezleri ise 10–100 kat daha yüksek olduğu birçok araştırmayla belirlenmiştir [45].

2.2.7 Askorbik Asidin Fonksiyonları

Diyette L-askorbik asit eksikliğinde, insan, kobay gibi vücutlarında askorbik asiti sentezleyemeyen canlılarda skorbüt belirtileri ortaya çıkmaktadır. Bunlar dışında kollajen oluşumunda, yağ asidi metabolizmasında, beyin fonksiyonlarında bazı bozukluklar, enfeksiyona duyarlılık ve yorgunluk hissi gibi etkiler de gözlenmektedir [46]. Askorbik asit moleküler oksijen gerektiren karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarında önemli rol oynar. Hidroksilasyon yapan enzimlerin aktif bölgelerinde klasik kofaktör benzeri rol oynar. Metal iyonlarının geçişi ile ilişkisi, indigeyici özelliği ve oksijenin serbest radikal türevleri ile reaksiyonu, biyolojik fonksiyonlarının temelini oluşturur [47].

L-askorbik asit uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında gerekli olan karnitinin lizinden sentezlenmesinde veya g-butirol betainin hidroksilasyonu sonucu oluşumunda etkili bir vitamindir. L-askorbik asit eksikliği ile karnitin sentezi azalır ve kanda 20 trigliserid birikimi, fiziksel yorgunluk, halsizlik ve skorbüt belirtilerinin gözlenmesi bu yüzdendir [48]. Ketakolamin biyosentezinde, dopaminin norepinefrine maksimum hidroksilasyonunun sağlanmasında ve tirozin metabolizmasında askorbik asite gereksinim vardır. Ayrıca askorbik asit ve kolesterol metabolizması arasında da ilişki olduğu, koyalarda kronik askorbik asit yetersizliğinin kolesterolün safra asitlerine katabolizmasında azalmaya neden olduğu ve kolesterolün hidroksilasyonu ile safra asitlerine dönüşümü arasında askorbik asite gereksinim olduğu belirlenmiştir [45]. Ayrıca yapılan araştırmalar kolesterolden steroid hormonların biyosentezinde de vitamin C varlığının etkili olduğu gösterilmiştir [45, 49, 50]. Askorbik asit, iyonların vücut içinde geçişlerini azaltır. L-askorbik asit eksikliği dalaktan demirin mobilizasyonuna zarar verir ve demir yükleme tedavisinde ilave L-askorbik asit demirin vücut depolarından mobilizasyonunu artırır. Bu nedenle askorbik asit aneminin tedavisinde de önemli bir vitamindir [46].

Lökositlerdeki yüksek askorbat konsantrasyonu ve bunun enfeksiyon ve fagositoz sırasında hızla harcanması, vitaminin immun sistemde de etkili olduğunu göstermektedir. Soguk algınlığı belirtilerinde lökosit ve plazma askorbik asit düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı ileri sürülmektedir. Askorbik asitin düşük dozlarda soguk algınlığını önleme özelliği vardır ancak yüksek miktarlarda önemi büyüktür. Alınan askorbik asitin miktarı arttıkça koruma özelliği de artar [46, 51]. Askorbik asit kollajen, proteoglikanlar ve kemik, deri, kapillar duvar ve diğer bağ dokuların hücre içi matriksinin organik bileşenlerinin sentezinde önemli rol oynar. Vitamin- C, demir ve oksijenle beraber kollajen sentezi sırasında, lizin ve prolinin hidrolizasyonu için gereklidir [52, 53]. C-vitamini eksikliğinde anormal kollajen ipliklerinin oluşumuna neden olur ve kollajen demetler anstabil ve kolay degrade olduklarından derinin gerginliği ve kapiller frajilite azalır [54]. Klinik olarak diseti kanamaları, immun yetmezlik ve kırık ve yaralarda iyileşmede gecikmeler gözlenir [55, 56]. A vitamini gibi, C vitamini de yangısel cevabı uyarır ve eksikliğinde konakçının enfeksiyonlara direnci düşer. Ayrıca kollajen üretiminde askorbik asit nötrofillerin fonksiyonunu [51], anjiyogenezisi arttırmasının [57] yanında güçlü bir antioksidan olarak görev yapar. Vitamin eksikliği olmayan hastalarda bu vitaminin ek olarak verilmesi yara iyileşmesinde hızlanmaya neden olmaz [58], ancak özellikle ağır yanık yaralarında günde 1-2gr. C-vitamini verilmesi yaygın bir pratik uygulamadır [59]. L-askorbik asitin önemli biyolojik fonksiyonlarından biri de oksijen türevi olan hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi serbest radikallerin harabiyetinde rol oynamasıdır. Askorbik asit fizyolojik strese karşı yanıtta da etkili olduğundan operasyon anında ve postoperatif olarak gereksinim vardır [60]. Travma ve cerrahi yaralarda düşük plazma askorbik asit düzeylerinin dahi fizyolojik anti-stresör olarak etkili olduğu gözlenmiştir [61]. Yapılan araştırmalar aşırı ekzersiz sonucu oluşan fizyolojik stresin antioksidan savunma sistemini harekete geçirdiğini ve benzer sonuçların yaralarda da gözlendiğini, bu nedenle yara iyileşmesinde doku antioksidan miktarındaki artışların faydalı olabileceğini göstermiştir [62, 63, 64].

2.2.8 Askorbik Asit Kaynakları

2.2.8.1 Bitkisel Askorbik Asit Kaynakları

Askorbik asit bütün canlı dokularda bulunur. Doğada çok yaygın şekilde bulunan bu vitamimin en zengin kaynaklarını taze meyve ve sebzeler oluşturur. Meyveler arasında en çok askorbik asit içerenler; limon, portakal, greyfurt, kivi, ananas, çilek ve frenk üzümüdür. Elma, armut ve erik ise bunlara göre daha az miktarda askorbik asit içerir. Bu meyvelerden özellikle sitrus meyveleri (limon, greyfurt, portakal), kivi ve domatesin dış kısımları (kabuk) askorbik asit bakımından zengindirler [35].

Sebzeler, özellikle kuşburnu, karnabahar, lahana, ıspanak, kuru soğan, turp, maydanoz ve yer elması askorbik asit bakımından en zengin kaynaklardır [35]. Aşağıdaki tabloda bazı bitkisel kaynaklı yiyeceklerin vitamin C oranları belirtilmiştir.

Çizelge 2.2 Bazı bitkisel kaynaklı yiyeceklerin vitamin C oranları

Meyve ve sebze adı	Miktarı mg/100g	Meyve ve sebze adı	Miktarı mg/100g
Kuşburnu	450	Kızılcık	55
Maydanoz	180	Portakal	50
Şalgam yaprağı	130	Limon	22
Asma yaprağı	120	Lahana	43
Yeşil biber	100	Greyfurt	43
Kara lahana	94	Mandalina	30
Kivi	90	Şeftali	28
Karnabahar	80	Domates	23
Ispanak	50	Ahududu	22
Olgun çilek	17	Böğürtlen	20
Ham çilek	148	Kuru iğde	35
Kırmızı biber	93	Limon(bekletilmiş)	58
Portakal	25	Portakal(bekletilmiş)	18

2.2.8.2 Hayvansal Askorbik Asit Kaynakları

1920’li yıllarda parça etlerin ve balıkların da insanlar için vitamin C kaynağı olduğu anlaşılmıştır. Aşağıda bazı hayvansal gıdaların vitamin C oranları verilmiştir [65].

Çizelge 2.3 Bazı hayvansal besinlerde bulunan vitamin C miktarları

Hayvansal Gıda	100 gr hayvansal gıdada bulunan vitamin miktarı(mg)	Hayvansal gıda	100 gr hayvansal gıdada bulunan vitamin miktarı (mg)
Dana ciğeri	36	Tavuk ciğeri	13
Keçi sütü	2	Sığır ciğeri	31
Kuzu ciğeri	12	Sığır eti	0
İstiridye	30	Kuzu yüreği	11
Kuzu dili	6	Kuzu beyni	17
Domuz ciğeri	23	Domuz sırtı	0
Morina balık yumurtası	17	İnsan sütü	4

2.2.9 Askorbik Asidin Kullanım Alanı

Askorbik asidin vücutta birçok kimyasal tepkimenin normal olarak yürümesi için gerekli oluşu, dış etkenlerin bu vitamin dokulardaki durumunu etkilemesi bireyin gereksinimini arttırmaktadır. Askorbik asidin dokularda doymuş düzeyde bulunması gebelik, emzicilik, zehirlenme, bakteri toksikleri veya enfeksiyonları, soğuk, yaralanma, hırpalanmalar gibi streslere karşı konulması için önemlidir. Ayrıca sporcuların normalden daha fazla askorbik aside ihtiyaçları olduğu bildirilmiştir [66]. Aynı şekilde yanık ve ameliyatlarda günlük gereksinimin arttırılması gerekir. Ağızdan doğum kontrol hapları alınması, hamilelik, sigara içilmesi gibi durumlarda da gereksinim artabilmektedir [67]. Aşağıda yaş ve cinse göre günlük vitamin C ihtiyaçları gösterilmiştir [67].

Çizelge 2.4 Yaş ve cinsiyete göre günlük askorbik asit ihtiyacı

CİNS	YAŞ	GÜNLÜK İHTİYAÇ(mg)
Çocuk	1 yaşın altında	30
	1-3	35
	4-6	50
	7-9	60
	10-12	75
Kız çocuk	13-20	80
Erkek çocuk	13-20	90
Erkek	≥ 19	100
Kadın	Orta derecede aktif	70
	Hamile, ikinci dönem	100
	Laktasyon dönemi	150

Askorbik asit besin ve içeceklerin vitamince zenginleştirilmesinde kullanılır [35]. Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması özelliğinden dolayı antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasını önlemesi için kullanılır [68].

Ayrıca çabuk soğutularak dondurulmuş meyveler erime sırasında doğal renk ve kokularını yitirirler. Bunlara dondurmadan önce saf askorbik asit katmakla bu sakıncalar önlenabilmektedir Oksijen hoşa gitmeyen değişiklikleri yapmadan önce askorbik asit tarafından tutulur. Bu şekilde dondurulmuş kayısı, şeftali, elma, üzüm, muz, armut, ananas gibi meyvelerde 20 yıldan beri askorbik asit antioksidan olarak kullanılmaktadır [67, 69]. Askorbik asidce zengin besinler , indirgen ortamdan ötürü teneke kutularda daha iyi saklanabilmektedir.Teneke kutularda saklanan meyve sularının askorbik asidi hiç eksilmezken, plastik kutularda saklanan meyve sularında fazla miktarda askorbik asid kaybı saptanmıştır [70].

2.2.10 Askorbik Asidin Vücuttaki Rolü

2.2.10.1 Metabolizmadaki Rolü

Vitamin C 'nin koenzim şekli yoktur, vitamin şekliyle etkisini gösterir. Oldukça güçlü bir asittir ve güçlü bir indirgendir, anyon halinde indirgeme gücü kat kat artar. Bu nedenle metabolizmada "antioksidan" olarak etkindir. Yükseltgenmiş şekli olan L-Deoksiaskorbik asitte bu etki çok zayıftır. C vitaminin prolinden hidroksiprolin, lizinden hidroksilizin oluşumunda ve kalsiyum metabolizmasında etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi vardır. Bütün bunların mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bu reaksiyondaki enzimlerin koenzimlerine "elektron sağlayıcı" olarak etkidiği sanılmaktadır .

2.2.10.2 Farmakolojik Etkisi

Besinlerdeki askorbik asit vücuda alındıktan birkaç saat sonra ince bağırsaktan kana emilir. 100 mg ve daha az vitamin alındığında bunun % 80-90'ının emildiği belirtilmiştir. Bu esnada kandaki düzeyi kısa süre için yükselir. Kan dolaşımı ile dokulara taşınır ve fazlası böbreklerden idrarla dışarı atılır. Gereğinden fazla alınan askorbik asidin bir bölümü de monosakkaritlerde olduğu gibi karbondioksit ve suya okside olur. Son yıllarda yapılan araştırmalar, askorbik asidin bağ dokularından olan kollajen sentezinde görev aldığını ortaya koymuştur. Askorbik asidin steroid hormonlarının sentezinde de görev aldığı bildirilmiştir. Askorbik asit yetersizliğinde, adrenal bezin % 270 oranında büyüme göstermektedir. Askorbik asit bazı toksik ögelerin etkisini azaltmaktadır. Örneğin vücuda alınan nitritlerin kanser yapıcı nitrozoma dönüşümünü önlemektedir. Askorbik asidin efinefrin ile yara ve iltihaplanmaya karşı etkinlik gösteren steroidlerin sentezinde rolü olduğu belirlenmiştir [35].

2.2.10.3 Bilinen Bazı Fonksiyonları [71]

Vitamin C'nin vücudun birçok biyolojik işleminde fonksiyonları vardır.

Kollajen: Kollajen; kas, deri, kemik, kıkırdak, diş, kirişler gibi bağ dokularının kan damarları, sklera ve kornea tabakası gibi dokuların yapısında bulunan bir fibröz protein çeşidir. Kan damarlarına, dişlere, kemiklere, kaslara, deriye, kirişlere, göz korneasına, kıkırdaklara destek yapı sağlayıp, onların korunmasında görev alır (20). Vitamin C, prokollajen içerisinde, prolin ve lizin amino asitlerinin, prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz enzimleri ile hidroksillenmesi işleminde kofaktör olarak görev yapar.

Kan hücreleri: Kan, başta insanlar olmak üzere birçok canlının yaşam sıvısıdır. Dokulara oksijen ve besin, akciğere karbondioksit, böbreklere üre taşımını üstlenir. İçerisinde kırmızı ve beyaz kan hücreleri bulunur. Vitamin C, kanamalarda ve yaraların hızlı iyileşmesinde kırmızı kan hücreleri oluşumunu sağlar.

Antioksidan: Vitamin C, vücudun çok güçlü, suda çözünebilen antioksidanlarıdır. Oksidatif hasara karşı vücudu koruyan etkidir. Kan sıvısı veya hücre sıvısında oluşan zarar verici reaksiyonları nötralize eder. LDL üzerindeki kolesterolü, yağ asitlerini, lipidleri, serbest radikal hasarına karşı korur. Vitamin C'nin bu antioksidan işlevi kalp ve sırası ile bütün vücut dokularının sağlığının korunmasına sağlar.

Hormonlar: Vitamin C, adrenalın hormonu sentezinde büyük rol oynar.

Kardiyovasküler Sistem: Vitamin C, karaciğerde kolesterol üretiminde ve kolesterolerin vücuttan atılabilir asitlere dönüşmesinde rol oynar.

Sinir Sistemi: Vitamin C, triptofan'ın, nörotransmitör olan serotonin'e, dopamin'in, norepinefrin'e dönüşümünde kofaktör olarak rol oynar. Ayrıca noradranilin ve adranalin sentezinde de gereklidir.

Akciğerler: Vitamin C'nin solunum sisteminde de birçok rolü olduğu düşünölmektedir. Bu düşünce vitamin C'nin oksitleyici etkenlere karşı antioksidan etki göstermesinden kaynaklanır. Vitamin C akciğerlerin gelişmesinde, beyaz kan hücrelerinin fonksiyonlarının artmasında ve solunum stresinin düşürölmesinde büyük rol oynar.

Katarakt: Birçok çalışma vitamin C'nin göz sağlığını koruduğunu ispatlamıştır. Vitamin C sağlıklı göz lenslerinde, kan sıvısına oranla 60 kat daha fazla oranla bulunur. Vitamin C, göz lenslerini oksidatif hasara karşı korur.

Diyabet: Diyabet hastalarında fazla vitamin C tüketiminin, dolaşımı düzenleyici etkisi vardır. Ayrıca tip 2 diyabetlerde yeterli vitamin C tüketiminin basıncını düşürücü etkisi ile tansiyon düzenleyici etkisi vardır.

DNA: Kalıtsal bilgiyi taşıyan molekül olarak bilinen DNA, çeşitli reaksiyonlarla hasara uğrayabilir. Bu reaksiyonlardan biri de dichloromethane extracts of valerian (DEV) ile olur. Vitamin C, DEV konsantrasyonunu en aza indirgeyerek, DEV sebebi ile oluşan DNA hasarını en aza indirger.

Endotel Fonksiyonlar: Vitamin C, yüksek derecede egzersiz yapan kişilerde oluşan endotel fonksiyonların bozukluklarını tamir eder.

Hepatit C: Kronik hepatitlere vitamin C verilmesi halinde, interferon (IFN) ve Ribavirin (RBV) beraberliğinde karaciğer enzimlerini normalize eder.

Diğer Fonksiyonları:

- ❖ Vitamin C, deriyi güneş ışığı hasarlarına karşı korur.
- ❖ Vitamin C, yiyeceklerdeki demirin suda çözünür hale dönüşüp vücut tarafından absorplanmasına yardımcı olur.
- ❖ Vitamin C, vücudu kadmiyum, bakır, vanadyum, kobalt, civa ve selenyum'un toksik etkilerine karşı korur.
- ❖ Vitamin C alımı, vücutta mangan absorpsiyonunu artırır.
- ❖ Vitamin C, yağ asitlerinin mitokondriye transferinde, dolayısıyla enerjinin mitokondriye transferinde rol oynayan karnitin sentezi için gereklidir.
- ❖ Vitamin C, minerallerin emilimine (özellikle demir) yardımcı olur.

2.3 Askorbik Asidin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

2.3.1 Askorbik Asit ve Kanser

Dr. Pauling, vitamin C'nin soğuk algınlığı ve kalp rahatsızlığına iyi gelmesinin yanısıra kanser vakalarına da iyi geldiğini savunmuştur [25]. Dr. Pauling, vitamin C ve kanser mekanizmasını şöyle açıklamıştır; Vitamin C, kollajen sentezinin artışına neden olarak tümörlerin bitişik hücrelere yayılmasını engeller. Bu sayede vitamin C kanser hücreleri ile savaşır [72]. Birçok araştırmacı da vitamin C ve kanser mekanizmasının şöyle işlediğini öne sürer; Serbest radikaller DNA'ya zarar vermeden önce vitamin C tarafından deaktive edilir. Böylece yeni tümör oluşumları engellenir [73]. Mekanizması ne olursa olsun, vitamin C kanser tedavisinde kullanılabilecek çok güzel bir antioksidandır [74].

2.3.2 Vitamin C ve Ateroskleroz

Ateroskleroz gelişiminde LDL kolesterolü, lipid peroksidasyonu ve lipidlerin oksidatif modifikasyonu önemli etki yapar. Vitamin C, LDL kolesterolünün, yağ asitlerinin, lipidlerin oksidasyonunu engeller. Bu sayede vitamin C ile ateroskleroz gelişimi yavaşlatılabilir [71].

2.3.3 Askorbik Asit ve Yaraların İyileşmesi

Vitamin C, yaraların iyileşmesinde ve tamirinde kollajen sentezine yardımcı olarak önemli rol üstlenir. Günlük 500-1000 mg vitamin C tüketiminin yaraların iyileşmesini hızlandırdığı savunulmaktadır [71].

2.3.4 Askorbik Asit ve Soğuk Algınlığı

Askorbik asidin soğuk algınlığı önleyici önemli bir etkisi vardır. Askorbik asit bağışıklık sistemini güçlendirir. Bu sayede soğuk algınlığı gibi rahatsızlıkları iyileştirir. Dr. Pauling, günde 1-2 g askorbik asit tüketiminin soğuk algınlığını iyileştirdiğini savunur [71].

2.3.5 Askorbik Asit ve Skorbüt

Vitamin C, kollajen sentezinde prokollajen içinde yer alan prolin ve lizin amino asitlerinin, prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz enzimleri ile hidroksillenmesinde kofaktör olarak görev yapar. Vitamin C eksikliğinde prolin ve lizin hidroksillenemez, dolayısı ile kollajen lifleri çapraz bağ oluşturamaz. Meydana gelen lifte gerilme kuvveti oldukça az olur. Sonuç olarak skorbüt hastalığı meydana gelir. Bu hastalık genel olarak diş eti kanamaları ile kendini gösterir [71].

2.3.6 Askorbik Asit ve Hamilelik

Hamile kadınlarda C vitamini eksikliğinin damar sertliğine yol açarak preklampsiye (tansiyon artışıyla üre yükselmesi) yol açabildiği saptanmıştır. Uzun zamandan beri C vitamininin preklampsi riskini azalttığı bilindiğini anımsatan, fareler üzerinde yapılan deneylerden alınan sonuçları açıklayan uzmanlar, hamilelerde C vitamini eksikliğinin damarlarda esnekliği yok ettiğini, hamile olmayanlarda aynı sonucun ortaya çıkmadığını bulmuşlardır (25). Preklampsi geçiren kadınların, hamilelikten sonra da bazı hastalıklara yakalanma riski taşıdıklarına işaret eden uzmanlar, risk grubunda özellikle 25 ve 35 yaş civarında yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve böbrek rahatsızlıklarının görülebileceğini söylemişlerdir [75].

2.3.7 Askorbik Asit ve Alzheimer Hastalığı

Vitamin C, koruyucu rolü olan bir antioksidandır ve serbest radikallerin beyine verdiği hasarı engeller. Normal hücre fonksiyonları serbest radikal denilen yan ürünleri oluşturur ve bu serbest radikaller hücre yapısına ve genetik materyallere zarar vermektedir. Serbest radikallerin verdiği bu zarar oksidatif stres yaratarak, alzheimer hastalığının ilerlemesine sebep olmaktadır. Böyle bir durumda ilk bakılması gereken vitamin C'nin etkinliğidir. Sınırlı da olsa vitamin C ilginç sonuçlar verebilir. Bununla birlikte vitamin C ve vitamin E kombinasyonlarının kullanımının bireylerde alzheimer hastalığının ilerleyişini azalttığı görülmektedir. Birçok araştırma sonucu vitamin C'nin alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılabileceği ortaya konmuştur [76].

2.4 Askorbik Asidin Tanınma ve Tayin Yöntemleri

2.4.1 Tanınma Yöntemleri

Askorbik asidin tanınması ilk olarak 1927'de Tillmans tarafından 2,6 diklorofenolindofenol (2,6-DCIP) ile yapılmıştır. Sonraki çalışmalarda çeşitli belirteçlerle renkli türevler oluşturduğu saptanmıştır.

Çizelge 2.5 Askorbik asidin tanınmasında kullanılan belirteçler

Belirteç	Tillmans	Emmergie-Engel	Benedict	Nessler	Paladyum klorür	Fosfomolibdik Asit
Renk	Pembe	Kırmızı-kahve	Kırmızı	Siyah	Siyah	Mavi-gri
Kaynak no	[21]	[23]	[35]	[35]	[35]	[24]

Askorbik asidin tanınma ve miktar tayini yöntemleri çoklukla yüksek indirgeme yeteneğine dayanır. Bu yöntemlerde bir metal iyonunun redüksiyonu ile kararlı bir renkli çözelti oluşumu (potasyum ferrasiyanür, feri trikloroasetat) metal iyonunun askorbik asit tarafından redüksiyonu ve kelat yapıcı bir bileşik ilavesiyle renkli bir kompleks oluşumu söz konusudur. Tanınma için türevlendirme reaksiyonları da kullanılmıştır. Bu alanda ilk çalışmalar Schmall ve arkadaşları tarafından askorbik asidin diazolanmış 4-metoksi-2-nitroanilin ile oluşturduğu mavi renkli üründen yararlanılarak yapılmıştır. Sonraları diazolanmış p-aminobenzoik asit, diazolanmış p-nitroanilin redoks türev belirteci olarak kullanılmıştır. Askorbik asidin tanınmasında ince tabaka kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi yöntemleri de kullanılmıştır [35].

2.4.2 Miktar Tayin Yöntemleri

Askorbik asit analizlerinde genellikle kimyasal yöntemler kullanılır. Biyolojik yöntemler uzun ve pahalı olduğundan kullanılmaz.

Kimyasal yöntemler, askorbik asidin indirgenme yeteneğine dayanır. Bunlardan en çok uygulananları; 2,6-diklorofenolindofenol (2,6-DCIP), M-bromosüksinim (MBS) ve

iyot çözeltisiyle oksidimetrik titrileme, diazolanmış 2-nitroalinin ve 2,4-dinitro fenil hidrazin ile yapılan kolorimetrik yöntemdir.

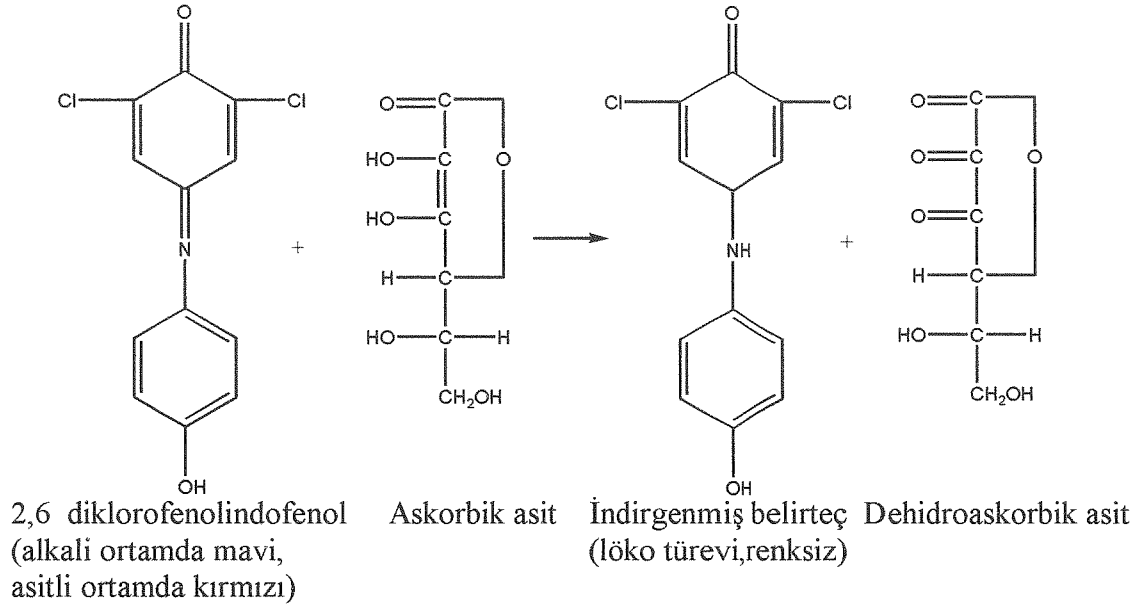
Oksidimetrik titrileme yöntemi çabuk ve kolay olarak taze meyveler ve sebzelerde kullanılır. Fakat bu yöntem askorbik asitten başka maddeler de olduğundan pek doğru sonuç vermez.

Diazolandırılmış 2-Nitroanilin ile yapılan analizde, alkali çözeltide meydana gelen kırmızı-mavi boyar madde kolorimetrik olarak belirlenir. 2,4-dinitro fenil hidrazin ile yapılan analizde, askorbik asit dehidroaskorbik aside yükseltgenir ve bu reaktifle verdiği kırmızı boyar madde ölçülür. Bu son yöntemde askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin toplamı belirlenir. Birincisinden titrilemeden, ikincisinde renk reaksiyonundan önce asitli ortamda dehidroaskorbik asit kükürtlü hidrojen ile indirgemekle askorbik aside dönüşür [71].

Askorbik asit tayin yöntemleri hakkında yapılan çalışmaların bir kısmı özetlenmiş olup, diğer çalışmalar Tablo 6'da derlenmiştir.

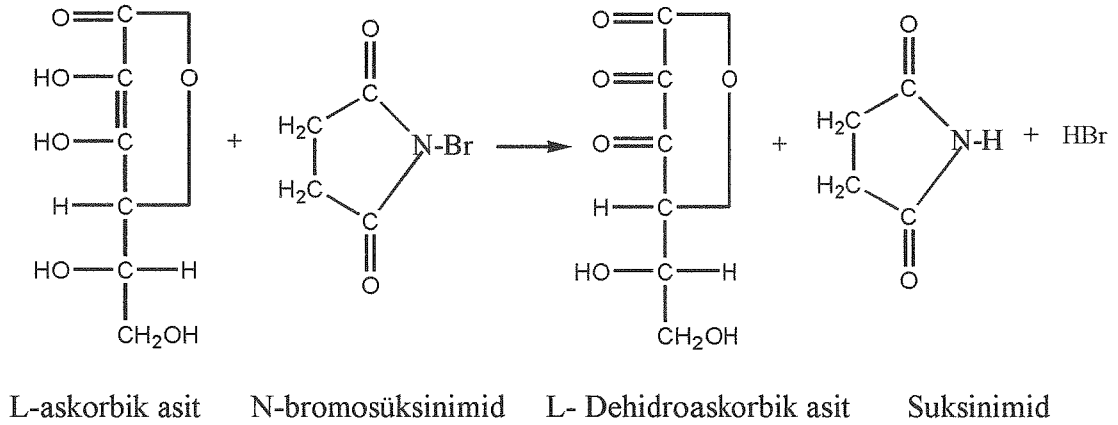
2.4.2.1 Titrimetrik Yöntemler

Askorbik asidi titre edebilmek için çok çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır. 2,6 diklorofenolindofenol (2,6-DCIP) askorbik asidi titre etmek için kullanılan en yaygın maddelerden biridir. 2,6-DCIP'nin kullanıldığı yöntemde, 2,6-DCIP asidik ortamda askorbik asidi yükseltger. 2,6-DCIP'nin renkli olmasından dolayı renk kaybolmayıncaya kadar titrasyon yapılır. Yani kullanılan titrant aynı zamanda indikatördür. Bu yöntem çok kullanılan yöntem olmasına rağmen, Sn(II), Cu(I), SO₂, S₂O₃²⁻ gibi maddeler içeren numunelere uygulanması zordur. Bu yöntemin uygulanması için bu gibi maddelerin numunelerde bulunmaması gerekir [77].



Şekil 2.5 2,6 diklorofenolindofenol'ün kullanıldığı yöntem

1960' lı yılların başında, N-bromosüksinimid, askorbik asit titrasyonunda nişastanın indikatör olarak kullanıldığı bir ortamda titrant olarak kullanılmaktaydı. Demir tuzları bu titrasyona girişim yapmazlar. Fakat meyvesularında koruyucu olarak kullanılan bisülfid iyonu sonuçlara tam ulaşılmasına engel olmaktadır. Bununla birlikte, bisülfid iyonu ortamdaki asetonla çekilerek tayindeki girişim giderilmiş olur [77].



Şekil 2.6 N-bromosüksinimid'in kullanıldığı yöntem.

Başka bir çalışmada içerisinde kloramin T bulunan asidik KBr veya KI karışımı askorbik asit titrasyonu için öngörülmüştür. Titrasyonun dönüm noktası ise, nişasta-iyot

arasındaki mavi rengin oluşması veya bromun metilen kırmızısı renginin ortaya çıkması ile anlaşılmaktadır [77].

Tetraklorobenzokinon askorbik asit için tavsiye edilen başka bir titranttır. Tetraklorobenzokinonun kullanıldığı titrasyon, hem indikatör hem de girişim yapan metallere maskeleye yaptığı için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) ortamda yapılmaktadır. Titrasyonun bitişi ortaya çıkan altın sarısı renkten anlaşılmaktadır. Bu yöntem sitrik asik, oksalik asit, tartarik asit, glukoz, sukroz, maltoz gibi maddelerin girişiminden etkilenmektedir. Fakat tiyol benzeri, sistein, o-merkaptobenzoik asit ve 3-merkaptopropiyonik asit gibi maddelerin girişimine uğramamaktadır. Bununla birlikte girişim yapan bu maddelerin etkisi akrilamid gibi bir madde ile maskelenmek suretiyle giderilebilir [78].

C vitamininin potansiyometrik titrasyonu için N-bromofitalimid veya N-bromosakkarin maddeleri kullanılmıştır. Kumar ve İndresen'an yaptığı çalışmalarda, sadece askorbik asidin bulunduğu çözeltide titrant olarak N-bromosakkarin'i kullanarak askorbik asidin mikro tayinini gerçekleştirmişlerdir [79].

O-iyodobenzoat ve o-diasetooksibenzoatda askorbik asit titrasyonunda kullanılmaktadır. İndikatör olarak ise KI'nın fazlası ve leuso-2,6-diklorofenol indofenol kullanılmaktadır. Titrasyonun dönüm noktası ortaya çıkan mavi renk ile anlaşılmaktadır [80].

Talyum(III) perklorat ve bakır(II) sülfat asidik ortamda askorbik asit titrasyonu için kullanılmış titrantlardır. Ancak bu maddeleri kullanmak için azot atmosferi gerekmektedir. Titrasyonun dönüm noktası ortamdaki rengin pembeden renksiz hale gelmesi ile anlaşılmaktadır. Bu titrasyonda talyum(III)'ün tayin edilmesiyle askorbik asit dolaylı şekilde tayin edilebilir [81].

Seryum(IV) sülfat, askorbik asit tayini için çok uzun zamandan beri kullanılan bir maddedir. Aşırı eklenen seryum(IV) sülfat çözeltisinin askorbik asit ile tepkimeye girmeyen kısmı Fe(II) ile geri titre edilerek askorbik asit miktarı belirlenmektedir. İndikatör olarak ise difenilbenzidin, N-feniltantrolikasit veya Rodamin 6G kullanılır.

Potasyum hekzasiyanoferrat ise hafif bazik ortamda askorbik asit için kullanılan bir titranttır. Bu titrasyonda ise indikatör olarak 2,6-DCIP kullanılmıştır [82].

Ferri triklorasetatin titrant olarak kullanıldığı doğrudan titrasyon yöntemi ile de askorbik asit tayini yapılmaktadır. Sıvı askorbik asit numunesi üzerine tampon çözelti ve kloroform eklendikten sonra ferriyum triklorasetat ile doğrudan titre edilir. Titrasyonun sona erdiği açık mavi rengin ortaya çıkması ile anlaşılır [83].

2.4.2.2 Elektrokimyasal Yöntemler

Birçok polarografik yöntem o-fenilendiamin ile dehidro askorbik asidin kondenzasyonu sonucu ortaya çıkan yükseltgenme dalgasını kullanarak uygulanmaktadır. Eşit ya da düşük derişimli o-fenilendiamin, dehidroksi askorbik asit için kuvvetli dalga verir. Bu yöntemde askorbik asidi yükseltgemek için gümüş nitrat, 2,6-DCIP ve buna benzer yükseltgenler kullanılmış ve portakal suyunda askorbik asit tayini yapılmıştır [77].

Başka bir çalışmada L-askorbik asit ve D askorbik asit eş zamanlı olarak alternatif akım polarografik yöntem ile ayrı ayrı tayin edilmiştir [77].

Askorbik asit tayini için bir amperometrik sensör, askorbat oksidaz enziminin kollajen zar veya glutaraldehit üzerine immobilize edilmesi ile hazırlanabilir. Bu elektrod D-askorbik aside de duyarlıdır. Askorbik asit tayini 1,15 V da hazırlanan bu elektrod kullanılarak potasyum dikromat ile amperometrik titrasyon ile yapılmıştır [77].

Bir başka çalışmada geçirgen karbon elektrot ve askorbatoksidaz içeren elektrod kullanılarak kulometrik olarak askorbik asit tayini yapılmıştır. Askorbik asit tayini için çok sınırlı uygulama alanı olmasına rağmen, belli miktar askorbik asidin platin elektrod yüzeyinde yükseltgenmesi ile yapılır. Fakat çözültide sadece askorbik asit bulunması gerekir [77].

Şahbaz ve Somer yaptıkları çalışmalarda, bazı sebze ve meyvelerde uygun destek elektrolit kullanmak suretiyle L-askorbik asit tayinini polarografik olarak gerçekleştirmişlerdir [83].

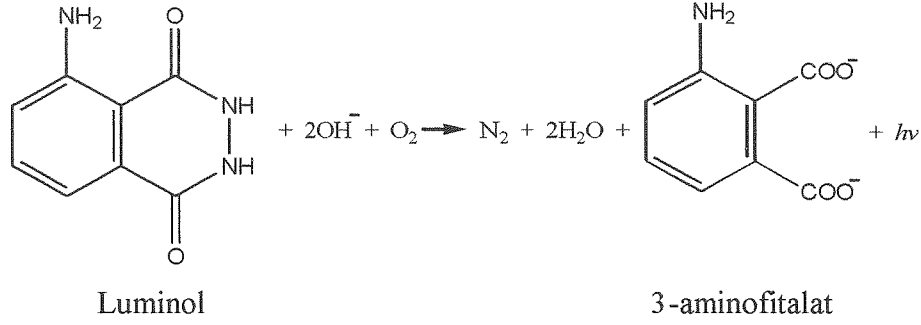
Bir diğerk çalışmada, askorbik asidin $2,0 \times 10^{-6}$ - $6,0 \times 10^{-3}$ M arasındaki derişimleri FIA sistemde kare dalga voltametri ile ölçölmektedir. C vitamini, o-fenilendiamin ile muamele edildikten sonra değişik içeceklerde bu yöntem ile askorbik asit tayini gerçekleştirilmiştir [84]. Askorbik asidin voltametrik analizinde çeşitli elektrolit tür ve pH'larının voltamogramlar üzerine etkisi hem ıplak Au, Pt ve camsı karbon elektrodu üzerinde hem de poli(3-metiltiyofen) elektrodu üzerinde incelenmiştir. Kare dalga voltametri parametreleri optimize edilerek, çeşitli vitamin tabletlerinde ve taze meyve sularındaki miktarları analiz edilmiştir [85].

Paim APS ve arkadaşları, IO_3^- ile askorbik asidi tepkimeye sokarak ortaya çıkan I'yi iyon seçici elektrod kullanarak belirlemişler ve potansiyometrik titrasyon ile askorbik asit miktarını tayin etmişlerdir [86].

2.4.2.3 Kemilüminesans Yöntemler

Askorbik asit tayini için Cu(II)-lüminol, Ce(IV)-rodamin 6G, Fe(II)-lüminol, $KMnO_4$ - lüminol gibi bir çok sistem mevcuttur. Bu sistemler ya askorbik asidin yükseltgenmesi ile ortaya çıkan yada yükseltgenmeden arta kalan maddelerin lüminesan oluşturucu maddelerle etkileşmesi ile yapılmaktadır [87].

Bir kemilüminesans reaksiyonda elektronik olarak uyarılmış türün temel duruma dönerken yaydığı ışınlardan yararlanılır. Reaksiyon koşulları kemilüminesansın oluşmasında önemli etki yapar. Kemilüminesans ışının şiddeti, kimyasal reaksiyonun hızına, uyarılmış durumun oluşma etkinliğine, uyarılmış halin kemilüminesans yayma etkinliğine bağlıdır. Bu yöntemin tercih edilmesinin sebepleri, duyarlığın yüksek olması, tespit sınırlarının oldukça düşük seviyelere inebilmesi ve cevabının hızlı olmasıdır. Kemilüminesans yöntemlerde çoğunlukla lüminolün (5-amino,2,3-dihidrofitalazin) O_2 , H_2O_2 veya diğer kuvvetli oksitleyicilerle verdiği kemilüminesans tepkimeleri esas alınır [88].



Şekil 2.7 Luminolün Kemilüminesans Reaksiyonu

2.4.2.4 Kinetik Yöntemler

Vitamin C tayini için, Tang B ve arkadaşları, askorbik asidin 1,5-bis (p-hidroksibenzaiden) tiyokarbazon bileşiğinin H₂O₂ ile horseradis peroksidaz enziminin tepkimesine inhibitör etki gösterdiğini bulmuşlardır. Askorbik asidin derişimi bu tepkimenin hızına göre, enzimatik inhibasyon tekniği ile, askorbik asit miktarını tayin etmişlerdir [89].

2.4.2.5 Florimetrik Yöntemler

Florimetrik yöntem, insan kan serumu, meyve ve sebzelerde bulunan askorbik asit içeriğini tayin için kullanılan bir yöntemdir. Floresans tür, dehidro askorbik asit ile floresans yapan türün tepkimesi sonucu oluşan maddedir. O-fenilendiamin floresans yapıcı maddeler arasında en çok kullanılanıdır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için ilk olarak askorbik asidin uygun bir madde ile yükseltgenerek dehidro askorbik aside dönüştürülmesi gerekmektedir. Askorbik asit yükseltgendikten sonra uygun bir madde ile floresans tür oluşturularak tayin gerçekleştirilmektedir [77].

Başka bir çalışmada askorbik asit yükseltgendikten sonra 1,2-diamino-4,5-dimetoksibenzen ile tepkimeye sokulmuş ve floresans tür oluşturulmuştur. Oluşan tür florimetrik yöntemle tayin edilerek askorbik asit miktarına ulaşılmıştır [77].

2.4.2.6 Diğer Tayin Yöntemleri

Yebra ve arkadaşları, askorbik asidi tayin etmek için asidik ortamda aşırı miktarda Cr(VI)'yı askorbik asidin olduğu çözeltiye eklemişlerdir. Cr(VI)'nın askorbik asit ile tepkimesi sonucu Cr(VI), Cr(III)' e dönüşmektedir. Oluşan çözelti şelatlandırıcı poli(amino fosforik asit) reçinesinden geçirildiğinde Cr(III) reçinede tutunmakta Cr(VI) ise tutunmadan geçmektedir. Tutunmadan geçen Cr(VI)'yı alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile tayin ederek askorbik asit miktarına geçmişlerdir [90]

Diğer bir çalışma da askorbik asit tayini için Yebra ve arkadaşları, asidik ortamda aşırı miktarda Mn(VII)'yı askorbik asidin olduğu çözeltiye eklemişlerdir. Mn(VII)'nın askorbik asit ile tepkimesi sonucu Mn(VII), Mn(II)'ye dönüşmektedir. Oluşan çözelti şelatlandırıcı poli(amino fosforik asit) reçinesinden geçirildiğinde Mn(II) reçinede tutunmakta Mn(VII) ise tutunmadan geçmektedir. Tutunmadan geçen Mn(VII)'yı FAAS ile tayin ederek askorbik asit miktarına geçmişlerdir [91].

Norozifar ve arkadaşları, askorbik asit içeren çözeltiyi silikajel üzerine tutturulmuş iyot içeren kolondan geçirmişlerdir. Askorbik asit iyot kolondaki iyot ile tepkimeye girip yükseltgenir. Kolondan çıkan çözeltinin 245 nm de absorbansını ölçmüşlerdir. Daha sonra başlangıçta hazırlanan aynı çözelti iyot tutturulmamış kolondan geçirerek kolondan çıkan çözeltinin absorbansını yine aynı dalga boyunda ölçerek ilk değerden çıkarmışlar ve net absorbans değerinden yararlanarak askorbik asit miktarını tayin etmişlerdir [92].

Themelis ve arkadaşları, akışa enjeksiyon sistemde (FIA) askorbik asit bulunan ortama Fe(III) katmışlar, Fe(III) ile askorbik asit tepkimeye girerek askorbik asit miktarı ile orantılı Fe(II) oluşturmuştur. Oluşan Fe(II)'yi 2,2-dipridin-2-pridihidrazon ile kompleks haline getirip bu kompleksin değişimini UV ile belirleyerek askorbik asit miktarını tayin etmişlerdir [93].

2.4.2.7 Farmakolojide Kullanılan Yöntemler

1. 2,6-diklorofenol-indofenol ile titrasyon yöntemi,
2. İyot veya kloramin ile titrasyon yöntemi,
3. N-bromosüksinimid ile titrasyon yöntemi,
4. Sodyum 1,2-naftokinon-4-sülfonat ile titrasyon yöntemi,
5. Hekzamin kobalt(III) trikarbonat kobalt(III) ile titrasyon yöntemi,
6. Kompleksometrik yöntem,
7. Mikroflorimetrik yöntem,
8. Diazolanmış 4-metoksi-2-nitroanilin ile spektrofotometrik tayin yöntemi,
9. Diazolanmış p-nitroanilin ile spektrofotometrik tayin yöntemi,
10. 4-nitrobenzen diazonyum floroborat ile fotometrik tayin yöntemi,
11. 3,4-dinitrobenzoik asitle kolorometrik tayin yöntemi,
12. Fosfomolibdato kompleksi ile kolorometrik tayin yöntemi,
13. 2,3,5-trifenil tetrazolium klorür yöntemi,
14. Potasyum ferrisiyanürle fotometrik tayin yöntemi,
15. pH=8 tamponu ile polarografik tayin yöntemi,
16. pH=5,2 tamponu ile polarografik tayin yöntemi,
17. İyotla potansiyometrik titrasyon yöntemi,
18. Bakır sülfatla potansiyometrik titrasyon yöntemi,
19. Kağıt kromatografisi ile izolasyondan sonra tayin yöntemi,
20. İnce tabaka kromatografisi ile tayin yöntemi,
21. Gaz kromatografisi ile tayin yöntemi.

2.4.3 Meyve ve Sebzeler İçin Kullanılan Yöntemler

1. 2,6-diklorofenol-indofenol ile titrasyon yöntemi,
2. Spektrofotometrik yöntemler
3. İndofenol-ksilen özütlemeye yöntemi [94]

Çizelge 2.6 Askorbik asit tayini için kullanılan diğer spektrofotometrik çalışmalar

Analit	Tanımlama	Doğruluk/Kesinlik	Kaynak
Sebzeler, Meyveler	3. derecede türev UV spektrofotometri, 259,4 nm- 276,2 nm, 227 nm- 237 nm	RSD: %0.53-2.45	95
Meyvesuyu, Katkı maddeleri, Ürün	Katı faz UV spektrofotometri, Fe(III) komplekslerinin ferrozin ile indirgenmesi	RSD: %0.91	96
Katkı maddeleri, Ürün	Katı faz UV spektrofotometri,	RSD: 0.74 DL: 0.05 µg/ mL ⁻¹	97
İlaçlar	2. derecede türev UV spektrofotometri, 272nm, Alternatif olarak, TLC ile 260nm	RSD: %2.4 2. derece türev RSD: %0.6	98
Katkı maddeleri, Süt, Ürün, Sebzeler	n-bütanol ile ekstraksiyon yapılarak Fe(III) iyonlarının Fe(II)-4-(2-piridilazo) kompleksine indirgenir	CV: %2.9 Gerikazanım: %97-102	99
Meyveler, Sebzeler, Meyvesuları	267.5 nm'de 2. derece türev spektrofotometri, 1.0 M HCl ile ekstraksiyon yapılır.	DL: 4.2 x 10 ⁻⁶ M	100
Yiyecekler, İlaçlar	İki katı fazlı reaktörler; 1. Reaktör-%30 katı I ₂ 2. Reaktör silikajel	RSD: %1.0-5.0	101
İlaçlar	C ₁₈ SPE kolonunda çözülmüş rutin ve askorbik asidin 262 nm de ölçümü yapılır.	RSD: %0.7	102
Katkı maddeleri, Yiyecekler	Fe(III) tiosiyanat kompleksinin Fe(II) kompleksine askorbik asid yardımıyla indirgenmesi, 462nm de ölçüm yapılır.	DL: 0.36 mg mL ⁻¹ RSD: %2.0	103
Meyvesuyu, Kırmızı şarap, Katkı maddeleri	Cu(II) nin Cu(I) e 2,9-dimetil 1,10-entrolin-Cu(I) yardımıyla indirgenmesi, 450nm de ölçüm yapılır.	RSD: %3	104
Vitamin C tabletleri	Askorbik asit ve OPD nin kondenzasyon reaksiyonu ile pH=9.4 te 360nm ve 440 nm de absorbans ölçümü yapılır.	DL: 0.006 µg/mL	105

ARAŞTIRMA ÇALIŞMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER HAKKINDA GENEL BİLGİLER

3.1 Türev Spektroskopisi

3.1.1 Türev Spektroskopisi Hakkında Genel Bilgi

Türev spektroskopisi, UV-VIS spektroskopisinin nispeten yeni bir uygulamasıdır. 1950'li yıllarda absorpsiyon spektrumlarının ayrıntılarının belirginleşmesi amacıyla ortaya konmuş ancak analitik kimyada uygulaması 1970'li yıllarda analitik cihazlarda çalışılmaya başlanması ile başlamıştır(57). Türev spektrofotometrisinde klasik absorpsiyon spektrumlarının yerine, türev spektrumları ile işlem yapılır. Türev spektrumlarındaki matematiksel işlemler spektrofotometredeki bilgisayarda yapılmaktadır(57). Bu fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dy/dx dir. Absorpsiyon spektrumlarında ise türev $dA/d\lambda$ 'dir. Spektrumun herhangi bir noktasındaki türev değeri hesaplanıp, dalga fonksiyonu olarak grafik elde edildiğinde 1. türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde $d^2A/d\lambda^2$, $d^3A/d\lambda^3$ derecesinde türev spektrumları elde edilir(57). Absorpsiyon spektrumlarında herhangi bir dalga boyunda $A=εbc$ eşitliği geçerlidir, n. Derecede türev spektrumlarında türev absorbansı "D" ile konsantrasyon arasındaki ilişki formülü yazılabilir(57). Absorbans molar absorptivite ile doğru orantılı olduğu için: $^nD = d^nA/d\lambda^n = d^nε/d\lambda^n$ bc yazılabilir. Görüldüğü gibi türev absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında doğrusal ilişki vardır. Türev spektroskopisi ile kantitatif analiz yapılabilir. (57)

3.1.2 Spektroskopide Kullanılan Çözücüler

Spektroskopide kullanılacak çözücülerde aranan başlıca özellikler şunlardır:

- 1)Spektrumu alınacak maddeyi çözmeli
- 2)Spektrumu alınacak maddenin absorplama yaptığı alanda absorplama yapmamalı
- 3)Polar olmamalı
- 4)Çözdüğü maddelerle reaksiyona girmemeli

Absorplama alanları aynı ve spektrumu alınacak maddeyi çözen iki çözücünden polar olmayanı tercih edilmelidir. Çünkü, daha önce söylendiği gibi polar çözücülerde spektrumun incelikleri kaybolur. Ultraviyole alanında çok kullanılan çözücüler aşağıda verilmiştir(58).

Çizelge 3.1 UV alanda en çok kullanılan çözücüler

Su	180 nm'den sonra absorplama yapmaz
Hekzan	200 nm'den sonra absorplama yapmaz
Sikloheksan	200 nm'den sonra absorplama yapmaz
Kloroform	300 nm'den sonra absorplama yapmaz
Karbontetraklorür	260 nm'den sonra absorplama yapmaz
Metanol	290 nm'den sonra absorplama yapmaz
Etanol	220 nm'den sonra absorplama yapmaz
Propan-2-ol	245 nm'den sonra absorplama yapmaz
Asetonitril	255 nm'den sonra absorplama yapmaz
Dimetilsülfoksit	300 nm'den sonra absorplama yapmaz
Dioksan	290 nm'den sonra absorplama yapmaz
Etil asetat	310 nm'den sonra absorplama yapmaz
Aseton	330 nm'den sonra absorplama yapmaz

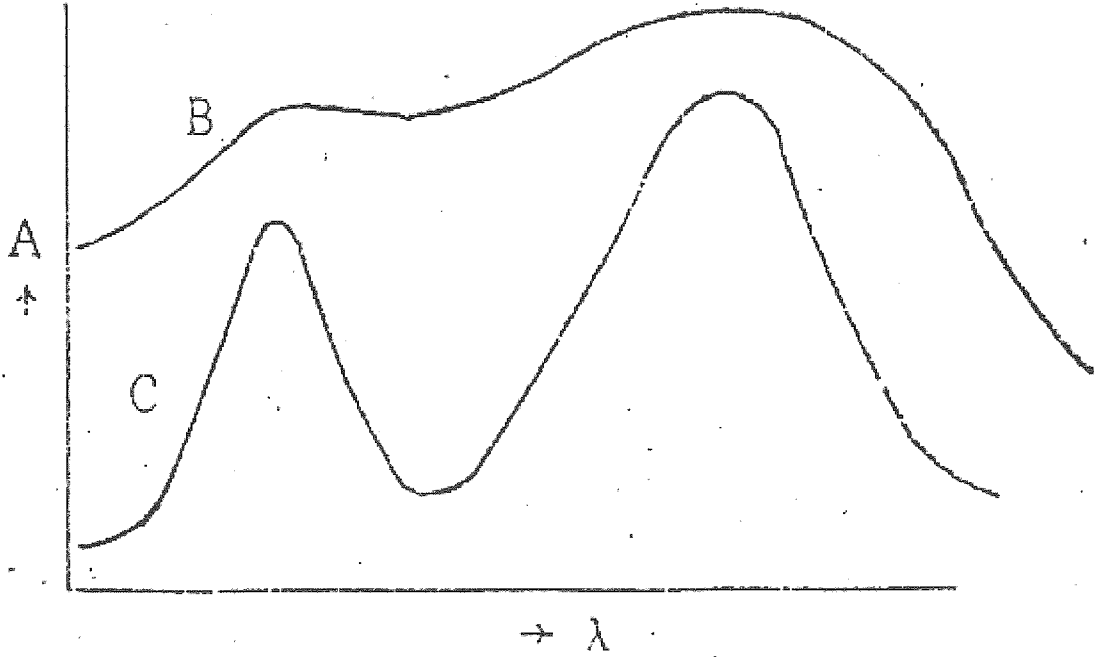
Spektrum alınırken kuvvetlerin ışın geçen yüzlerine elle dokunulmamasına, çözelti içinde parçacıkların ve hava kabarcıklarının bulunmamasına dikkat edilmelidir.

3.1.3 Ultraviyole Spektroskopisinde Absorpsiyon Değerleri

Ultraviyole cihazlarında absorpsiyon 3'e kadar ölçülebilir. Ama, en iyi sonuçlar 0,2-0,9 absorbans değerlerinden alınır. Absorplamayı bu aralığa getirmek için çözelti duruma göre seyreltilir veya deriştirilir(59).

3.1.4 Slit Aralığının Spektruma Etkisi

Bir spektrumun mümkün olduğu kadar dar slit aralığıyla alınması gerekir. Aksi halde spektrumun birçok karakteristik yönleri kaybolur. Aşağıdaki şekilde (B)'de bir maddenin geniş slit aralığıyla, (C)'de dar slit aralığıyla alınmış spektrumları görülmektedir. Geniş aralıkta spektrumun bazı özellikleri kaybolmaktadır. Monokromatik ışın demeti elde etmek için sadece monokromatörün slit aralıklarının da mümkün olduğu kadar dar olması gerekir(58).



Şekil 3.1 Spektrumun slit aralıklarına bağlılığı. B'deki aralık C'dekinden daha büyük.

3.1.5.Ultraviyole Spektroskopisinden Sağlanan Yararlar

Ultraviyole spektroskopisinden çeşitli yönlerinden yararlanılır. Bunlar başlıca şunlardır:

- 1)Kalitatif analizde
- 2)Kantitatif analizde
- 3)Titrasyonda
- 4)Molekül ağırlığı tayininde
- 5)Yük aktarma kompleksi oluşumunda
- 6)Asit ve bazlık sabitleri tayininde
- 7) Kompleks stokiyometrisinin ve sabitinin bulunmasında

3.1.5.1.Kalitatif Analiz:

Bilinmeyen bir madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum, her yönüyle daha önce alınmış olan spektrumla karşılaştırılır. Bilinmeyen maddenin spektrumu daha önceki spektrumlardan hangisine uyuyorsa, bilinmeyen madde, spektrumun kendisinininkine uyan maddedir.

Kalitatif analizlerde maddenin maksimum ϵ değerinin de büyük ölçüde dikkate alınması gerekir. Dalga boyu değeri absorplama katsayısı değeriyle desteklenmektedir(58).

3.1.5.2.Kantitatif Analiz:

Işının absorplaması üzerine kurulmuş olan tayin metodları analitik kimyacı için çok yararlı ve güçlü metodlardır. Bu metodların klasik metodlara başlıca üstünlükleri şunlardır.

- 1.Sonuç çabuk alınır ve çalışmacı fazla yorulmaz.
- 2.Doğruluk derecesi oldukça yüksektir. %1-3 hatayla sonuç alınabilir. Tedbir olarak hata binde 1-2 ye kadar indirilebilir.
- 3.Her maddenin kendine özgü bir absorplama piki olduğundan seçiciliği yüksektir.
- 4.Molar absorplama katsayısı 10000'den büyük olan maddelerin 10^{-7} M konsantrasyonları bile tayin edilebilir.

5.Uygulama alanı da oldukça geniştir. Şu kromofor gruplarından bir veya birkaçını içeren maddeler kolaylıkla tayin edilir.

Çifte bağlar	Karboksil grubu
Üçlü bağlar	Karbonil grubu
Nitro grubu	Amid grubu
Nitrozo grubu	Fenol grubu
Azo grubu	Renkli iyonlar veya renklendirilebilen iyonlar.

Kantitatif analiz için ilk şart, tayini yapılacak maddeyi bilmektir. Bundan sonra birtakım işlemler yapmak gerekir. Bunları şöyle özetlemek mümkündür(58).

- 1.Tayini yapılacak maddeyi saflaştırmak
- 2.Tayinin yapılacağı dalga boyunu seçmek
- 3.Tayinin sıcaklığını ayarlamak
- 4.Tayin için uygun çözücü seçmek ve pH'ını ayarlamak
- 5.Tayin için çalışma grafiğini çizmek

Maddeyi Saflaştırmak: Tayini yapılacak maddenin saflaştırılması, kristalizasyon, destilasyon, süblimasyon, kromatografi gibi çeşitli metodlarla yapılır.

Dalga Boyunu Seçmek: Tayin için maddenin spektrumunda en şiddetli absorpsiyon pikinin bulunduğu dalga boyu seçilir. Bunun başlıca nedenleri şunlardır:

- 1)Düşük konsantrasyonlarda bile oldukça büyük absorpsiyon değerinin okunabilmesi.
- 2)Absorpsiyon piklerinin tepeleri oldukça düz olduğundan, dalga boyu seçiminden gelen hatanın minimuma indirilebilmesidir.

Sıcaklığını Ayarlamak: Bir maddenin absorplaması sıcaklığa da bağlı olduğundan, molar absorplama katsayısı hangi sıcaklıkta tayin edilmişse, kantitatif analiz de o sıcaklıkta yapılmalıdır

pH Ayarlanması: pH ayarlanması kompleks oluşumunda çok önemli bir rol oynadığından pH'nın iyi ayarlanması gerekir. Ayarlanma tampon çözeltiler kullanılarak yapılırsa daha iyi olur.

Çalışma Grafiği Çizmek: Kantitatif tayinler, her ne kadar literatürde verilen molar absorplama katsayılarını kullanarak (Lambert-Beer Kanunu)

$$A=\epsilon bc \quad (3.1)$$

bağıntısıyla yapılırsa da, hatalı cihazların ve çalışmacıların bulunabileceği düşüncesiyle, bir çalışma grafiğinin çizilmesi çok daha yerinde olur. Çalışma grafiği için tayini yapılacak maddeden elde ayrıca saf olarak bulunmalıdır. Bu saf maddeden hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltilerin absorpsiyonları ölçülür, bir konsantrasyon-absorpsiyon grafiği çizilir. Bundan sonra tayini yapılacak maddeden çalışma grafiğindeki şartlar aynen yerine getirilerek bir çözelti hazırlanır ve absorpsiyon ölçülür. Ölçülen bu absorpsiyondan konsantrasyon hesaplanır(58).

3.1.5.3. Molekül Ağırlığı Tayini

Çok özel şartlarda bir maddenin molekül ağırlığı spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. Bunun için maddenin,

- ✓Saf olması,
- ✓İyi bir çözücünün bulunması,
- ✓Absorplama şiddeti belli izole bir fonksiyonel grup içermesi gerekir.

3.2 Türev Spektroskopisi Yöntemi

Yöntemin ilkesi saf referans askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisinde (metafosforik asit-asetik asit (%3-8) çözeltisi) hazırlanmış konsantrasyonu bilinen değişik çözeltilerinin, maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyunda, ekstraksiyon çözeltisine karşı, gıda örneğiyle karşılaştırılması esasına dayanır. Türev Spektroskopisi prensibi klasik absorpsiyon spektrumlarının yerine türev spektrumlarının kullanılmasıdır. Temel amaç ayırım gücünü arttırarak iyi ayırt edilemeyen pikleri ayırt etmek ve değişik özelliği olan zemin spektrumunun etkisini düşürmektir. Bandın genişliğini düşürüp

daha keskin bir hale dönüştürdüğünden bantların daha iyi ayrılmasına sebep olur ki bu da bantların kalitatif ve kantitatif tayinini kolaylaştırır.

Türev Spektroskopisi ile analiz edilecek olan maddelerin, belirli dalga boyları arasında dalga boylarına karşı gelen absorpsiyon değerlerinin birinci ve daha yüksek türevleri kaydedilerek grafiğe geçirilir. Normal spektrumda çok küçük olan pikler bile türev spektrumunda büyük pikler haline gelir. Bilindiği gibi bir fonksiyonun herhangi bir noktasındaki türevi dA/dx 'tir. Absorpsiyon spektrumları söz konusu olduğunda ise türev $dA/d\lambda$ olacaktır. Spektrumun her bir noktasındaki türev değerleri hesaplanıp dalga boyunun fonksiyonu olarak grafik edildiğinde birinci türev absorpsiyon spektrumu elde edilir. Buna benzer şekilde 2., 3., ..., n. Türev spektrumları sırasıyla $d^2A/d^2\lambda$, $d^3A/d^3\lambda$, ..., $d^nA/d^n\lambda$ değerleri ile dalga boyu arasında oluşturulan orijinal spektrumda absorpsiyonun maksimum bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minimum, 4. türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. derece türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir (Şekil 2.1).

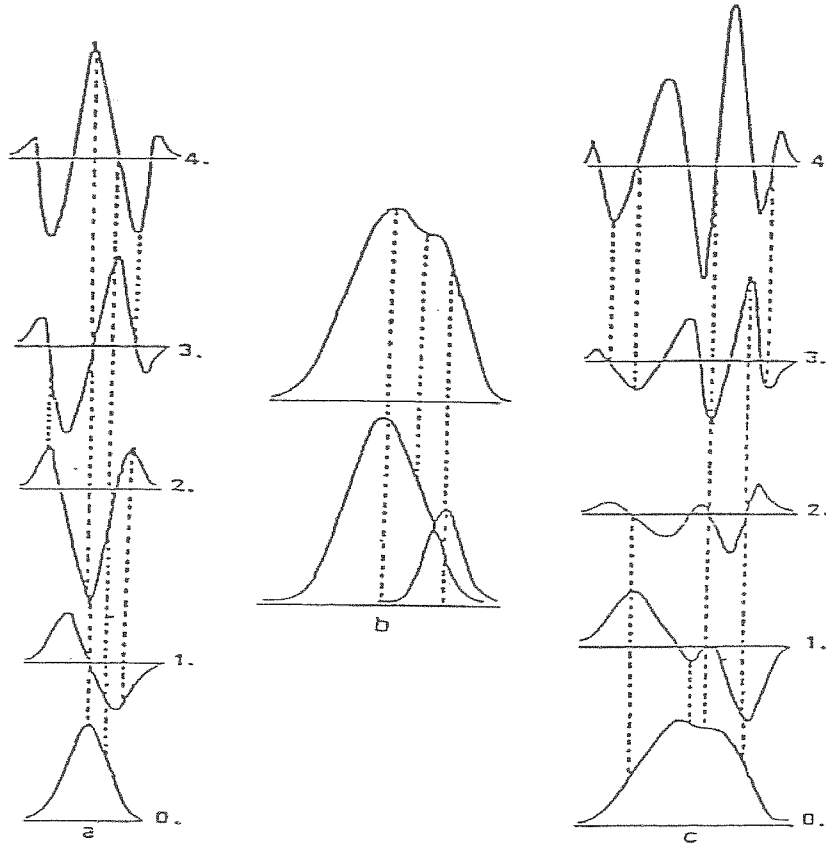
Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla rezolüsyon artmaktadır. Bundan spektrumların ince yapısının aydınlatılmasında yararlanır ki bu durum saflık testleri ve tanımlamada önemlidir. Basit bir absorpsiyon bandının 1 4. türevleri Şekil 1'de görüldüğü gibi pikin birinci derece türevi alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif pikler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstremumlar oluşmakta, orijinal pikteki ekstremumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir. 1. türev her dalga boyunda konsantrasyon ile orantılıdır. $dA/d\lambda$ 'nın uç değerlere sahip olduğu yerdeki ölçümlerde hassasiyet en fazladır. 2. türev, türevin sıfır olduğu noktalarda konsantrasyon ile orantılıdır. 2. türevin de uç değerlerinde hassasiyet daha fazladır [106].

3.2.1 Türev Spektrumunun Alınması:

Türev spektrumu değişik yöntemlerle elde edilebilir. Çıkış sinyalinin elektronik veya nümerik olarak diferansiyelinin alınması veya elektronik takometrelerle işleme tabi tutulması, yayımda çift dalga boyu sinyal taraması veya dalga boyu modülasyonu yapabilen özel optik sistemi olan spektrofotometreler ile optik türev spektrumu elde

edilir. Bu tekniklerin her birinde avantaj ve dezavantaj vardır. Pratikte elektronik farklılaştırma ile çift dalga boyu taraması ve 1. türev alınarak diğer türevlerin elektronik hesabı en çok kullanılan tekniklerdir. Elektronik farklılaştırma ile türev alan cihazların daha ucuz oluşu ve istenen dereceden türevi anında verebilmesi gibi üstünlükleri vardır.

Her iki teknikte uygulamaya iki değişken katar; türev derecesi (n) ve spektrumun uygulanacağı dalga boyu aralığı. Dalga boyu modülasyonu, gazların tek ışınli spektrumuna uygundur ve ışık kaynağının düşük frekans gürültüsünün yarattığı sinyal/gürültü oranı açısından üstünlük sağlar. Elektronik yöntem ise özellikle çift ışınli UV-VIS spektrofotometresinde biyokimya, klinik, çevre ve ilaç analizlerinde sıvı örnekler için uygundur. Türev hesap birimi, dedektör, elektronik birimi ile kaydedici, basıcı, ekran gibi gösterge birimleri arasında yer alır. Türev spektrumunda hem (+), hem (-) sinyaller alacağından kaydedici birimin x eksenini skalasının ortasında yer almalıdır [106].



Şekil 3.2 Çeşitli şekillerdeki Gauss Diyagramlarının türev spektrumları(40)

a. Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. türevleri

- b. Eşit olmayan iki gauss diyagramının temel spektrumu
- c. Üst üste çakışmış ve eşit olmayan iki Gauss diyagramının temel, 1, 2, 3, 4. türevler

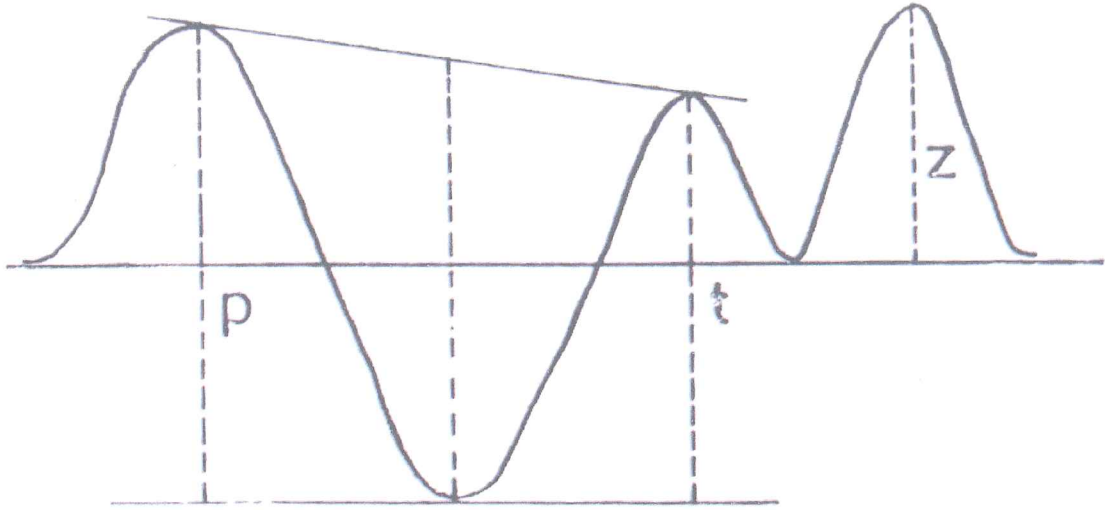
3.2.2 Türev Spektrumuna Etki Eden Faktörler:

Türev uygulamasının teorik fonksiyon eğrisi üzerinde değil, gerçek bir optik elektronik spektrum üzerinde yapılması nedeniyle gelecek olan pik kayması ve şekil bozulmaları göz önüne alınmalıdır. Optik ve elektronik gürültülerin verdiği piklerin gerçek spektrum pikleri ile benzer özelliklere sahip oluşu spektrumun genelde detaylandırılmasına bağlı olarak, büyümelerine ve yanlış değerlendirmelere yol açabilir. Gerçek piklerin türev eğrilerinin dalga boyu eksenini doğrultusunda çarpılmalarının, şekil değiştirmelerinin türev derecesi ile artacağı göz önüne alınmalıdır. Gürültü pikleri, spektrum ortalamalarının alınıp değerlendirilmesi ile yok edilir. Sadece 1. türev eğrisi doğrudan optik olarak elde edilebilir. Diğer türevler ise bu veya orijinal spektrumdan elektronik olarak elde edilebilir. Uygulamada bilinmesi gereken temel ilişki aynı cihaz programında 2. türevin 1.sine göre daha detaylı bilgi ve daha iyi duyarlılık ile ayırım gücü sağladığı buna karşılık sinyal- türev derecesi artışı ile gürültü oranı azalışa ve band kayması oluşudur [106].

3.2.3. Türev Spektrumunun Değerlendirilmesi:

Birinci ve ikinci türev spektrumunda ordinat değişimleri normal spektrumdaki ordinat değerinin büyüklüğü ile değil, eğim değişimi ile ilişkili oluşu nedeniyle türev eğrisinin absisteki konumu ile dönüm noktalarının birbirine karşı durumları karakteristik olur. Nicel analizlerde yalnızca bitişik, peşpeşe ekstrumum noktaları değerlendirilerek bu iki noktanın mutlak değer olarak farkı ölçülür. Birkaç ekstrumum nokta varsa ordinat farkının en yüksek olduğu bir bitişik çift seçilir [106]

Türev spektrumlarının değerlendirilmesinde üç yöntem vardır.



Şekil 3.3 Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi [106]

t: Eğim yöntemi

p : Pikten-pike ölçüm

z : Sıfır-pik maksimumu yöntemi

Pikten Pike Ölçüm Yöntemi: Yan yana olan maksimum ve minimum farkı ölçülerek, özellikle bulanık örneklerde saydam standartlara karşı nicel analiz kolay yapılır.

Teğet Yöntemi: Peşpeşe gelen iki maksimum üzerinden geçirilen teğetin iz düşümü noktasında, arada kalan minimuma uzaklığı veya iki minimumdan geçen teğetin aradaki maksimuma iz düşüm noktasındaki uzaklığı ölçülür. Özellikle geri zemin absorpsiyonunun belirlenemediği bulanık örneklerde uygulanır. Uzaklık yine standartların eşdeğer piklerine çizilen teğete karşı değerlendirilerek sonuca gidilir.

Pikten Sıfıra Ölçüm Yöntemi: Ölçümü yapılacak olan pikin maksimumu ile sıfır arası veya minimumu ile sıfır arası uzaklığı ölçülür. Özellikle apsise göre simetrik sinyaller içeren yüksek derece türevler için üst üste çakışan eğrilerden biri sıfırdan geçtiğinde kullanılır. Bulanık örneklerde bulanıklık genellikle spektrumun kısa dalga boyu tarafına doğru artar. 1. ve 2. türevde nicel analiz için kullanılan yukarıdaki yöntemler bu artışın etkisini ortadan kaldırır.

Türev spektrofotometresi ile tek boya içeren numunelerdeki boyanın kantitatif

taininde bir karışımda türev alma yoluyla bileşenlerden birine ait bir pik elde edilmesi durumunda, aynı bileşene ait bir dizi standard çözümlerden hareketle, elde edilen aynı türev dereceli spektrumlarında, aynı pik değerlendirilerek çizilmiş kalibrasyon doğruları yardımıyla karışımdaki söz konusu bileşenin nicel analizi yapılmaktadır.

Türev spektrofotometresi ile çift boya içeren numunelerdeki boyanın kantitatif tayininde analizi yapılan numune iki boya maddesi içeriyor ve bu maddelerden birinin absorpsiyon yaptığı bölgede öteki yapmıyorsa, maddeleri ayırmaksızın yan yana tayin etmek mümkündür [106].

3.2.4 Türev Spektroskopisinin Uygulama Alanları

λ_{max} 'ın belirlenmesi: Orijinal spektrumda, maksimum absorpsiyon dalga boyunda 1. türev eğrisini sıfırdan geçiyorsa, bu dalga boyu daha doğru bir şekilde saptanabilir.

Rezolüsyondaki artış: Türev spektrumlarında, orijinal spektrumda zor görülebilen ince yapı ortaya çıkar, yani rezolüsyonda artış meydana gelir. Bunun için çift sayılı türev spektrumları daha avantajlıdır. çünkü orijinal spektrumda bulunan maksimum ve minimumlar, bu spektrumlarda yine aynı dalga boylarında birer ekstremum halinde ortaya çıkar.

İdentifikasyon: Özellikle absorpsiyonu görünür bölgede olan renkli maddelerin absorpsiyon spektrumları geniş bantlar halinde olduğu için, bu spektrumlar maddenin tanınmasında önemli değildir. Buna karşın orijinal spektrumdaki yan çıkıntının türev spektrumlarında, özellikle yüksek dereceli olanlarda ekstremum haline dönüşmesi, piklerin sayısının artması ve keskinleşmesi ile spektrumun ince yapısı ortaya çıkan infrared spektrumlarına benzeyen spesifik durumlar elde edilir.

Bulanık Çözeltiler Kantitatif Analiz: Bulanık çözeltiler ve içinde süspanse ya da emülsifiye katı veya sıvı maddeler olan çözeltilerle spektrofotometrik ölçümlerin yapılması zordur. Özellikle UV alanda ışın saçılması sebebi ile analitin spektrumu kuvvetli ya da zayıf absorpsiyonu ile çakışır. Türev spektrumundaki uygun pik-pik

uzaklıkları değerlendirilerek, bulanıklığın spektrum üzerindeki bu olumsuz etkisi giderilebilir.

Matriks etkisinin giderilmesi: Türev spektrumları alınması ile orijinal spektrumdaki keskin spektral özellikler kuvvetlenmekte ve keskinleşmekte, buna karşın geniş ve yaygın bantlar daha da basıklaşmaktadır. Böylece analit piki ile çakışan değişken zemin absorpsiyonu etkisi giderilebilir.

Safılık kontrolü: Türev spektrumlarındaki spektral ayrıntılar, maddelerin safılık testlerinde de avantajlıdır. Eser miktardaki safsızlıkların küçük absorpsiyon pikleri, türev spektrumlarında daha kolay saptanabilen pikler haline dönüşür. Bu spektrumların, saf maddenin aynı koşullarda kaydedilen türev spektrumları karşılaştırılması ile safılık kontrolü yapılabilir.

Eser madde analizi: İlaç maddesi, besinler v.b. maddelerdeki eser miktardaki safsızlıkların saptanması ve miktarının tayin edilmesi de türev spektrofotometrisinin bir başka uygulama alanıdır. Buna örnek olarak, etanolde eser miktarda bulunan benzenin tayini gösterilebilir.

Karışımların simultane analizi: Türev spektrofotometrisinin oldukça yaygın bir uygulama alanı da absorpsiyon bantları ile çakışan ve bir sebeple absorpsiyon spektrofotometrisi ile bir ön ayırma yapılmaksızın tayin edilemeyen karışımların simultane analizidir. Bu konuda yapılmış çalışmalar, kombine ilaç preparatlarında ve besinlerdeki katkı maddelerinin analizinde yoğunlaşmıştır. Bu analizlerde pik-sıfır, pik-pik ve pik/pik oranı ölçümleri uygulanmıştır.

3.2.5 Türev Spektroskopisinin Avantajları ve Dezavantajları

Avantajları

- Türev çalışması orijinal spektrumun eğimleri hakkında bilgi verir ve bunun omuz noktaları ile dönüm noktalarının daha belirgin hale gelmesine neden olur. Böylece bir bileşik daha kolay ve kesin olarak tanınabilir
- Yoğunlukla orijinal spektrumda elde edilen eğriler bir çok pikin üst üste

gelmesi ile meydana gelmiştir. Türev alma ile bu absorpsiyon eğrileri daha şekle girer ve böylece bir arada bulunan piklerin tek tek görülmesi sağlanır.

- Spektrofotometrede bulanık çözeltiler ile çalışılırken çökme hızı, tanecik büyüklüğü gibi etkenlere bağlı olarak büyük oranda hata yapılırken, türev eğrilerinin hazırlanması ile bulanıklığın oluşturduğu bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir ve bulanık ortamlarda da çalışılabilir.
- Birden fazla maddenin karışım halinde bulunduğu ortamlarda ekstraksiyon ve kromatografi gibi her hangibi bir ayırma işlemine başvurulmaksızın tek tek miktarları tayin edilebilir.
- Reaksiyon ortamından kaynaklanan gürültü piklerinin yok edilmesini sağlar.

Dezavantajları

- Kullanımı çok kolay olmasına karşılık pahalı spektrofotometrelere ve oldukça karmaşık bir elektronik yapıya ihtiyaç vardır.
- Türev spektrumlarında çok sayıda uydu pikleri görülür. Bu pikler, bir karışım ile çalışılır iken başka bileşenlerin de varlığını gösterir. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için karışıklık daha da fazla olacaktır [106]

3.3 Fark Yöntemi

Karışımlarda yer alan çeşitli maddeleri kantitatif olarak analiz etmeyi ya da çevre koşulları nedeniyle küçük değişimlere rağmen hassas bir ölçüm sağlar. Fark yöntemi ile spektrofotometrik analizlerin doğruluğu ve seçiciliği belirgin bir biçimde geliştirilmiştir. Fark yönteminin esas önemli özelliği eşit kütlelere sahip çözeltilerin farklı formlarını elde etmektir. Diğer absorban maddelerin varlığında fark spektrumlarının uygulama kriterleri şunlardır.

a) Bir ya da daha fazla belirteç eklenmesi örneğin spektrumda tekrarlanabilirliğini azaltır.

b) Girişim yapan bileşenlerin absorbansları belirteç eklenmesi ile değişmez.

Örneğin spektral özelliklerinin değişimi asit, baz ve tampon sulu çözeltilerinin eklenmesi ile yapılır. Birçok örneğin Ultraviyole-Görünür bölge absorpsiyon spektrumu iyonize olabilen fonksiyonel gruplar içermektedir. Örneğin fenol, aromatik karboksilli asit ve aminler gibi. Fonksiyonel grupların iyonize olma değerleri çözeltinin pH'larına bağlıdır [110].

Eğer örneklerin A_{asit} ve A_{baz} ları konsantrasyonları ile orantılı ise ΔA 'da Lambert-Beer yasasına uyar ve eşitliğin türevidir;

$$\Delta A = \Delta abc \quad (3.2)$$

Girişim yapan bileşenlerin etkisini azaltmak ve absorpsiyonun değişmesini engellemek için ΔA prosedürünün seçiciliği pH değerlerinin doğru seçimine bağlıdır. Analitin ΔA değerlerinin uygun ve tatmin edici olabilmesi için 0.1M HCl ve 0.1M NaOH kullanılması gerekir. Böylece girişim yapabilecek bileşenlerin absorpsiyon etkileri en aza indirilir [110].

3.4 Modifiye Spektrofotometrik Yöntem

2,6-Diklorofenolindofenol askorbik asidin titrasyonunda en çok kullanılan en önemli reaktiftir. Bu yöntemin temeli askorbik asit ile 2,6-DCIP'un asidik ortamda reaksiyona girmesine dayanır. Askorbik asidin tanınması ilk olarak 1927'de Tillmans tarafından 2,6-DCIP ile yapıldığı için (1) Tillmans Reaktifi de denir [111].

Bundan başka askorbik asit tayininde iyot/brom içeren çeşitli titrimetrik reaktifler kullanılmıştır.

- 1.1960'lardan önce, askorbik asit tayini için N-Bromosüksinamid reaktif, nişasta ise indikatör olarak kullanılmıştır [112].
- 2.İyot, potasyum iyodat, potasyum bromat ve iyot monoklorür ile askorbik asit tayininde nişasta indikatör olarak kullanılmıştır.
- 3.Kloramin T [113, 114] asitlenmiş potasyum iyodür veya potasyum bromür varlığında askorbik asit tayini için kullanılmıştır. Titrasyon son noktası nişasta-iyodinin mavi rengiyle tayin edilmiştir.

4.Çeşitli örneklerde, nötral pH'larda o-iyodobenzoat [115] ve o-diasetoksiyodobenzoat [116] ile vitamin C'nin titrimetrik tayininde löko 2,6-DCIP ve potasyum iyodür indikatör olarak kullanılmıştır.

3.4.1 İlke

2,6-DCIP ile titrasyon, çalışmalarda en çok kullanılan yöntemdir. Farklı örneklerde kullanılan standart yöntemdir. Ayrıca kolorimetrik yöntemin de temelini oluşturmaktadır. Mavi renkli olan 2,6-DCIP askorbik asit varlığında indirgenerek renksiz biçime dönüşür.

Örneğin 2,6-DCIP (boya) çözeltisi ile titre edilerek örnekteki askorbik asit miktarını hesaplanması prensibine dayanır. 2,6-diklorofenolindofenol çözeltisi titrasyon esnasında askorbik asit tarafından indirgenirken, asitin kendisi okside olarak dehidroaskorbikasit oluşur. Titrasyonun son noktasında, ortamda askorbik asitin tamamen bitmiş olması nedeniyle artık reaksiyona girmeyen 2,6-DCIP' nin verdiği pembe renk görülür. Böylece titrasyonun sonlanma noktası, asit çözeltisinde indirgenmemiş boyanın fazlası pembe renk verdiğiinde tesbit edilir. Özellikle kırmızı-mor renkli numunelerde askorbik asit tayininde temel problem, titrasyonun pembe renkli sonlanma noktasının numunenin renkli ekstresi tarafından maskelenmesidir. 2,6-DCIP 'nin titrant olarak kullanıldığı bu yöntemde titrasyon işleminde indirgenmemiş boyanın fazlası eter yardımıyla çekilir. Bu yöntem modifiye spektrofotometrik yöntemle renkli ekstredeki askorbik asit tayini için geliştirilmiştir [117].

3.4.2 Standardizasyon [26,118,119,120]

Bölüm 5.1 de anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisi, her gün kullanılmadan önce mutlaka bir defa ayarlanmalıdır.

- 50 ml'lik bir erlene 5 ml askorbik asit çözeltisi alınır, üzerine % 3'lük metafosforik asitten 5 ml eklenir.
- 10 ml'lik bir bürete doldurulmuş olan 2,6 diklorofenol indofenol çözeltisiyle titre edilir.
- Titrasyon, son bir damla boya çözeltisi eklenince 15 saniye süreyle kaybolmayan hafif pembe bir renk oluşana kadar sürdürülür.

- Harcanan ml boya çözeltisi, 1 mg askorbik asite eşdeğerdir. Buna göre 1 ml 2,6 diklorofenol indofenol çözeltisinin eşdeğeri olan askorbik asit miktarı, yani çözeltinin faktörü F, aşağıdaki gibi bulunur;

Boya çözeltisinin faktörü, $F = (\text{Harcanan boya çözeltisi, ml})^{-1}$

3.4.3 Tanık Deneme [26,118,119,120]

Askorbik asit dışında diklorofenolindofenol çözeltisini indirgeyebilen diğer maddelerin etkisini ortadan kaldırmaktır. Diklorofenolindofenol çözeltisinin ayarlanması (tanık deneme) sırasında harcanan ortalama diklorofenolindofenol çözeltisi miktarından, tanık deneme için harcanan ortalama miktar çıkarılarak, her 1 ml diklorofenolindofenol çözeltisinin kaç mg askorbik asite eşdeğer olduğu hesaplanır.

3.4.4 Numunenin Titrasyonu [26,118,119,120]

- a)Deney numunesinden 25 ml alınarak üzerine 25 ml MFA çözeltisi konur.
- b)İyice karıştırılır ve filtre edilir.
- c)Filtrattan 5 – 10 ml alınarak büretteki diklorofenolindofenol çözeltisi ile açık pembe renge kadar titre edilir.(Oluşan renk en az 15 saniye kalıcı olmalı ve titrasyon işlemi olabildiğince çabuk tamamlanmalıdır.)
- d) Harcanan miktar (V₂) kaydedilir.

$$\text{Askorbik asit (mg / lt)} = \frac{V_2 \times 2}{(V_1 - V_0) \times m} \times 1000$$

(3.3)

V₀ = Tanık denemede harcanan boya çözeltisi miktarı (ml)

V₁ = Standardizasyonda harcanan boya çözeltisi miktarı (ml)

V₂ = Numunenin titrasyonunda harcanan boya çözeltisi miktarı (ml)

m = Titre edilen numune çözeltisindeki madde miktarı (ml) (2,67,68,69).

3.5 Yöntem Doğrulaması (Validasyon)

Analitik yöntem doğrulaması, yöntemin amaçlanan analitik uygulamanın tüm gereklerini karşıladığının, laboratuvar çalışmaları ile kanıtlanması işlemidir.

Doğrulamanın yapılması gereken durumlar:

- Tanınma testleri
- Safsızlıkların miktar tayini
- Safsızlıkların limit testleri
- Bitmiş üründe etken maddenin (ya da seçilen başka bir maddenin) kantitatif analizi

Analitik yöntem parametreleri:

- Özgünlük
- Doğrusallık
- Konsantrasyon aralığı
- Doğruluk
- Kesinlik
 - ✓Gün içinde tekrarlanabilirlik
 - ✓Günler arası tekrarlanabilirlik
 - ✓Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik
- Deteksiyon limiti(LOD)
- Kantitatif tayin limiti(LOQ)
- Sağlamlık(Robustness)
- Sistem uygunluk testi

3.5.1 Özgünlük

Validasyonun en önemli parametresidir,metod geliştirilirken ilk yapılması gereken testtir.İki şekilde gerçekleştirilir:

- Safsızlıklar ve bozunma ürünleri gibi girişim yapabilecek maddelerin standartları mevcutsa geliştirilen yöntemde bu maddelerin etken maddeden uygun bir ayrılma gücü değerleriyle ayrıldığı ispat edilmelidir.

- Girişim yapanma ddelerin standartları sağlanmıyorsa, örnek; ısı, ışık, nem, asit, baz, oksidasyon gibi stres şartlarına maruz bırakılıp sonuçlar referans maddeyle karşılaştırılır.

3.5.2 Doğrusallık

Bu test, standart stok çözeltisinin seyreltilmesiyle ve/veya ayrı tartımlar alınarak gerçekleştirilir. Dedektör cevabına karşılık konsantrasyon grafiği çizilir (kalibrasyon eğrisi). Eğrinin doğrusallığı en küçük kareler yöntemi ile değerlendirilir. Doğrunun eğimi, kayım değeri, korelasyon katsayısı doğrusallığı belirler.

3.5.3 Konsantrasyon Aralığı

Yöntemin doğruluk, kesinlik, doğrusallık testlerini geçtiği konsantrasyon aralığıdır ve doğrusallık çalışmalarından metodun sınırları belirlenir. İncelenen konsantrasyon aralığı yöntemin kullanımına göre değişir.

3.5.4 Doğruluk

Bir yöntemin doğruluğu, ölçülen miktarın gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanır. Genellikle geri kazanım çalışması yapılmakla beraber, bu test üç yöntemle gerçekleştirilir:

- a) Standart ile karşılaştırma: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içine değilse bu yöntemden yararlanır. Saf standart madde sağlayan kuruluşlardan analiz maddesinin standardı satın alınır. Farklı tartımla hazırlanmış en az 3 farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 3 defa ölçüm yapılır, çıkan sonuçlar başka bir yöntemle elde edilen sonuçlarla kıyaslanır ve rapor edilir.
- b) Geri kazanım: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise bu yöntemden yararlanır. Placebo hazırlanır ve etken maddesinin %50, 75, 100, 125, 150'sini içeren konsantrasyonlarda çözelti hazırlanır ve geri kazanım hesaplanır.
- c) Standart katma yöntemi: Analiz edilecek madde karışık bir matriks içinde ise ve matriks hazırlamak imkansız ya da çok zorsa bu yöntem tercih edilir. Sonuçlar

% olarak veya belirli bir güven aralığında bulunan değerin gerçek değerden farkı şeklinde ifade edilir.

3.5.5 Kesinlik

Üçe ayrılır:

- 1) Gün içi tekrarlanabilirlik: Metodun kısa bir zaman içerisinde aynı uygulama koşullarındaki kesinliğidir. %100 konsantrasyonda hazırlanan tek bir örneğin en az 10 defa enjeksiyonu yapılır veya yöntemin sınırları içerisinde alınan 3 konsantrasyondan 3'er enjeksiyon yapılır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin bağıl standart sapması hesaplanır.
- 2) Günler arası tekrarlanabilirlik: Yöntemin farklı analizciyle, farklı cihazda, farklı günlerde uygulanmasıdır.
- 3) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik: Farklı laboratuvarlarda yöntemin uygulanmasıdır. Pik alanı veya pik yüksekliği değerlerinin standart sapması ve bağıl standart sapması hesaplanır.

3.5.6 Deteksiyon limiti

Deteksiyon limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır.

- a) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan miktar tayini yönteminde kullanılır. Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve güvenilir bir şekilde ölçülebileceği minimum konsantrasyon bulunur.
- b) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi le elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 3:1 olmalıdır.
- c) Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

3.5.7 Kantitatif Tayin Limiti

- a) Kantitatif tayin limitinin hesaplanmasında yöntemin enstrümantal olup olmadığına göre birkaç yaklaşım vardır:
- b) Görsel değerlendirmeye dayanan yöntem: Genellikle enstrümantal olmayan

miktar tayini yönteminde kullanılır.Örneğin bilinen konsantrasyonları hazırlanır ve doğru ve kesin olarak tayin edilebildiği minimum konsantrasyon hesaplanır.

c) Sinyal/Gürültü oranına dayanan yöntem: Düşük konsantrasyonda hazırlanan örnek çözeltisi le elde edilen sinyalin baseline gürültüsüne oranı 10:1 olmalıdır.

d) Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak istatistiksel hesaplamalara dayanan yöntem.

3.6 Numune Hazırlama (Ekstraksiyon) [26,118,119,120]

Askorbik asidin çeşitli materyallerden çözeltiye alınması aşağıda belirtilen yöntemlerle yapılabilir.

Askorbik asit miktarı belirlenecek gıda maddesi katı halde ise:

a)Yaklaşık 200-300gr numune tartılarak bir blender içerisine konur

b)Üzerine tartılan numune miktarı kadar ekstraksiyon çözeltisi eklenir.

c)Blender çalıştırılarak homojen bir ezme haline getirilir.(Bu işlem için blenderin 2 dakika süreyle çalıştırılması yeterlidir). Metafosforik asit, bu işlem sırasında askorbik asidin enzimatik olarak okside olmasını önlemek için stabilize edici olarak kullanılmaktadır.

d)Daha sonra blenderdeki karışımdan 10-40 gr tartılarak ekstraksiyon çözeltisi yardımı ile 100ml'lik ölçü balonuna alınır ve aynı çözelti ile çizgisi tamamlanıp filtre kağıdından süzülür.

Meyve ve sebze konserveleri veya benzer ürünlerin titrasyona hazırlanması için :

a)Tüm kutu veya kavanoz içeriği blendere boşaltılır

b)Yalnızca 5-10 saniye süreyle parçalanır.

c)Bundan 20gr kadar (1-5 mg arasında askorbik asit içeren miktarda) tartılıp 100 mL'lik bir balona aktarılır.

d)Balon ekstraksiyon çözeltisi ile işaret çizgisine kadar tamamlanır.

e)Numune iyice karıştırıldıktan sonra filtre edilir.

Konserve gibi işleme tabi tutulmuş gıdalarda yüksek miktarda Fe^{+2} bulunur. Boyayı indirger ve hatalı sonuç verir. Bunu önlemek için ekstrakte edici çözelti olarak %8'lik asetik asit konur.

İncelenecek numune, meyve pulpu, meyve suyu veya salça gibi homojen sayılabilecek bir sıvı ise:

- a) Doğrudan 20gr veya 20 ml alınarak 100 ml' lik bir balona aktarılır.
- b) %3'lük metafosforik asit çözeltisi ile hacmine tamamlanır.
- c) Numune iyice karıştırıldıktan sonra filtre edilir. Bu şekilde numune, titrasyon işlemine kadar okside olmadan saklanabilir.

Analizi yapılacak meyve veya sebze iri tanelerden oluşan bir hammadde ise:

Tüm kitleyi temsil edebilecek şekilde numune almaya özen göstermelidir. Örneğin, domates, şeftali gibi meyvelerde yapılacaksa bunların yalnızca 1-2 tanesi 200-300gr gelebilir.. böyle durumlarda, numunenin tüm grubu temsil edebilmesi için en az 20 meyveden, her birinden sekizde veya onda biri alınarak blenderde ezme haline getirilmesi gerekir. Ancak bu kadar çok sayıda meyvenin bıçakla kesilerek bunlardan parçalar alınması sırasında geçen sürenin, askorbik asitin özellikle enzimatik yolla kaybına neden olma olasılığı çok fazladır. Bu olasılığı ortadan kaldırmak veya sınırlandırmak amacıyla;

- a) Önce blender haznesinde 200-300 gr arasında ekstraksiyon çözeltisi tartılır.
- b) Sonra hazne terazi üzerinde olduğu halde, meyvelerden numune parçaları kesilir. Her kesilen parça derhal içerisinde metafosforik asit bulunan blender haznesine atılır ve çalıştırılır.
- c) Bu işlemler için 0.2 gr duyarlılıkta tartı yapabilen bir teraziye gereksinim vardır. Bu şekilde, homojen hale getirilmiş numuneden daha duyarlı bir terazi yardımıyla 10-40 gr tartılarak 100 ml'lik balona aktarılır.
- d) Balon, ekstraksiyon çözeltisi veya okzalik asit çözeltisi ile işaretine kadar tamamlanır.
- e) İyice çalkalandıktan sonra filtre edilir. Bu filtrat daha sonra boya çözeltisiyle titre edilir.

Yukarıda anlatıldığı gibi, aynı ağırlıktaki numune aynı ağırlıktaki metafosforik asit çözeltisiyle karıştırılarak ezme haline getirilmektedir.

Turunçgillerde askorbik asit tayininde numune hazırlanmasında en iyi yol ise şudur:

- a) Litrelük bir beherde 250 gr kadar % 6'lık metafosforik asit çözeltisi tartılır.
- b) Analiz edilecek turunçgil meyvelerinden tüm kitleyi temsil edecek sayıda meyve seçilerek bu çözelti üzerinde preslenir. Bu amaçla belirlenen sayıdaki meyveler sıra ile ikiye bölünerek her birinden sadece bir yarımı doğrudan çözelti üzerine kısmen

preslenir. Böylece elde edilen meyve suyu, doğrudan metafosforik asit çözeltisi içine alınmış olur.

c) Daha sonra beher tartılır ve 250 gr metafosforik asit üzerine alınmış olan meyve suyu miktarı belirlenir.

d) Bir cam bagetle iyice karıştırıldıktan sonra, bu karışımdan, doğrudan belli bir miktar tartılır.

e) % 3'lük metafosforik asitle 100 ml. tamamlanır ve balon içeriği filtre edilir.

BÖLÜM 4

KULLANILAN CİHAZLAR VE MADDELER

4.1 Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (Shimadzu UV-2450 UV-VIS Spektrophotometer) (1 cm'lik kuarz)

Analitik terazi (Gec Avery 0,1 mg'a kadar duyarlı)

Manyetik karıştırıcı (Arex-Velp Scientifica)

Süzgeç kağıdı

Santrifüj

Kapaklı santrifüj tüpleri

4.2 Kullanılan Maddeler

Askorbik asit, metafosforik asit, sodyum bikarbonat, asetik asit, 2,6-Diklorofenolindofenol, eter, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sodyumasetat, asetik asit, potasyum klorür.

DENEYSEL ÇALIŞMA

5.1 Kullanılan Çözeltiler

Ekstraksiyon çözeltisi: 15 g metafosforik asit çubukları toz haline getirildi. 40 mL asetik asit ve 200 mL suda karıştırılarak çözüldü ve hacim 500mL'ye tamamlandı. Daha sonra siyah bandlı süzgeç kağıdından süzüldü. Metafosforik asit suda hidrolize olarak fosforik aside dönüştüğü için her gün yapılan çalışmalarda yeni hazırlandı [35].

% 0,025'lik 2,6-Diklorofenolindofenol (2,6-DCIP) çözeltisi: 50 mg 2,6-DCIP 150 mL sıcak suda çözüldü. İçine 42 mg sodyum bikarbonat ilave edildi, soğutuldu ve hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlandı. Koyu renkli bir şişeye siyah band kıvrımlı süzgeç kağıdından süzüldü. Çözelti buzdolabında en fazla bir hafta muhafaza edildi [35].

Askorbik asit Stok Çözeltisi(100µg.mL⁻¹): Askorbik asit stok çözeltisinin hazırlanması için 10mg vitamin C tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktararak ekstraksiyon çözeltisi ile tamamlandı.

Standart Çözeltiler: Standart Vitamin C çözeltileri ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan çözeltinin (100 mg.mL⁻¹) seyreltilmesi ile 2-10 mg.mL⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlandı.

2M Sodyum Asetat Çözeltisi: 27,216 g sodyumasetat tartıldı ve 100 mL'lik balon jøjeye aktararak hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

2M Asetik asit Çözeltisi: 11,42 mL asetik asit 100 mL'lik balon jøjeye aktararak hacmi su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2M Hidroklorik asit Çözeltisi: 1,76 mL hidroklorik asit 100 mL'lik balon jøjeye aktararak hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

0,2M Potasyum Klorür Çözeltisi: 1,49 g potasyum klorür 100 mL'lik balon jojeye aktarılarak hacmi saf su ile 100 mL'ye seyreltildi.

pH4 Tampon Çözeltisi: 500 mL'lik balon jojeye 9,25 mL 2M asetik asit çözeltisi ve 40,55 mL 2M asetik asit çözeltisi kondu ve hacmi saf su ile tamamlandı.

pH2 Tampon Çözeltisi: 100 mL'lik balon jojeye 25 mL 0,2M potasyum klorürçözeltisi, 6,25 mL 0,2M hidroklorik asit çözeltisi kondu ve hacmi saf su ile tamamlandı.

pH5 Tampon Çözeltisi: 100 mL'lik balon jojeye 6,95 mL 2M sodyum asetat çözeltisi, 3,05 mL 2M asetik asit çözeltisi kondu ve hacmi saf su ile tamamlandı.

5.2 Numunelerin Hazırlanması

5.2.1 Meyve ve Sebze Numunelerinin Hazırlanması

Çalışmamızda 10 g çekirdekleri temizlenmiş kırmızı biber, 10 g kızılıcak ve 30 g çilek örneği kullanıldı. Mevsimi geçtiği için derin dondurulmuş kızılıcak ile çalışıldı. Tartılan örnekler çok küçük parçalara kesilerek bir behere kondu. Kırmızı biber, kızılıcak ve çilek numunelerine sırasıyla 50 mL, 30 mL ve 25 mL ekstraksiyon çözeltisinden ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda 250 dev/dak hızında 45 dakika karıştırılmasıyla askorbik asidin numuneden ekstraksiyonu sağlandı. Beher içindeki süspansiyon santrifüj tüplerine aktarılarak 6000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süzüntüler 50 mL 'lik balon jojeye aktarıldı, ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı ve türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.2 Meyvesuyu Numunelerinin Hazırlanması

Meyvesuyu numunelerinin her birinin toplam hacmi santrifüj tüplerine aktarılarak 6000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edildi. Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal meyve suyu numuneleri için elde edilen süzüntülerden sırasıyla 24 mL, 20 mL, 30 mL alınarak 50 mL'lik balon jojeye kondu ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan numuneler türev spektrofotometrik

yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.3 Gazlı İçecek Numunelerinin Hazırlanması

Gazlı içecek numunesi olarak C vitamini içeren soda kullanıldı ve numunelerin her birinin toplam hacmi ultrasonik banyoda 30 dakika degaze edildi. Degaze işleminden sonra Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon numunelerinin her birinden 10mL alınarak 50 mL'lik balon jøjeye kondu ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan numuneler türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.4 Toz İçecek Numunelerinin Hazırlanması

Toz içecek numunelerinin her birinin toplam miktarı porselen havanda homojenize edildi. Tang Vişne ve Tang Limon numunelerinin her birinden 0,9g hassas olarak tartılıp 50mL'lik balon jøjeye kondu ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan numuneler türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.5 Farmasötik Numunelerin Hazırlanması

Farmoskopik numunelerin hazırlanması için toplam numune adedi tablet ayrı ayrı tartılıp ortalama tablet ağırlığı bulundu. Tabletler bir arada toz edildi. Redoxor Çiğneme Tablet numunesinden ve Aspirin Plus C numunesinden sırasıyla 0,01g, 0,08g hassas olarak tartılıp 50mL'lik balon jøjeye aktararak ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan numuneler türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.6 Bebek Maması Numunesinin Hazırlanması

Yaklaşık 25 g bebek maması tartıldı ve bir behere kondu üzerine 40 mL ekstraksiyon çözeltisinden ilave edildi ve manyetik karıştırıcıda 250 dev/dak hızında 10 dakika karıştırılmasıyla askorbik asidin numuneden ekstraksiyonu sağlandı. Beher içindeki süspansiyon santrifüj tüplerine aktararak 6000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen süzüntü 50 mL 'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı ve türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.2.7 Şeker Numunesinin Hazırlanması

Askorbik asit içeren şeker numunesinin analizi için 15 adet şeker ayrı ayrı tartılıp ortalama şeker ağırlığı bulundu. Şekerler bir arada toz edildi ve bu karışımdan 2g hassas olarak tartılıp 50mL'lik balon jøjeye kondu ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Türev spektrofotometrik yöntem, fark spektrofotometrik yöntem ve titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayini için kullanıldı.

5.3 Yöntemlerin Uygulanması

5.3.1 Türev Spektrofotometrik Yöntem

5.3.1.1 Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi Bölüm 5.2 de belirtildiği gibi hazırlanan meyve ve sebze numuneleri ile bebek maması numunesi için yapılmıştır.

5.3.1.2 Spektrumların Çizilmesi

Türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayininde A,¹D spektrumlarının alınması çalışılan tüm numuneler için 200nm-300nm dalga boyu aralığında 1 nm band genişliği ve 125nm.dak⁻¹ tarama hızı ile yapıldı.

5.3.1.3. Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması

Ölçü eğrisi, ekstraksiyon çözyisi ile askorbik asidin nihai konsantrasyonu 2-10 mg.L⁻¹ olduğu aralıkta hazırlandı.

Askorbik asidin ekstraksiyon çözeltisinde hazırlanan standart çözeltilerin Bölüm 5.3.1.2' de verilen şartlarda absorpsiyon ve 1. derece türev spektrumları alındı daha sonra çalışılan tüm numuneler için 258nm'deki minimuma ait türev absorbans değerleri

ölçülerek bu değerler ile karşılığı olan standart çözelti konsantrasyonları arasında ölçü eğrileri oluşturuldu ve ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri regresyon analizi ile hesaplandı.

5.3.1.4 Ölçüm

Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltilerinde askorbik asit tayini aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

a) Meyve ve Sebze Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan kırmızı biber numune çözeltilerinden 0,25 mL, çilek numune çözeltilerinden 0,3 mL, kıızılcık numune çözeltilerinden 0,4 mL örnek kullanıldı. Belirtilen hacimlerdeki örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerin A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

b) Meyvesuyu numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Juss Portakal Nektarı numune çözeltilerinden 0,4 mL, Juss Karışık Meyve Nektarı numune çözeltilerinden 0,3 mL, Tamek Kan Portakal numune çözeltilerinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Belirtilen hacimlerdeki örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerin A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

c) Gazlı İçecek Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Sırma Mandalina C Plus numune çözeltilerinden 0,5 mL, Sırma Limon C Plus numune çözeltilerinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Belirtilen hacimlerdeki örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye

aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerin A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

d) Toz İçecek Numuneleri

Deneyisel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Tang Vişne numune çözeltisinden 0,6 mL, Tang Limon numune çözeltisinden 0,6 mL örnek kullanıldı. Belirtilen hacimlerdeki örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerin A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

d) Farmasötik Numuneler

Deneyisel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Redoxor Çiğneme Tablet numune çözeltisinden 0,6 mL, Aspirin Plus C numune çözeltisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Belirtilen hacimlerdeki örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerin A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

e) Bebek Maması Numunesi

Bebelac Elma Armut Püresi: Deneyisel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltisinden 0,4 mL örnek 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerini A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

f) Şeker Numunesi

Kent Olips Limon&Portakal: Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltisinden 0,6 mL örnek 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve ekstraksiyon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan örnek çözeltilerini A, 1D absorpsiyon spektrumları alındı. Bu spektrumlarda 258 nm'deki minimuma ait 1D absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

5.3.1.5 Validasyon Çalışmaları

a) Tekrarlanabilirlik

Güniçi: 4 mg.L⁻¹ ve 8 mg.L⁻¹ konsantrasyonunda standart çözeltiler aynı günde 5 paralel çalışma yapılarak Türev absorbans değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

Günaşırı: 4mg.L⁻¹ ve 8mg.L⁻¹ konsantrasyonunda standart çözeltiler günaşırı hazırlanarak 5 paralel çalışma yapıldı Türev absorbans değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

b) Tayin limiti(LOD) / Ölçüm limiti(LOQ)

LOD ve LOQ tayini için 10 mg.L⁻¹ konsantrasyonunda standart çözelti aynı günde 10 paralel çalışma yapılarak Türev absorbans değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

5.3.2 Fark Yöntem

5.3.2.1 Spektrumların Çizilmesi

Vitamin C analizi yapılacak numunelerde geliştirilen yöntem ile askorbik asit tayininde ΔA spektrumlarının alınması çalışılan tüm numuneler için 200nm-300nm dalga boyu aralığında arasında 1 nm band genişliği ve 125nm.dak⁻¹ tarama hızı ile yapıldı.

5.3.2.2 Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan $100 \mu\text{gml}^{-1}$ askorbik asit çözeltisinden 10ml'lik balon jodelere (2 ayrı seri) 0,2;0,4;0,6;0,8;1 mL aktarıldı. 1. seri pH2 tampon çözeltisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Referans hücreye konan 1. seri çözeltilerine karşı numune hücresindeki 2. seri çözeltilerin absorpsiyon (ΔA) spektrumları çizildi. 269nm'deki maksimuma ait absorbans değerleri ölçülerek bu değerler ile karşılığı olan standart çözelti konsantrasyonları arasında ölçü eğrileri oluşturuldu ve ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri regresyon analizi ile hesaplandı.

5.3.2.3 Ölçüm

Bölüm 5.2 de anlatıldığı gibi ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan numune çözeltilerinden alınan örnekler iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jodelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi.

a) Meyve ve Sebze Numuneleri

Deneyisel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan kırmızı biber numune çözeltisinden 0,25 mL, çilek numune çözeltisinden 0,3 mL, kıızılcık numune çözeltisinden 0,4 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler (her bir çalışma için ayrı ayrı) iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jodelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorbans değerleri ölçülerek kaydedildi.

b) Meyvesuyu numuneleri

Deneyisel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Juss Portakal Nektarı numune çözeltisinden 0,4 mL, Juss Karışık Meyve Nektarı numune çözeltisinden 0,3 mL, Tamek Kan Portakal numune çözeltisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler (her bir çalışma için ayrı ayrı) iki ayrı seri 10 ar

ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltilisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

c) Gazlı İçecek Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Sırma Mandalina C Plus numune çözeltilisinden 0,5 mL, Sırma Limon C Plus numune çözeltilisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler (her bir çalışma için ayrı ayrı) iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltilisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

d) Toz İçecek Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Tang Vişne numune çözeltilisinden 0,6 mL, Tang Limon numune çözeltilisinden 0,6 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler (her bir çalışma için ayrı ayrı) iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltilisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

c) Farmasötik Numuneler

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Redoxor Çiğneme Tablet numune çözeltilisinden 0,6 mL, Aspirin Plus C numune çözeltilisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler (her bir çalışma için ayrı ayrı) iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltilisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

d) Bebek Maması Numunesi

Bebelac Elma Armut Püresi: Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltisinden 0,4 mL örnek iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

e) Şeker Numunesi

Kent Olips Limon&Portakal: Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltisinden 0,6 mL örnek iki ayrı seri 10 ar ml'lik balon jöjelere aktarıldı ve 1. seri pH2 tampon çözeltisi ile 2. seri ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde fark absorpsiyon spektrumları (ΔA) çizildi. Bu spektrumlarda 269nm'deki maksimuma ait absorpsiyon değerleri ölçülerek kaydedildi.

5.3.2.4 Validasyon Çalışmaları

a) Tekrarlanabilirlik

Güniçi: Ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan 100 mg.L⁻¹ askorbik asit çözeltisinden ayrı ayrı 10ml'lik balon jöjeye 0,4 mL aktarıldı. 1. si pH2 tampon çözeltisi ile 2. si ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Aynı işlem ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan 100 mg.L⁻¹ askorbik asit çözeltisinden ayrı ayrı 10ml'lik balon jöjeye 0,8 mL aktarıldı. 1. si pH2 tampon çözeltisi ile 2. si ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan standart çözeltilerde ölçüm Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı şekilde aynı günde 5 paralel çalışma yapılarak fark absorpsiyon değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

Günaşırı: Ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan 100 mg.L⁻¹ askorbik asit çözeltisinden ayrı ayrı 10ml'lik balon jöjeye 0,4 mL aktarıldı. 1. si pH2 tampon çözeltisi ile 2. si ise

pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Aynı işlem ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan 100 mg.L⁻¹ askorbik asit çözeltisinden ayrı ayrı 10ml'lik balon jöjeye 0,8 mL aktarıldı. 1. si pH2 tampon çözeltisi ile 2. si ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan standart çözeltilerde ölçüm Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı şekilde gūnaşırı 5 paralel çalışma yapılarak fark absorbans değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

b) Tayin limiti(LOD) / Ölçüm limiti(LOQ)

LOD ve LOQ için ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan 100 mg.L⁻¹ askorbik asit çözeltisinden ayrı ayrı 10ml'lik balon jöjeye 1 mL aktarıldı. 1. si pH2 tampon çözeltisi ile 2. si ise pH5 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. Hazırlanan standart çözeltilerde ölçüm Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı şekilde gūnaşırı 10 paralel çalışma yapılarak fark absorbans değerleri ilgili dalga boylarında ölçüldü.

5.3.3 Modifiye Spektrofotometrik Yöntem

5.3.3.1 Spektrumların Çizilmesi

Askorbik asit analizi yapılacak numuneler için askorbik asit stok çözeltisinden, 1 mg.L⁻¹ ile 10 mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlandı. Vitamin C analizi için geliştirilen yöntem ile askorbik asit tayininde absorpsiyon spektrumlarının alınması çalışılan tūn numuneler için 450nm-600nm'ler arasında 1 nm band genişliği ve 125nm.dak⁻¹ tarama hızı ile yapıldı.

5.3.3.2.Ölçü Eğrilerinin Hazırlanması:

Ekstraksiyon çözeltisi ile hazırlanan stok 100µg.ml⁻¹ askorbik asit çözeltisinden 10 ml'lik balon jöjelere 0,1;0,3;0,5;0,7;1 ml çözeltiler aktarıldı. Hacim pH4 tampon çözeltisi ile 10ml'ye tamamlandı. Son konsantrasyondaki askorbik asidin (10mg.L⁻¹) harcadığı 2,6-DCIP çözeltisinden toplam 3mL fazla titrant her bir balon jöjeye ilave edildi ve 10 mL eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiliye karşı hazırlanan

çözeltilerin absorpsiyon spektrumları çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu ve bu değerler ile karşılığı olan standart çözelti konsantrasyonları arasında ölçü eğrileri oluşturuldu. Ölçü eğrilerine ait doğru denklemleri regresyon analizi ile hesaplandı

5.3.3.3. Ölçüm

a) Meyve ve Sebze Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan kırmızı biber numune çözeltisinden 0,25 mL, çilek numune çözeltisinden 0,3 mL, kıızılcık numune çözeltisinden 0,4 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numuneler ayrı ayrı 50 mL'lik kapaklı tüplere aktarılarak üzerlerine 3'er mL titrant 2,6-DCIP çözeltisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiliye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

b) Meyvesuyu numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Juss Portakal Nektarı numune çözeltisinden 0,4 mL, Juss Karışık Meyve Nektarı numune çözeltisinden 0,3 mL, Tamek Kan Portakal numune çözeltisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numuneler ayrı ayrı 50 mL'lik kapaklı tüplere aktarılarak üzerlerine 3'er mL titrant 2,6-DCIP çözeltisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiliye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

c) Gazlı İçecek Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Sırma Mandalina C Plus numune çözeltisinden 0,5 mL, Sırma Limon C Plus numune çözeltisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numuneler ayrı ayrı 50 mL'lik kapaklı tüplere aktarılarak üzerlerine 3'er mL titrant 2,6-DCIP çözeltisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

d) Toz İçecek Numuneleri

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Tang Vişne numune çözeltisinden 0,6 mL, Tang Limon numune çözeltisinden 0,6 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numuneler ayrı ayrı 50 mL'lik kapaklı tüplere aktarılarak üzerlerine 3'er mL titrant 2,6-DCIP çözeltisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

e) Farmasötik Numuneler

Deneysel çalışmalarda Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan Redoxor Çiğneme Tablet numune çözeltisinden 0,6 mL, Aspirin Plus C numune çözeltisinden 0,5 mL örnek kullanıldı. Yukarıda belirtilen miktarda alınan örnekler ayrı ayrı 10 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numuneler ayrı ayrı 50 mL'lik kapaklı tüplere aktarılarak üzerlerine 3'er mL titrant 2,6-DCIP çözeltisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnekler birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda

hazırlanan blank çözeltiliye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

f) Bebek Maması Numunesi

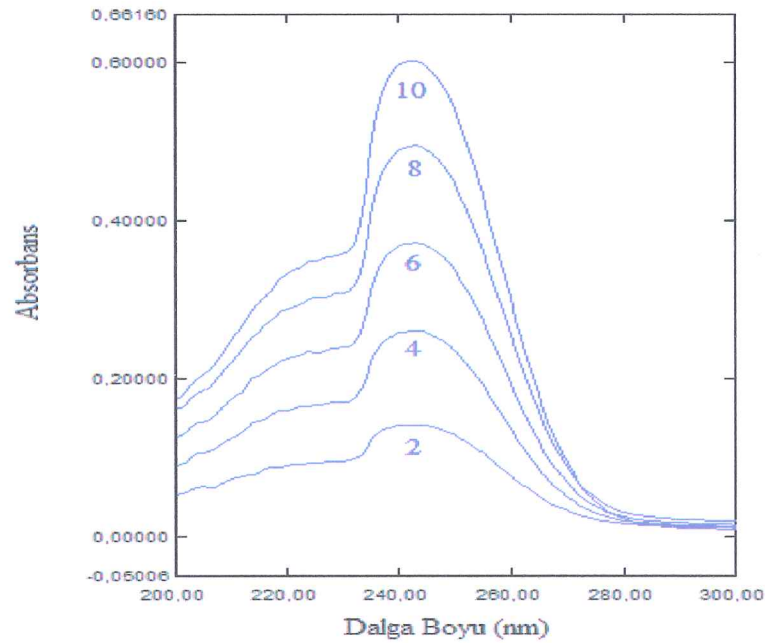
Bebelac Elma Armut Püresi: Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltilisinden 0,4 mL örnek 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numune çözeltilisi 50 mL'lik kapaklı tüpe aktarılarak üzerlerine 3 mL titrant 2,6-DCIP çözeltilisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnek birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiliye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

g) Şeker Numunesi

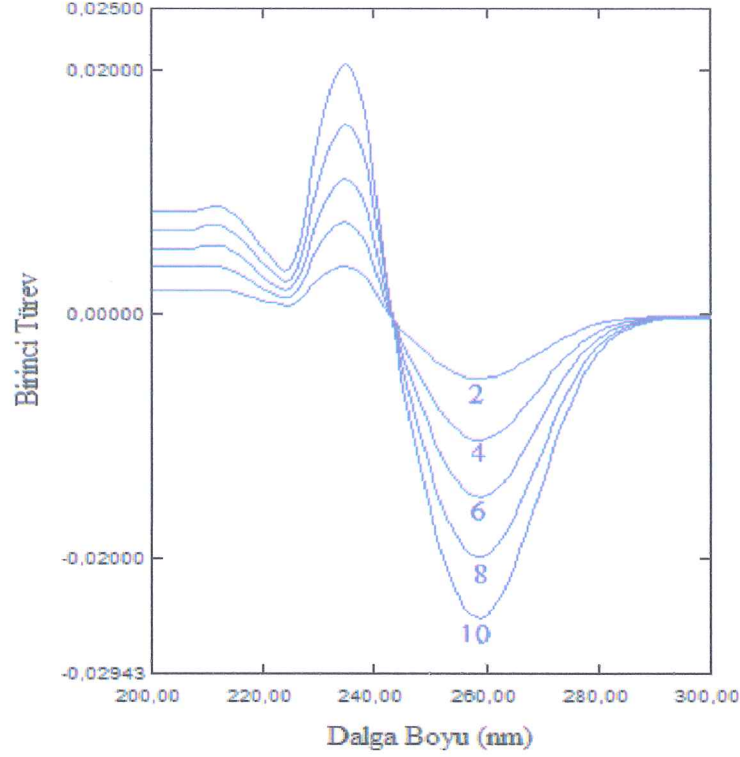
Kent Olips Limon&Portakal: 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numune çözeltilisinden 0,6 mL örnek 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve pH4 tampon çözeltilisi ile hacmine tamamlandı. 10 mL hacme tamamlanan numune çözeltilisi 50 mL'lik kapaklı tüpe aktarılarak üzerlerine 3 mL titrant 2,6-DCIP çözeltilisinden kondu ve 10 ml eter ilave edilerek örnek birkaç kez eter ile döndürülerek rengin eter fazına geçmesi sağlandı. Aynı koşullarda hazırlanan blank çözeltiliye karşı, hazırlanan numune çözeltilerin absorpsiyon spektrumu çizildi. Bu spektrumlarda 531nm 'deki absorbans değerleri okundu.

6.1 Türev Spektrofotometrik Yöntem**6.1.1 Askorbik Asit Tayini İçin Uygun Koşulların Saptanması**

Bölüm 5.3.1.3 de anlatıldığı şekilde çalışılan türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini için 2-10 mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan askorbik asit standart çözeltilerinin absorpsiyon ve 1. türev spektrumları Şekil 6.1, şekil 6.2 de görülmektedir.



Şekil 6. 1 Askorbik asit standart çözeltilerinin (2-10 mg.L⁻¹) absorpsiyon spektrumları



Şekil 6. 2 Askorbik asit standart çözeltilerinin (2-10 mg.L⁻¹) 1. türev spektrumları

Ölçü eğrisine ait konsantrasyon ve karşılığı olan 1. Türev absorbans ortalama (¹D_{ort}) değerleri Çizelge 6.1 de verilmiştir. (Çizelge 6.1) Ortalama ¹D değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi, numunelerde askorbik asit tayini için kullanılmıştır.

Çizelge 6. 1 Ortalama ¹D değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi

No	C (mg.L ⁻¹)	¹ D _{ort}	SD	RSD	%Doğruluk	C _v
1	2	-0,00503	0,000328	0,0652	100,5	6,52
2	4	-0,00989	0,000280	0,0282	100,75	2,82
3	6	-0,01475	0,000176	0,0119	101	1,19
4	8	-0,01945	0,000261	0,0134	100,25	1,34
5	10	-0,02446	0,000300	0,0123	101	1,23

${}^1D_{258} = 0,0024C + 0,0002$ $r = 0,9999$

a : Her bir konsantrasyon için ölçümler 5 kez tekrarlanmıştır.

Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numunelerden askorbik asit tayinini için Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi ölçüm yapıldı ve elde edilen 1. Türev absorpsiyon spektrumu ve standart askorbik asit çözeltilerine ait absorpsiyon spektrumları 1. Türev absorbans ölçü eğrileri üst üste alındı. Spektrumların karşılaştırılması sonucu çalışılan numunelerde askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait türev absorbans değerlerinden yararlanılarak ölçü eğrisi çizildi ve pik sıfır uzunluğunun çalışılan numunelerde askorbik asit tayini için uygun olduğu saptandı.

6.1.2 Meyve ve Sebzelerde Askorbik Asit Tayini

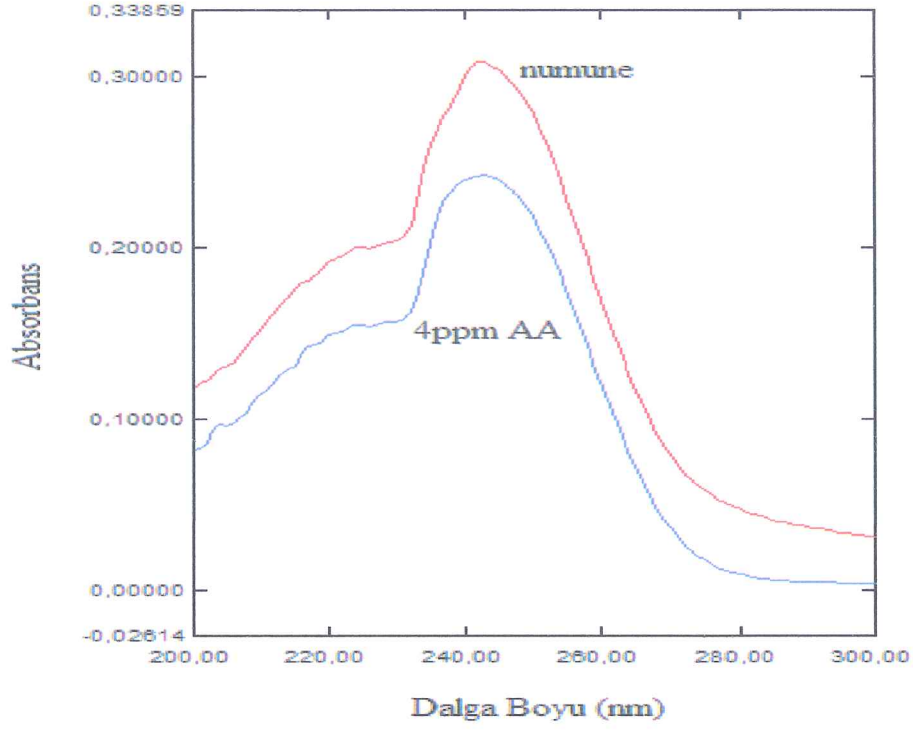
6.1.2.1 Ekstraksiyon

Meyve ve sebzelerin askorbik asit analizlerinde en önemli basamak uygun örnek ekstresinin hazırlanmasıdır. Meyve ve sebzelerden askorbik asidin kantitatif ekstraksiyonu için hava oksijeni, enzim ve diğer oksitleyiciler (Fe,Cu... gibi diğer metal iyonları) tarafından oksitlenmesinin önlenmesi, ölçme kademesi için uygun asitliğin sağlanması ve yüksek pH' daki bozunmasının önlenmesi amacıyla çeşitli asitler ve asit karışımları kullanılmıştır. Bunlar arasında metafosforik asit, asetik asit, trikloroasetik asit okzalik asit, sitrik asit ve asetik asit-metafosforik asit çözeltileri en çok kullanılanlardır.

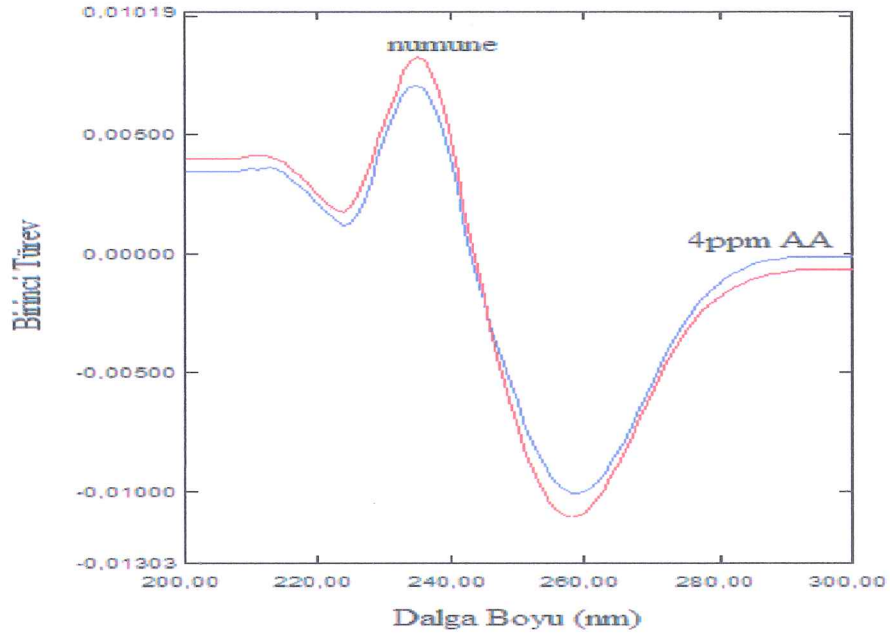
Meyve ve sebzelerde türev spektrofotometrisi ile askorbik asit tayini için uygun ekstraksiyon çözeltisinin saptanmasında; okzalik asit (%5), trikloroasetk asit (%5) metaforik asit(%6), asetik asit(%8),sitrik asit(%5), metafosforik asit –asetik asit(%3-8 ve %1.5-4) çözeltileri ile çalışılmış, metafosforik asit- asetik asit (%3-8) çözeltisi ile elde edilen meyve ve sebze ekstrelerinin spektrumlarının saf askorbik asidinkine en yakın olması nedeniyle bu karışım uygun ekstraksiyon çözeltisi olarak saptanmıştır. Bu çözeltinin diğer çözeltilere bir üstünlüğünün de bir protein çöktürücüsü olması ve bu nedenle berrak çözeltilerin elde edildiği, ayrıca metafosforik asit uygun asitliği sağladığından askorbik asidin oksidatif bozunma hızını azaltmaktadır.

6.1.2.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı biber, Çilek ve Kızılcık) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları kırmızı biber için Şekil 6.3, çilek için Şekil 6.4, kızılcık için ise Şekil 6.5 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyve ve sebzelerde askorbik asit tayini için 3 paralel çalışma yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları kırmızı biber için Çizelge 6.4, çilek için Çizelge 6.5, kızılcık için ise Çizelge 6.6 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.

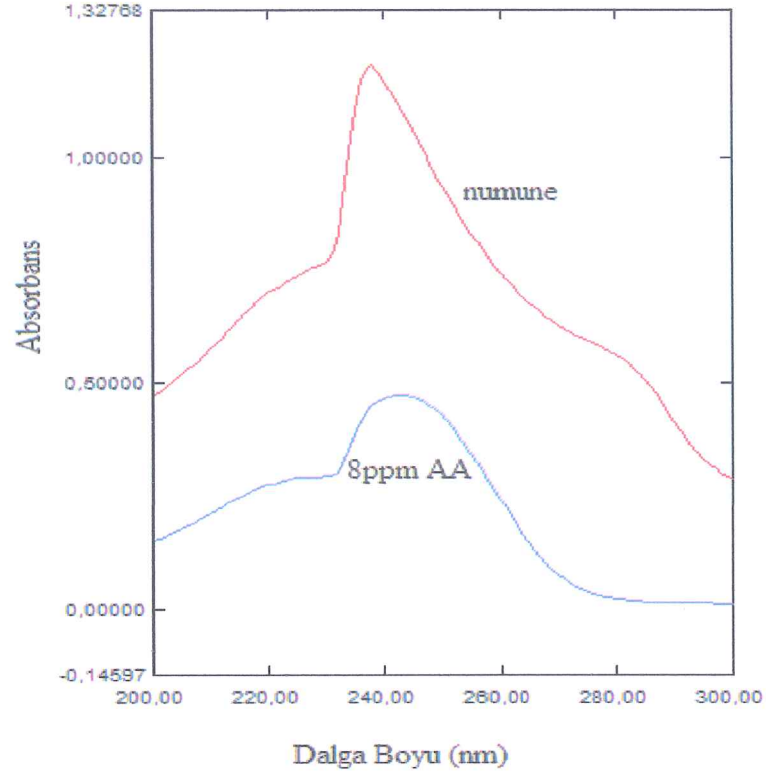


(a)

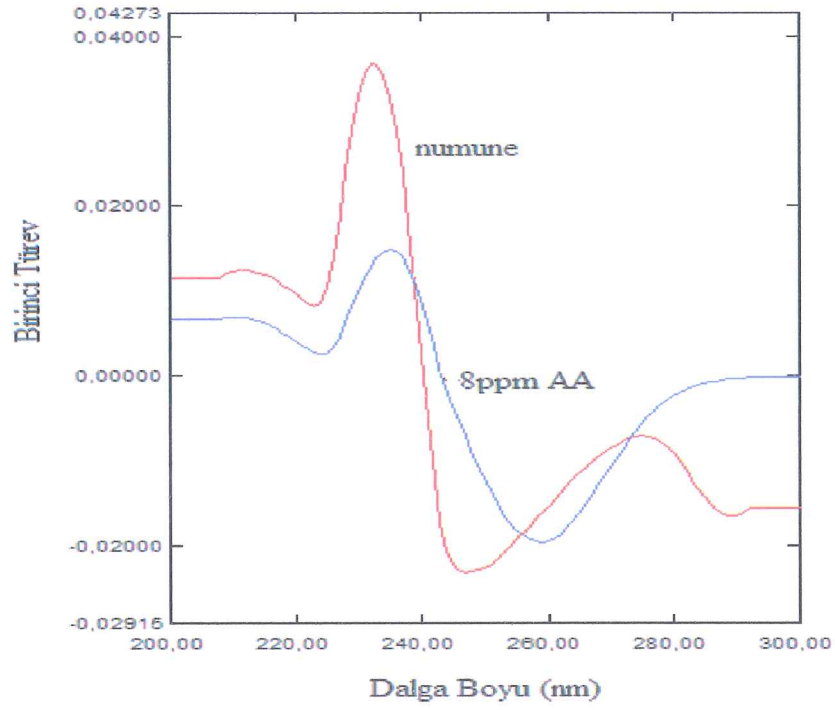


(b)

Şekil 6. 3 (a) Kırmızı biber ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Kırmızı biber ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları

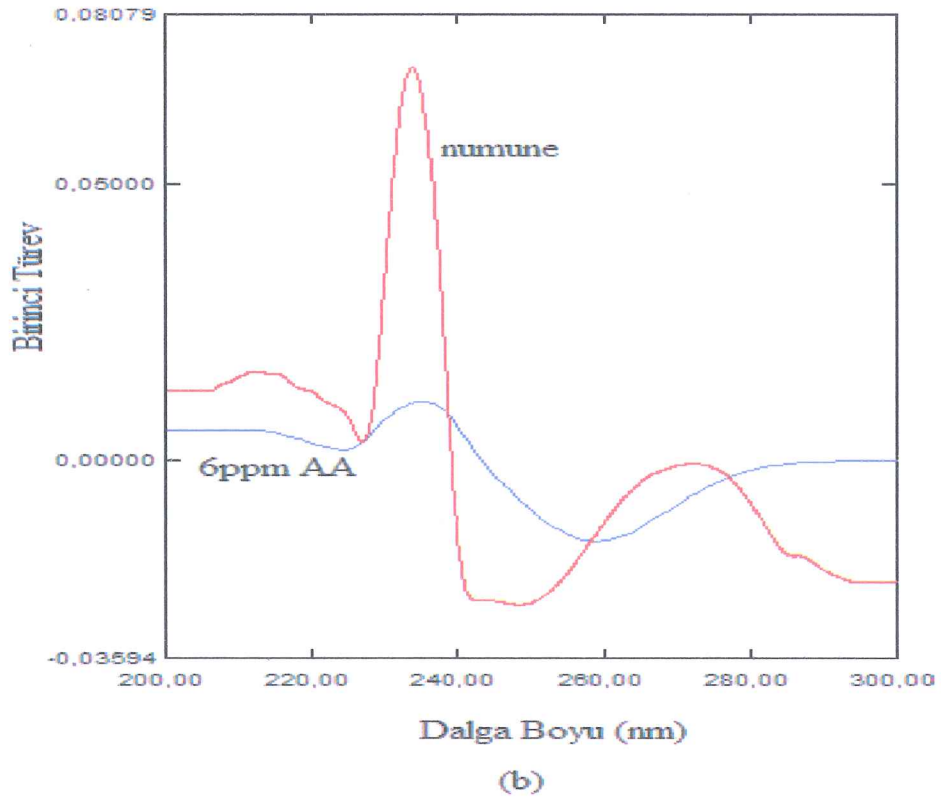
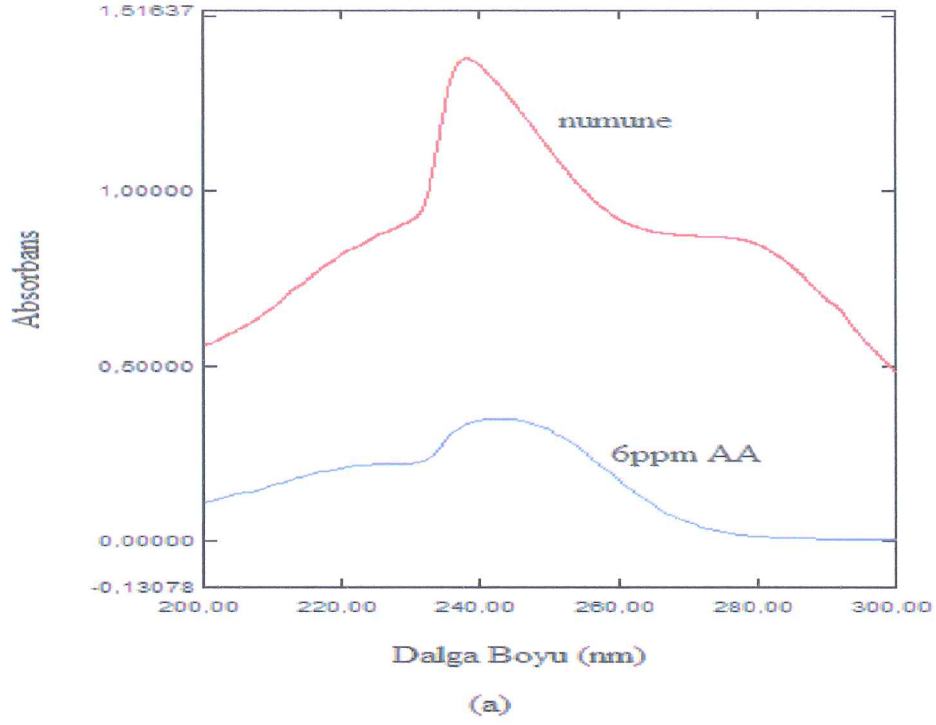


(a)



(b)

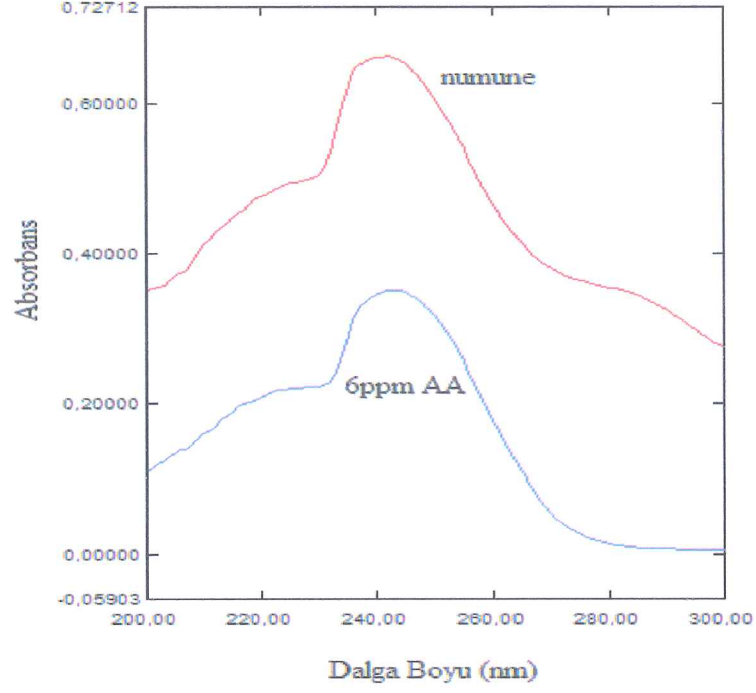
Şekil 6. 4 (a) Çilek ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Çilek ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları



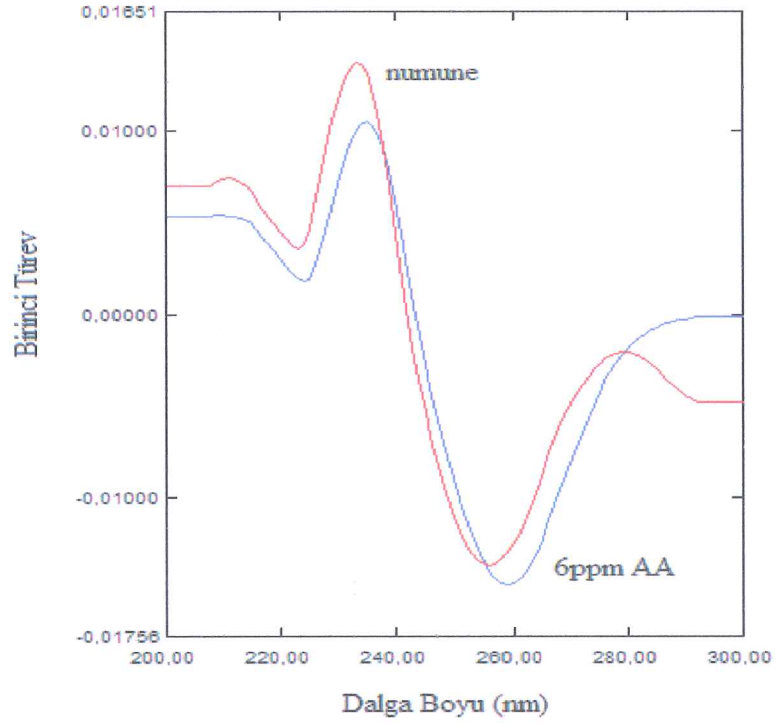
Şekil 6. 5 (a) Kızılcık ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Kızılcık ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

6.1.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Juss Portakal Nektarı için Şekil 6.6, Juss Karışık Meyve Nektarı için Şekil 6.7, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Şekil 6.8 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyvesularında askorbik asit tayini için 3 paralel çalışma yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Juss Portakal Nektarı için Çizelge 6.7, Juss Karışık Meyve Nektarı için Çizelge 6.8, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Çizelge 6.9 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.

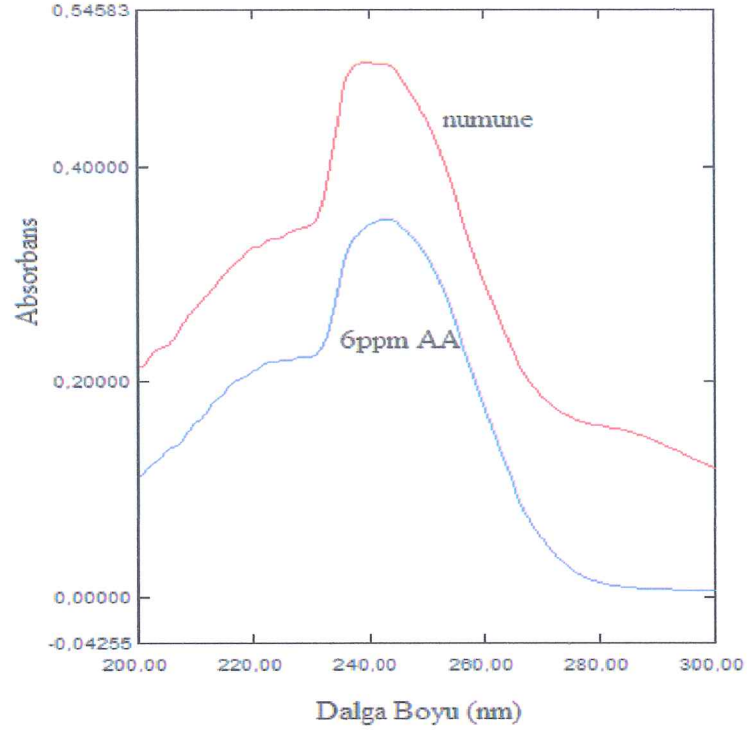


(a)

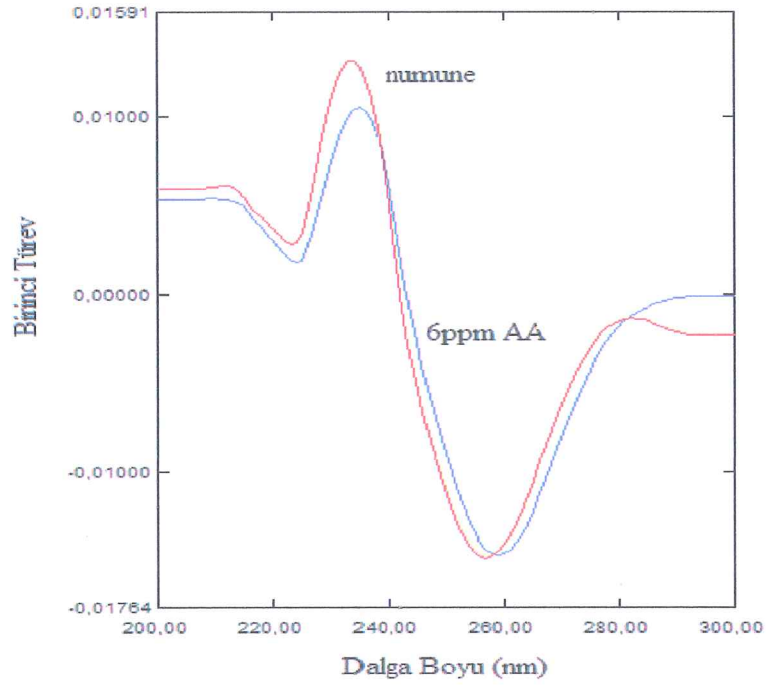


(b)

Şekil 6. 6 (a) Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

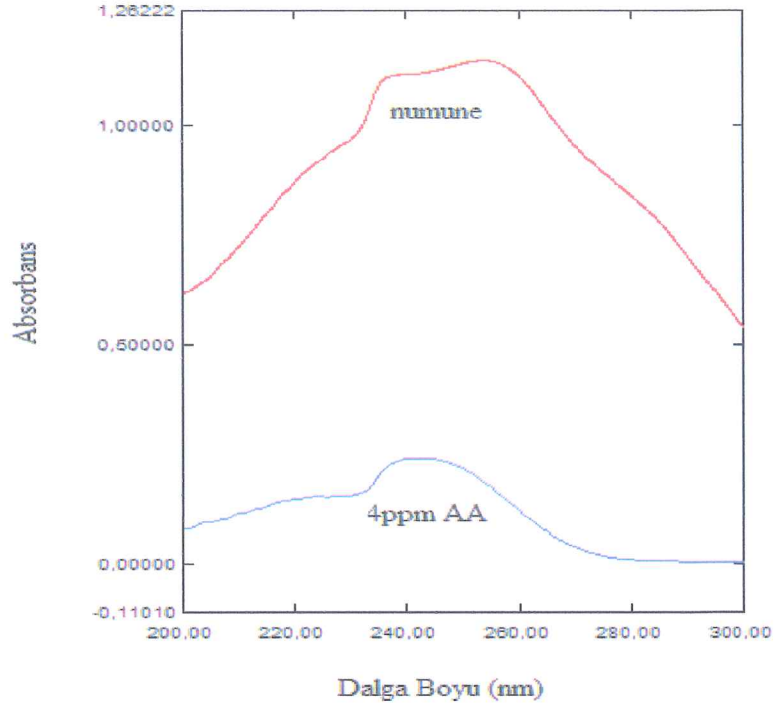


(a)

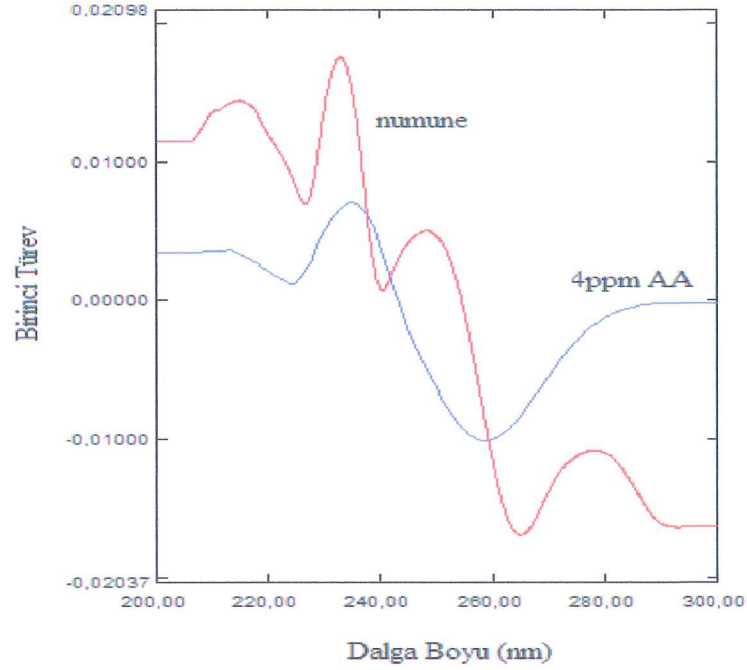


(b)

Şekil 6. 7 (a) Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları



(a)

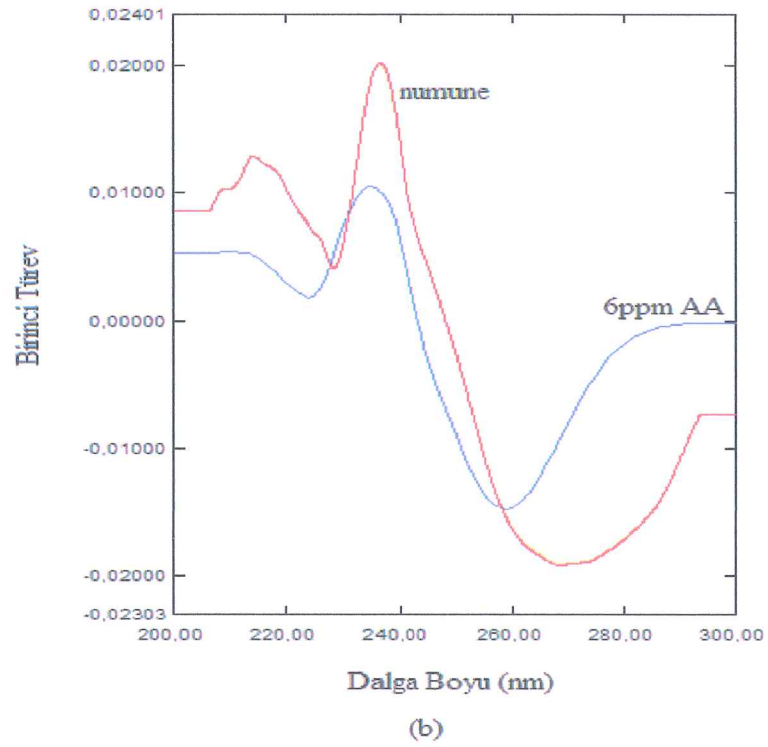
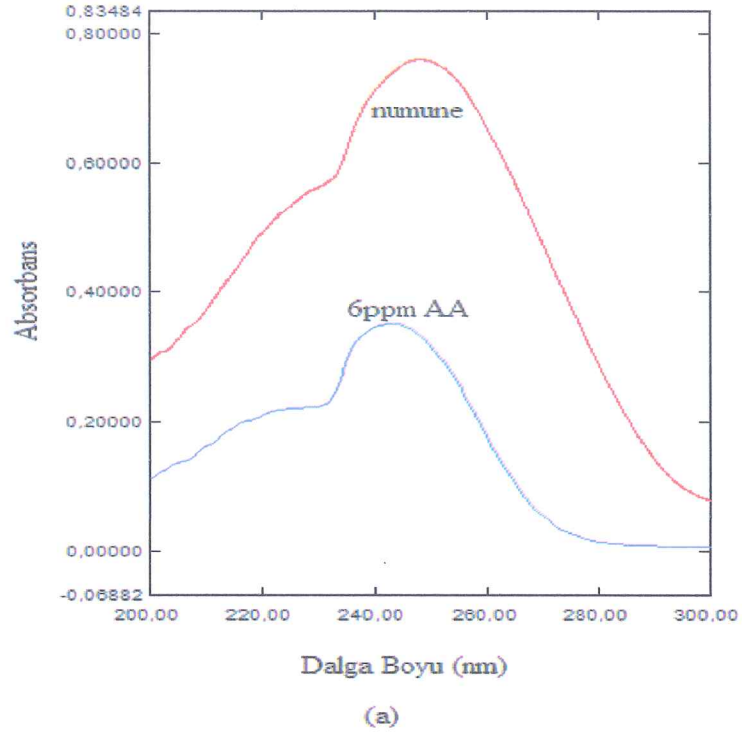


(b)

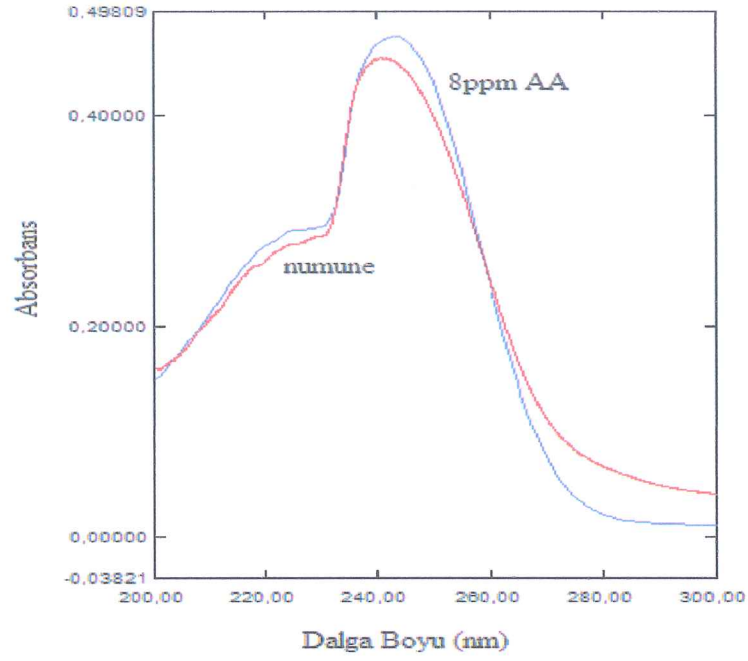
Şekil 6. 8 (a) Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

6.1.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon) Askorbik Asit Tayini

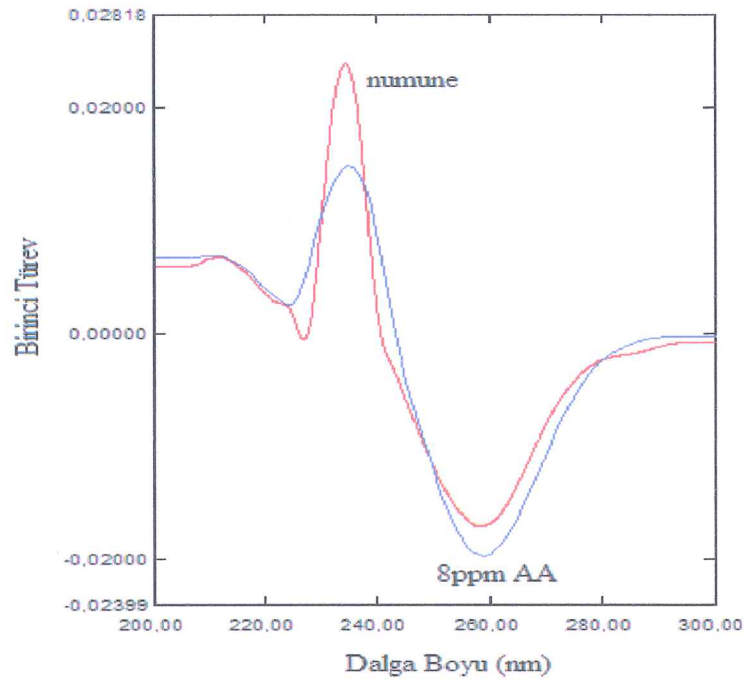
Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Sırma C Plus Mandalina için Şekil 6.9, Sırma C Plus Limon için ise Şekil 6.10 da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan gazlı içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel çalışma yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Sırma C Plus Mandalina için Çizelge 6.10, Sırma C Plus Limon için ise Çizelge 6.11 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X} \pm t \cdot s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 9 (a) Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları



(a)

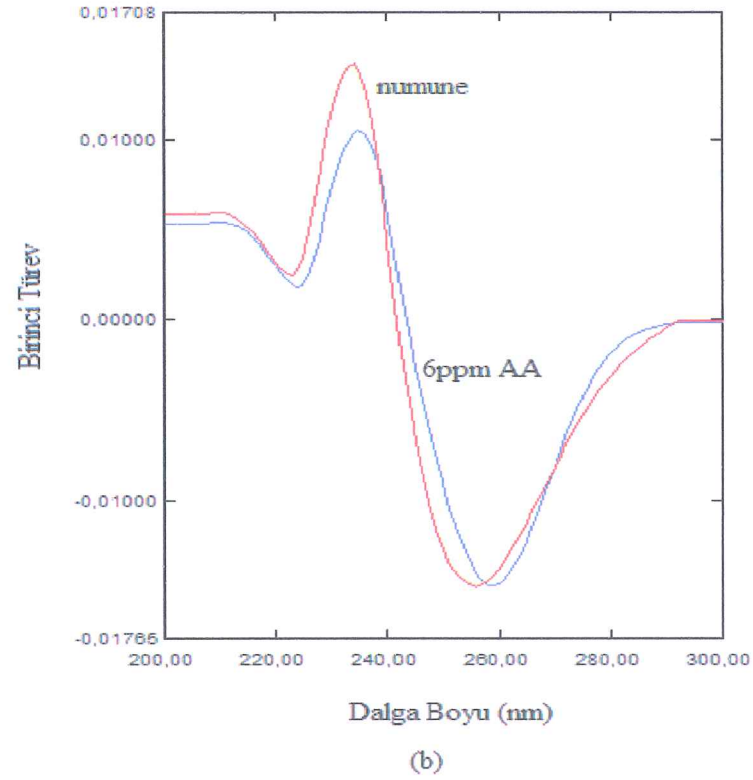
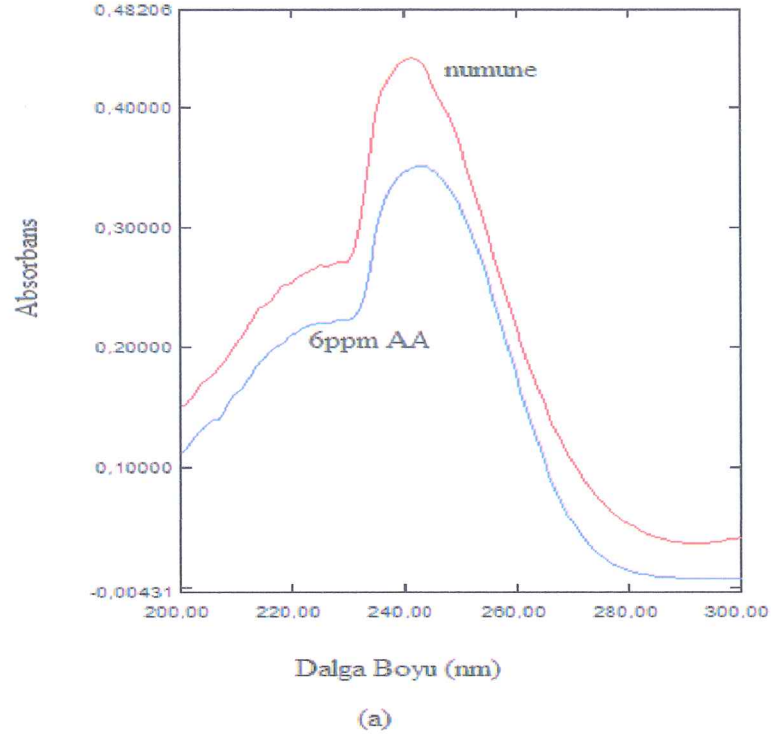


(b)

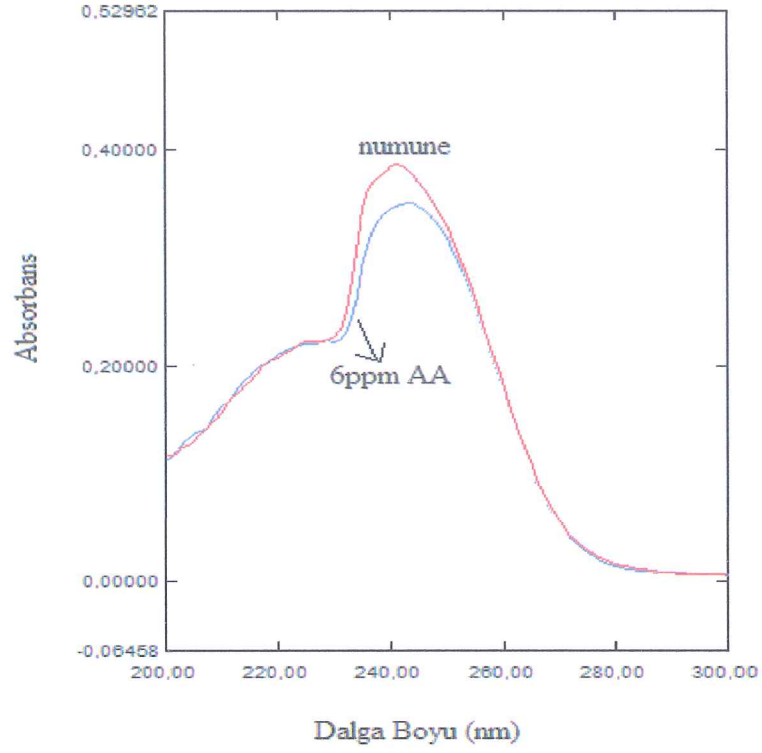
Şekil 6. 10 (a) Sırma C Plus Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Sırma C Plus Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

6.1.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne ve Tang Limon) Askorbik Asit Tayini

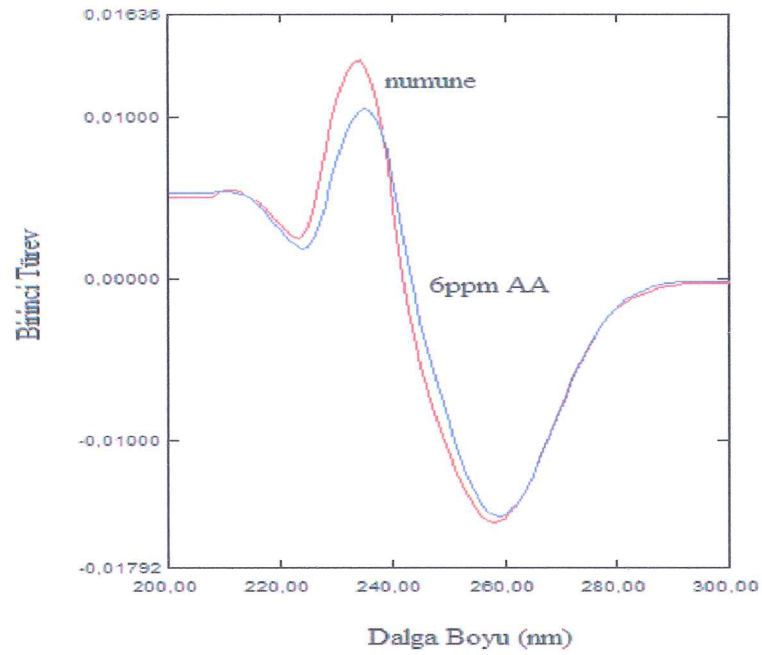
Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Tang Vişne için Şekil 6.11, Tang Limon için ise Şekil 6.12 de görölmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan toz içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel çalışma yapıldı ve izelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Tang Vişne için izelge 6.12, Tang Limon için ise izelge 6.13 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 11 (a) Tang Vışne ekstresinin ve askorbik asit çözeltilisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tang Vışne ekstresinin ve askorbik asit çözeltilisinin 1. türev spektrumları spektrumları



(a)

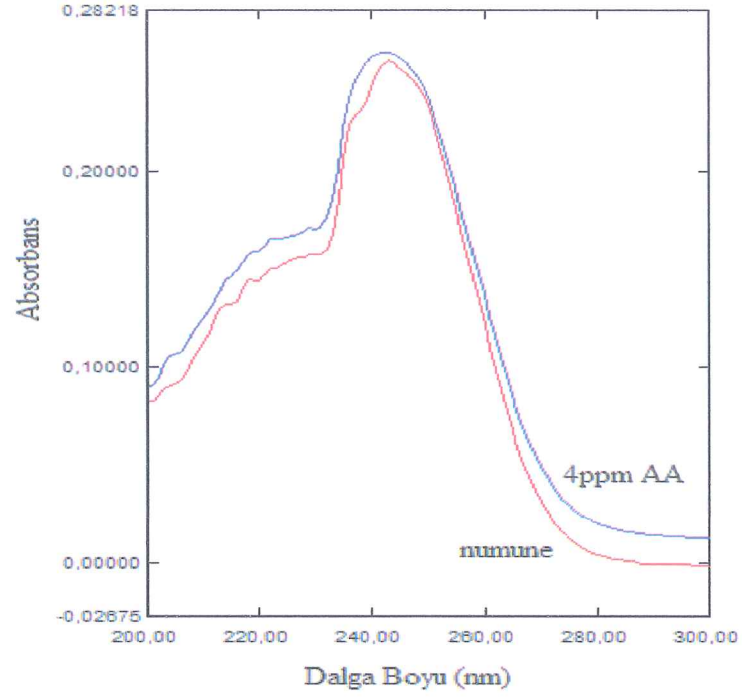


(b)

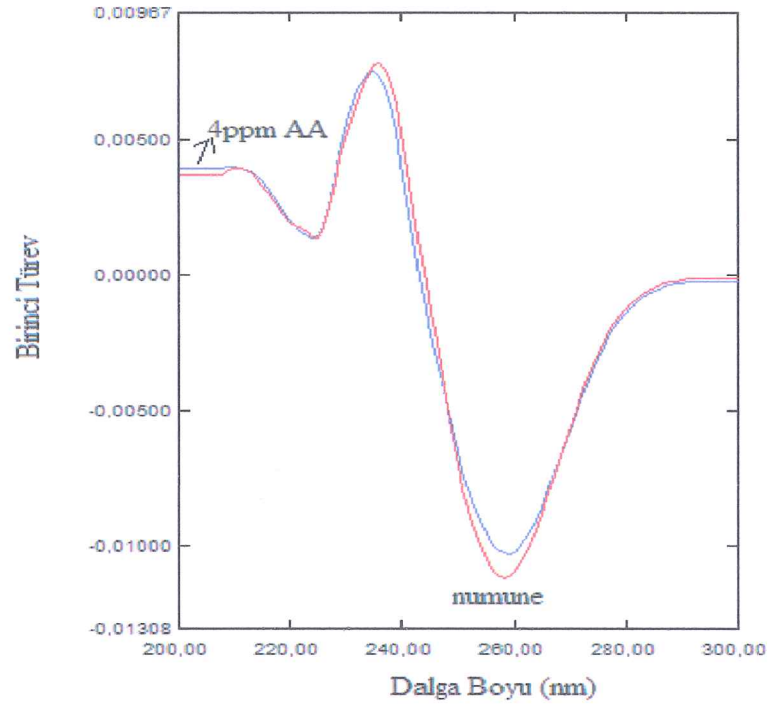
Şekil 6. 12 (a) Tang Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Tang Limon ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları

6.1.6 Farmasötik Numunelerde (Redoxor Çiğneme Tablet ve Aspirin Plus C) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Redoxor Çiğneme Tablet için Şekil 6.13, Aspirin Plus C için ise Şekil 6.14 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan farmasötik numunelerde askorbik asit tayini için 3 paralel çalışma yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Redoxor Çiğneme Tablet için Çizelge 6.14, Aspirin Plus C için ise Çizelge 6.15 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X} \pm t \cdot s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.

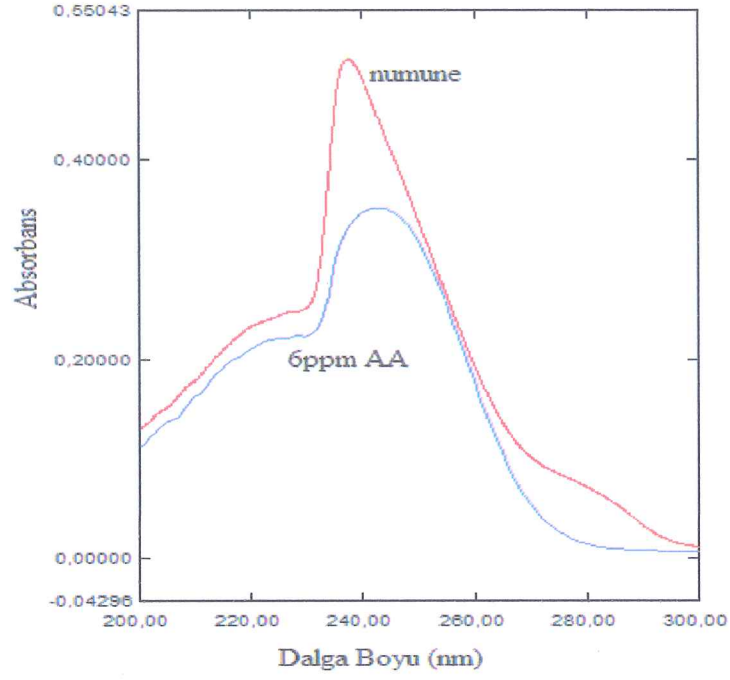


(a)

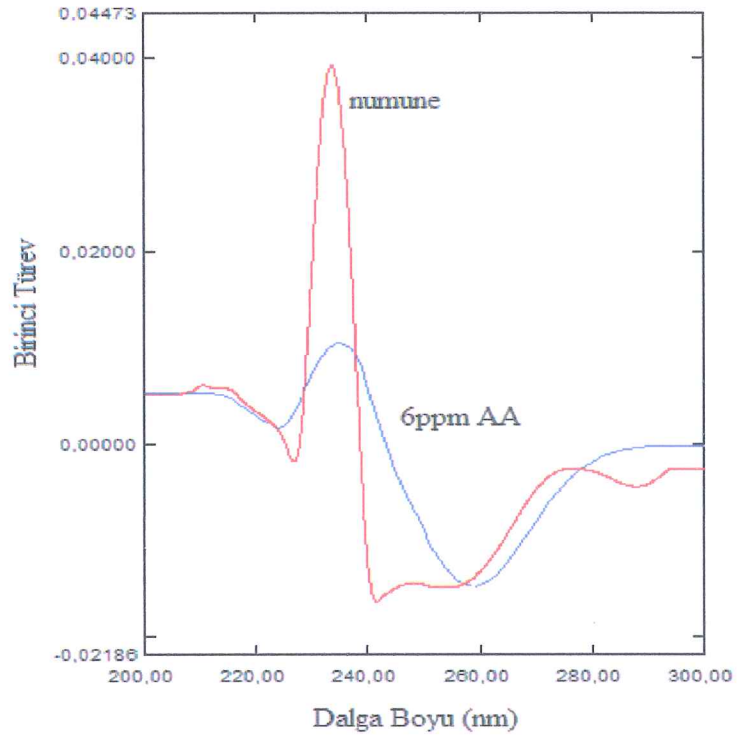


(b)

Şekil 6. 13 (a) Redoxor Çiğneme Tablet ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Redoxor Çiğneme Tablet ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları



(a)

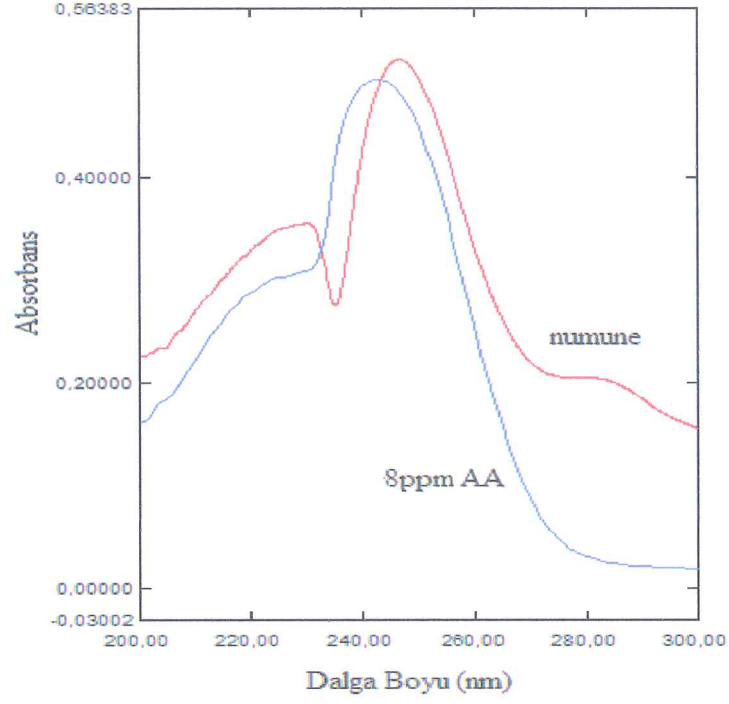


(b)

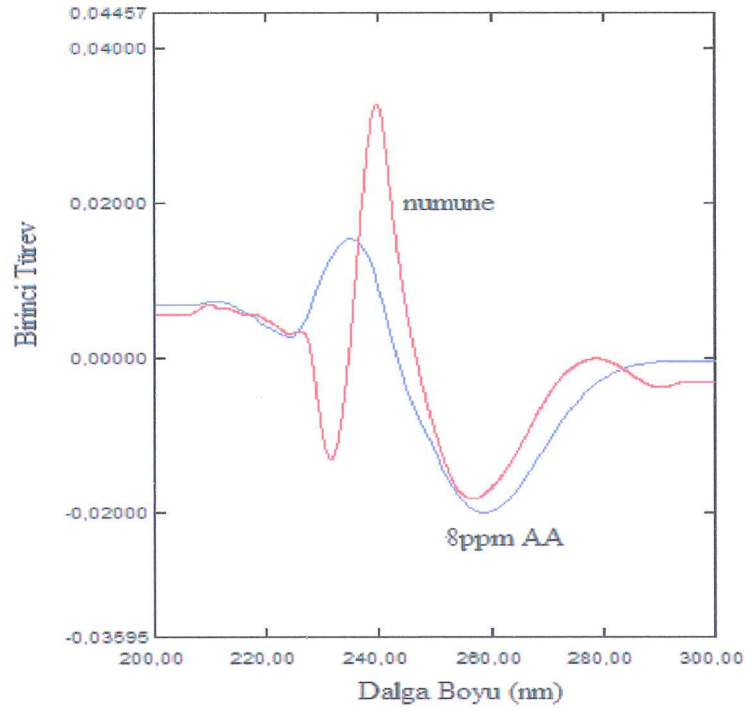
Şekil 6. 14 (a) Aspirin Plus C ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Aspirin Plus C ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları

6.1.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Şekil 6.15 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu Bebelac Elma Armut Püresinde askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorpsiyon değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan bebek mamasında askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.16 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X} \pm t \cdot s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



(a)

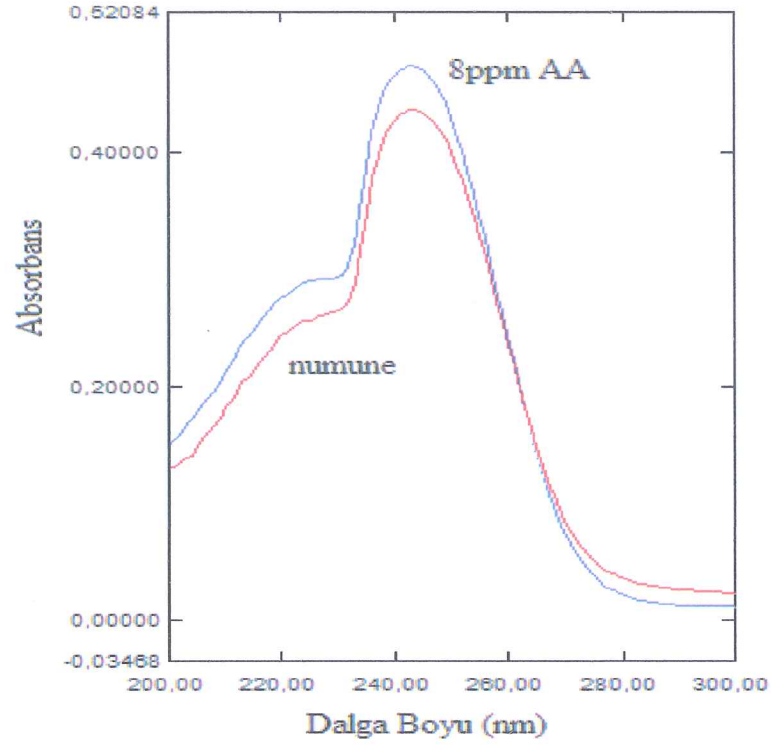


(b)

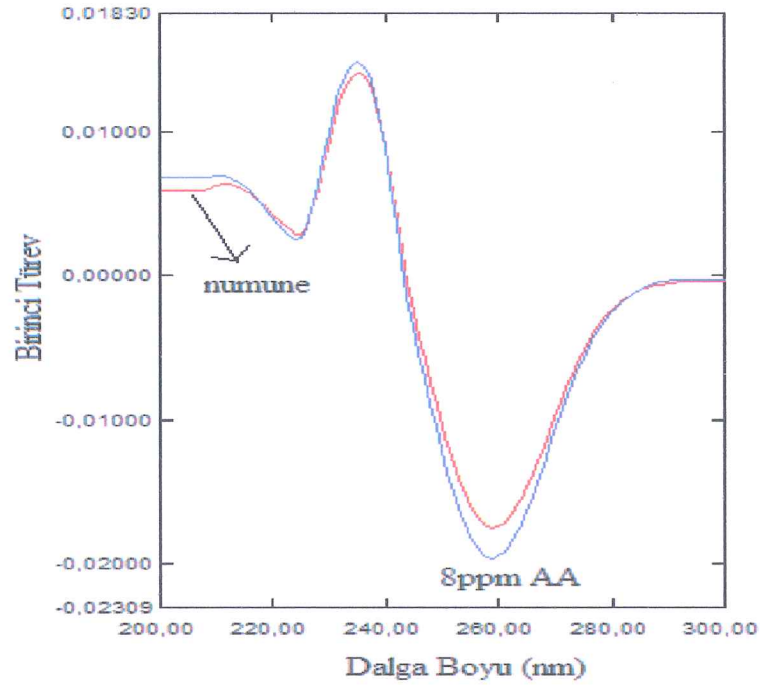
Şekil 6. 15 (a) Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

6.1.8 Şekerde (Kent Olips Limon&Portakal) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.1.4 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve 1. Derece türev spektrumları Şekil 6.16 da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu Kent Olips Limon&Portakal bon bon şekerde askorbik asit tayini için 1. Derece türev spektrumunda 258nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Kent Olips Limon&Portakal bon bon şekerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.1 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.17 de verilmiştir. Aynı tabloda üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



(a)



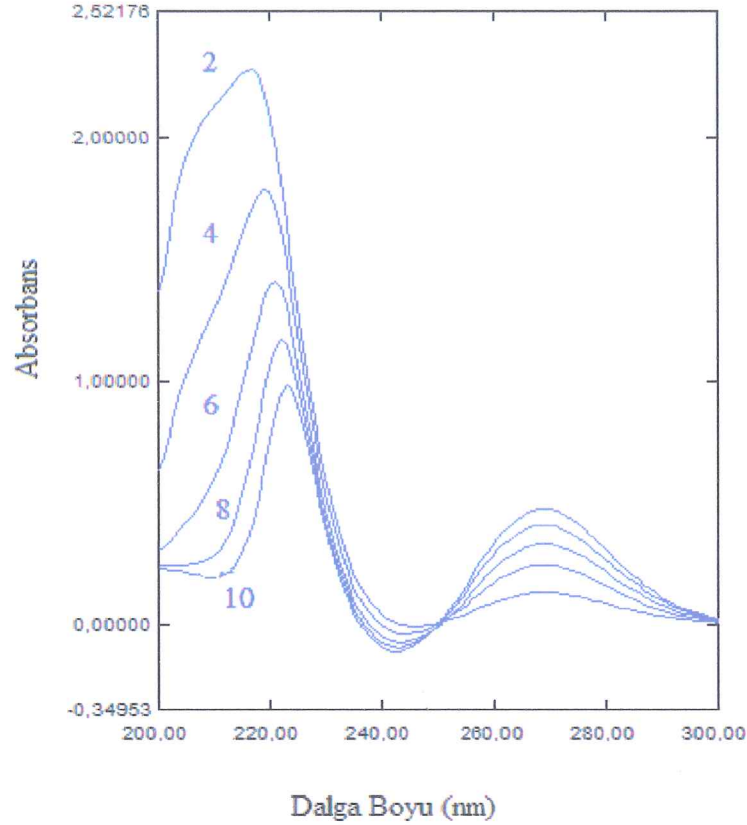
(b)

Şekil 6. 16 (a) Kent Olips Limon&Portakal bon bon şeker ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları, (b) Kent Olips Limon&Portakal bon bon şeker ekstresinin ve askorbik asit çözeltisinin 1. türev spektrumları spektrumları

6.2 Fark Yöntemi

6.2.1 Askorbik Asit Tayini İçin Uygun Koşulların Saptanması

Bölüm 5.3.2.2 de anlatıldığı şekilde yapılan Fark Yöntem ile askorbik asit tayini için 2-10 mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan standart askorbik asit çözeltilerinin fark absorpsiyon spektrumu Şekil 6.17 de görülmektedir.



Şekil 6. 17 Standart askorbik asit çözeltilerinin (2-10 mg.L⁻¹) fark absorpsiyon spektrumu

Ölçü eğrisine ait konsantrasyon ve karşılığı olan ortalama absorbans değerleri Çizelge 6.2 de verilmiştir. Ortalama absorbans değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi, numunelerde askorbik asit tayini için kullanılmıştır.

Çizelge 6.2 Ortalama absorbans değerlerinden çizilen ölçü eğrisi ve bu eğriye ait doğru denklemi

No	C (mg.L ⁻¹)	¹ D _{ort} ^(a)	SD	RSD	%Doğruluk	C _v
1	2	0,12780	0,00325	0,0254	80,2	2,54
2	4	0,24001	0,00751	0,0313	106,75	3,12
3	6	0,32402	0,00684	0,0109	104,5	1,09
4	8	0,40336	0,00857	0,0212	102	2,12
5	10	0,46584	0,00464	0,0096	96,53	0,95
D₂₆₉: 0,042C+0,0604				r: 0,9887		

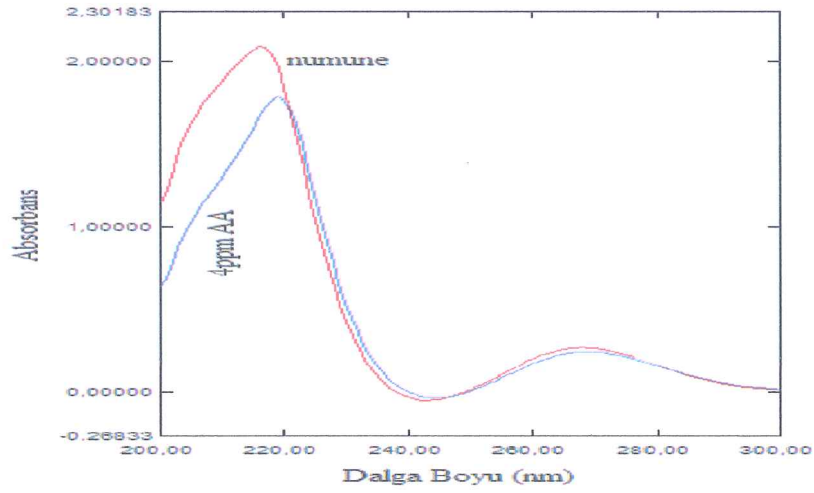
a : Her bir konsantrasyon için ölçümler 5 kez tekrarlanmıştır.

Bölüm 5.2 de anlatıldığı şekilde hazırlanan numunelerden askorbik asit tayinini için Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi ölçüm yapıldı ve elde edilen fark absorpsiyon spektrumu ve standart askorbik asit fark absorpsiyon ölçü eğrileri üst üste alındı. Spektrumların karşılaştırılması sonucu çalışılan numunelerde askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanılarak ölçü eğrisi çizildi ve çalışılan numunelerde askorbik asit tayini için uygun olduğu saptandı.

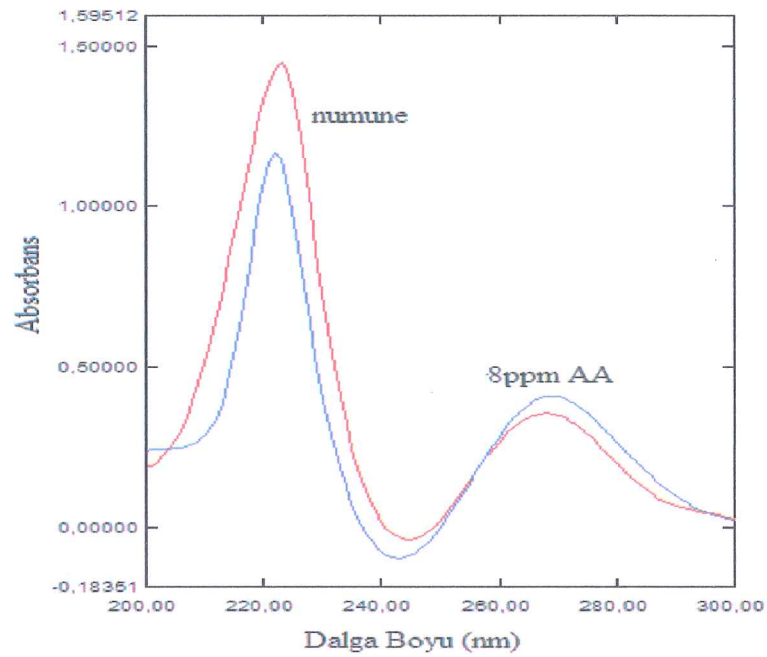
6.2.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı Biber, Çilek ve Kızılcık) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorpsiyon spektrumları kırmızı biber için Şekil 6.18, çilek için Şekil 6.19, kızılcık için ise Şekil 6.20 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu meyve ve sebzelerde (kırmızı biber, çilek ve kızılcık) askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyve ve sebzelerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları kırmızı biber için Çizelge 6.4, çilek için Çizelge 6.5, kızılcık için ise Çizelge 6.6 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan

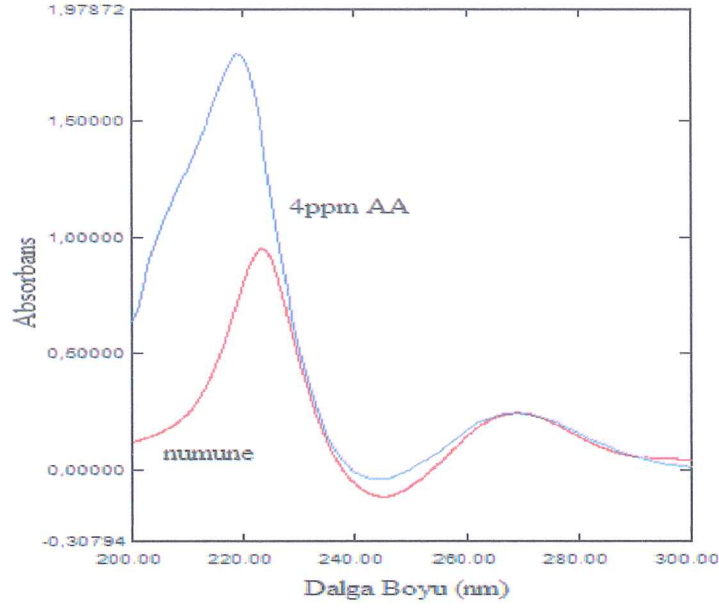
ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 18 Kırmızı biber ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



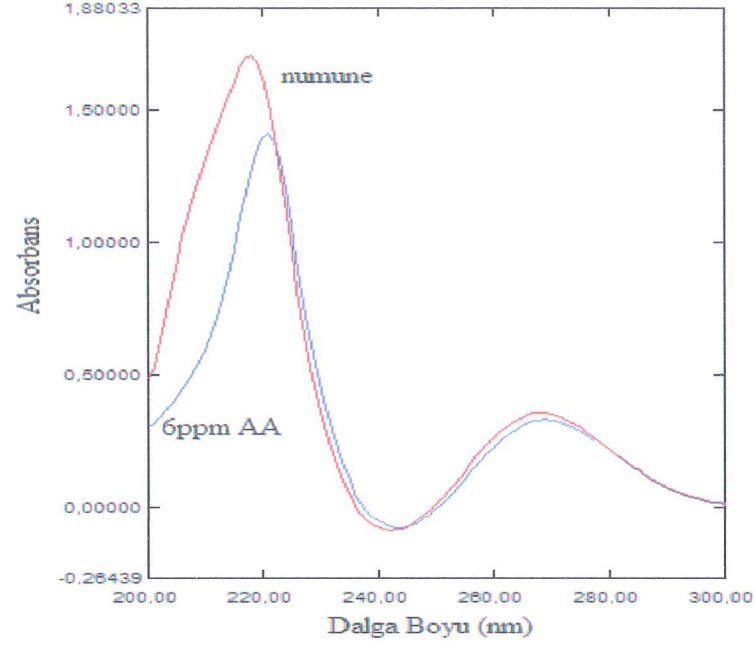
Şekil 6. 19 Çilek ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



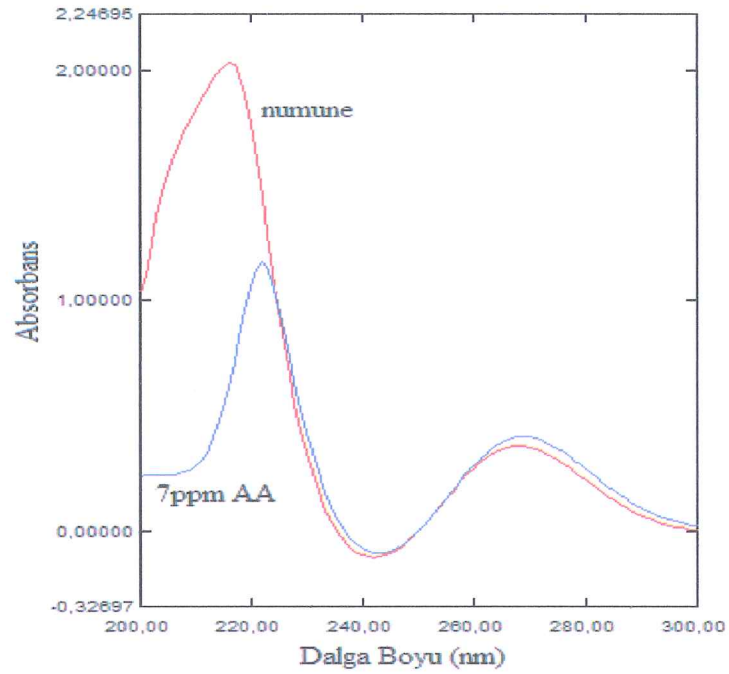
Şekil 6. 20 Kızılıçık ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini

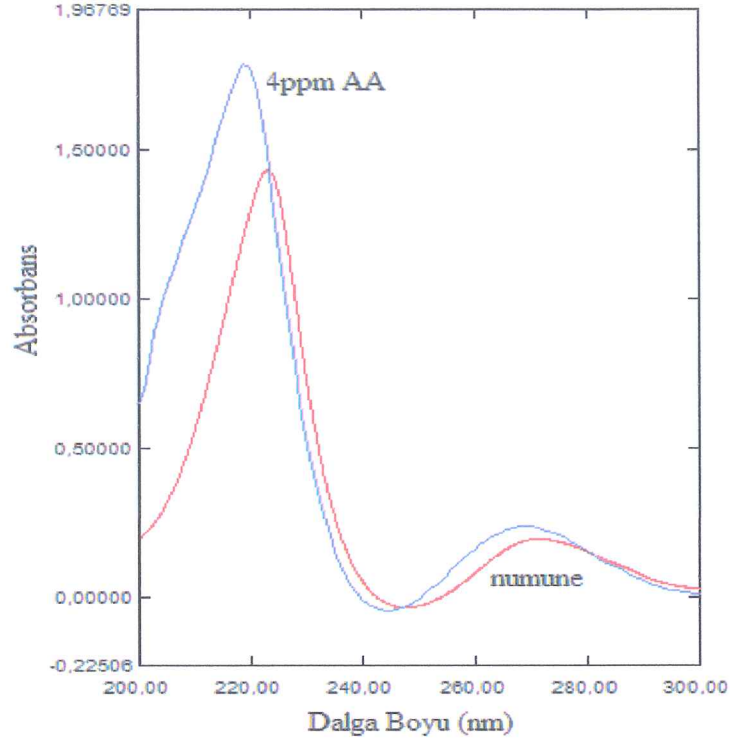
Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorpsiyon spektrumları Juss Portakal Nektarı için Şekil 6.21, Juss Karışık Meyve Nektarı için Şekil 6.22, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Şekil 6.23 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal Nektarı) askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyvesularında askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Juss Portakal Nektarı için Çizelge 6.7, Juss Karışık Meyve Nektarı için Çizelge 6.8, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Çizelge 6.9 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t \cdot s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 21 Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



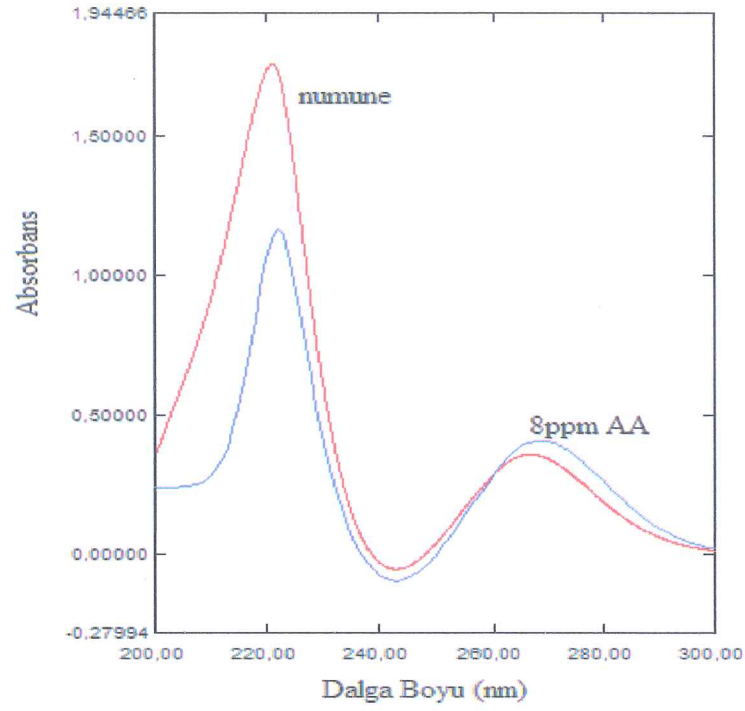
Şekil 6. 22 Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



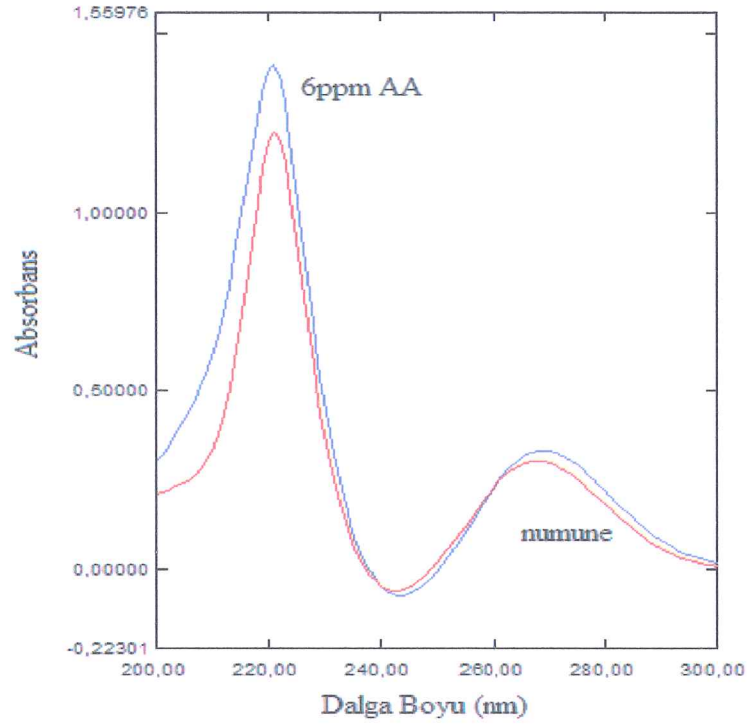
Şekil 6. 23 Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorpsiyon spektrumları Sırma C Plus Mandalina için Şekil 6.24, Sırma C Plus Limon için Şekil 6.25 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu gazlı içeceklerde (Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon) askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan gazlı içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 da belirtilen ölçü eğri denkleminden yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Sırma C Plus Mandalina için Çizelge 6.10, Sırma C Plus Limon için Çizelge 6.11 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



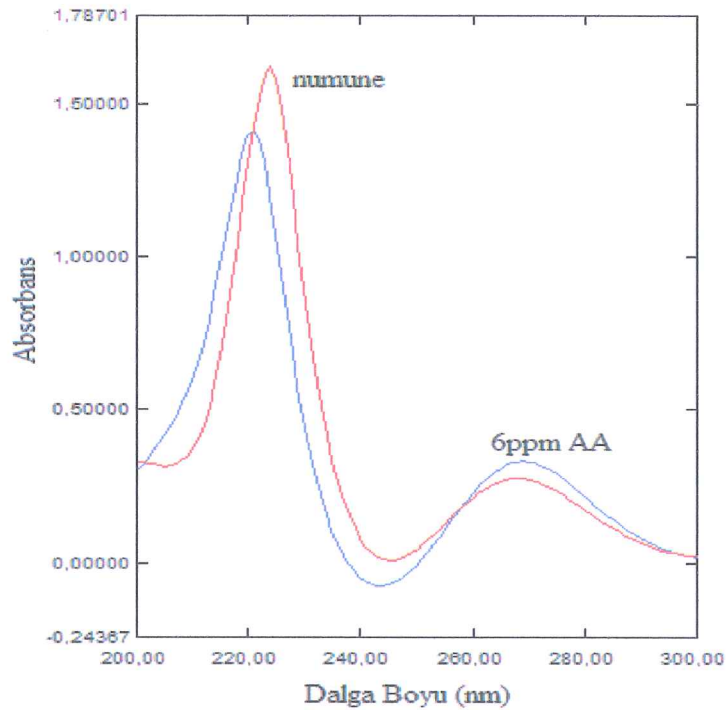
Şekil 6. 24 Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



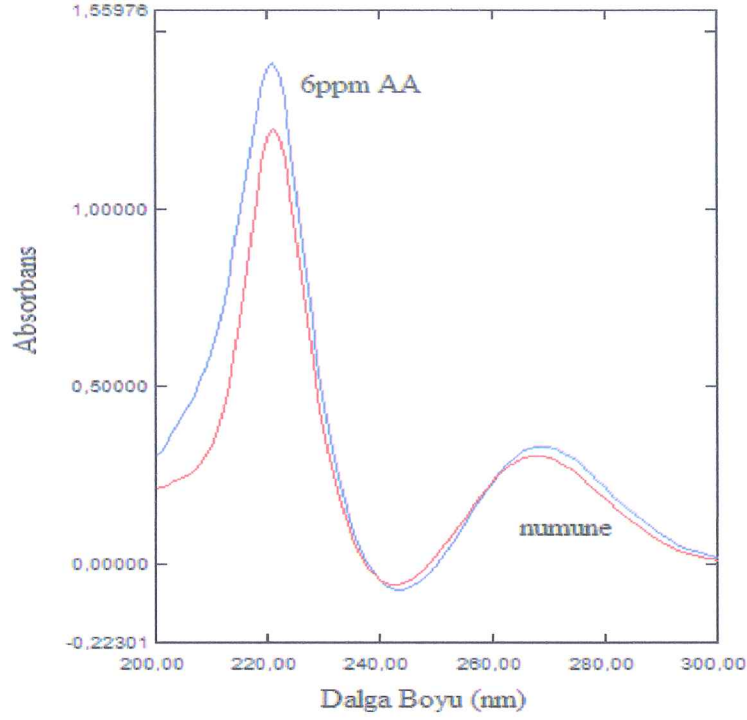
Şekil 6. 25 Sırma C Plus Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne ve Tang Limon) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorpsiyon spektrumları Tang Vişne için Şekil 6.26, Tang Limon için Şekil 6.27 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu toz içeceklerde (Tang Vişne ve Tang Limon) askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan toz içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Tang Vişne için Çizelge 6.12, Tang Limon için Çizelge 6.13 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



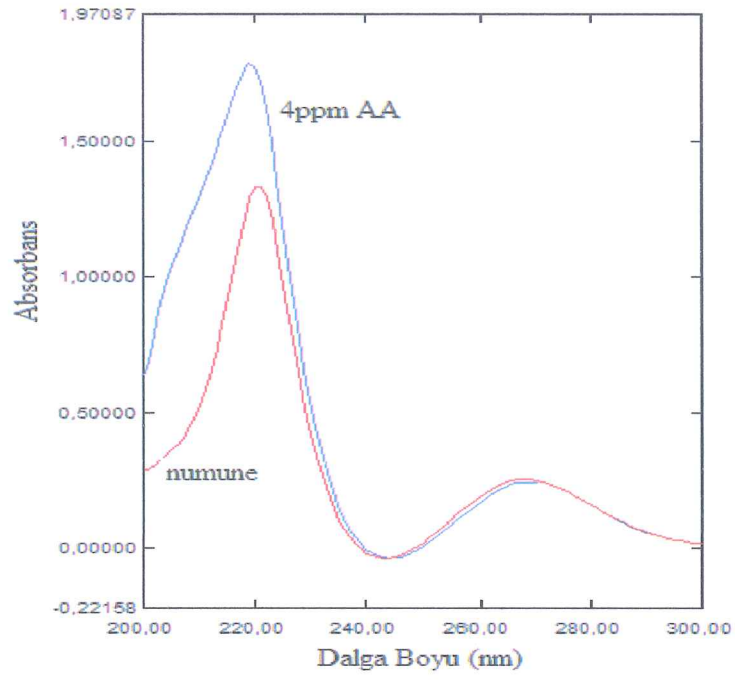
Şekil 6. 26 Tang Vişne ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



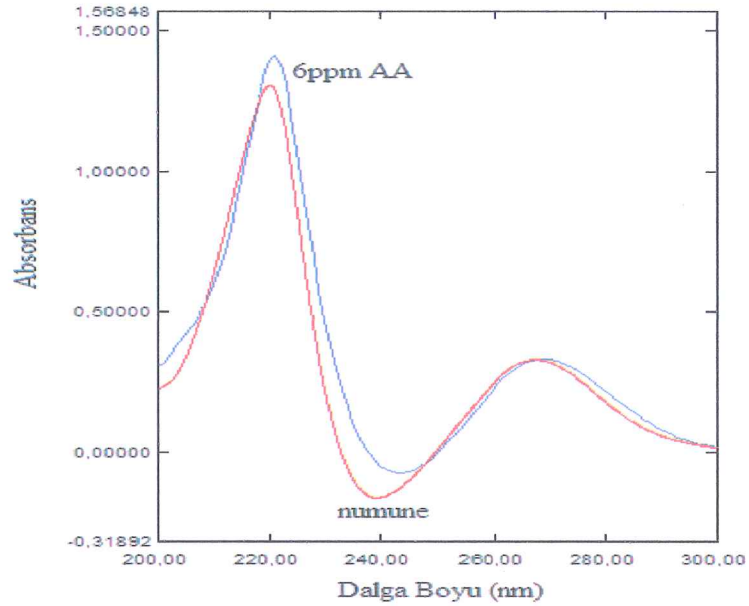
Şekil 6. 27 Tang Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.6 Farmasötik Numunelerde (Redoxor Çiğneme Tableti ve Aspirin Plus C) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorpsiyon spektrumları Redoxor Çiğneme Tableti için Şekil 6.28, Aspirin Plus C için Şekil 6.29 da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu farmasötik numunelerde (Redoxor Çiğneme Tableti ve Aspirin Plus C) askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan farmasötik numunelerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.17 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Redoxor Çiğneme Tableti için Çizelge 6.14, Aspirin Plus C için Çizelge 6.15 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



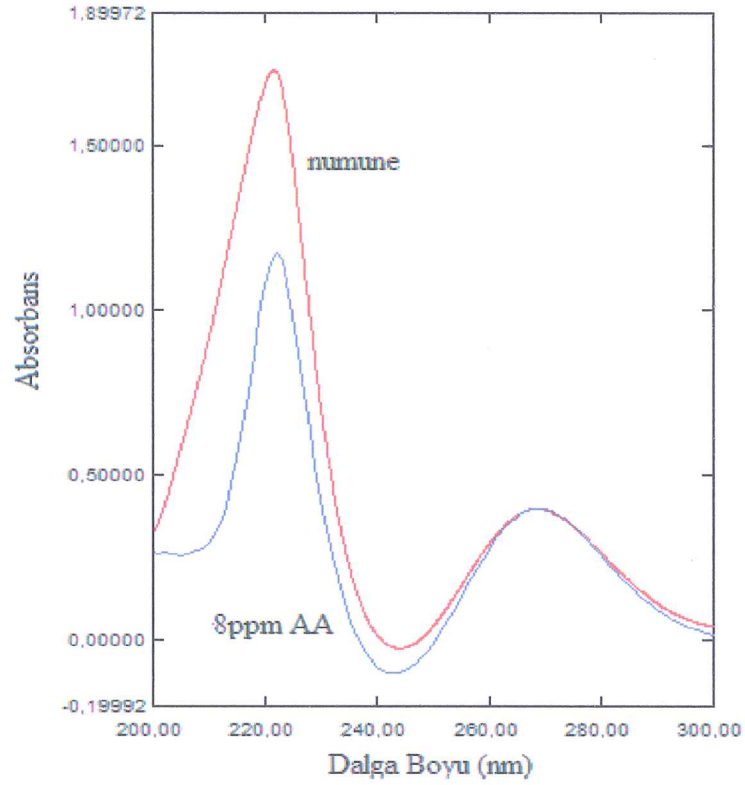
Şekil 6. 28 Redoxor Çiğneme Tableti ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları



Şekil 6. 29 Aspirin Plus C ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini

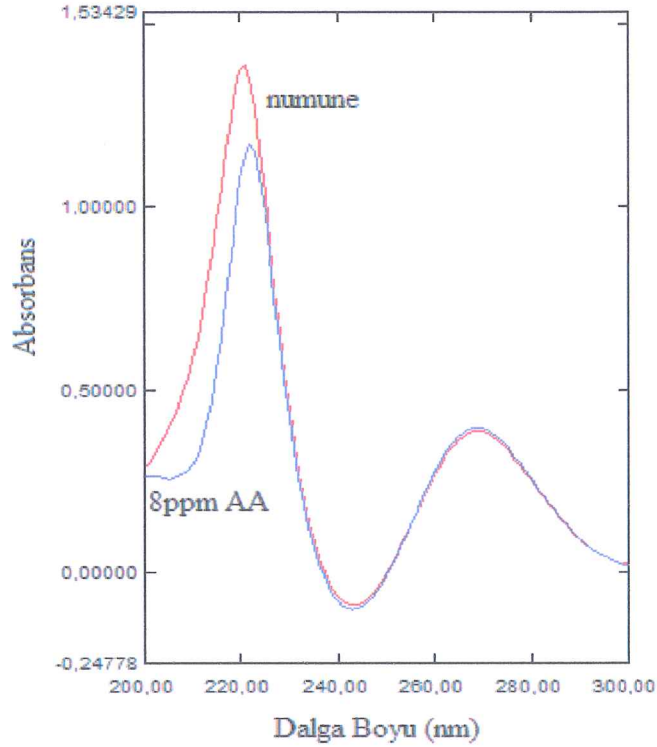
Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorbans spektrumları Şekil 6.30 da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu Bebelac Elma Armut Püresinde askorbik asit tayini için fark absorpsiyon spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Bebelac Elma Armut Püresinde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.16 da verilmiştir. Aynı çizelgede üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 30 Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.2.8 Şekerde (Kent Olips Limon&Portakal)Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.2.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen fark absorpsiyon ve standart askorbik asit fark absorbans spektrumları Şekil 6.31 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu Kent Olips Limon&Portakal bon bon şekerde askorbik asit tayini için fark absorbans spektrumunda 269 nm'deki maksimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Olips Limon&Portakal bon bon şekerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.2 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.17 de sonucu verilmiştir. Aynı çizelgede üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.

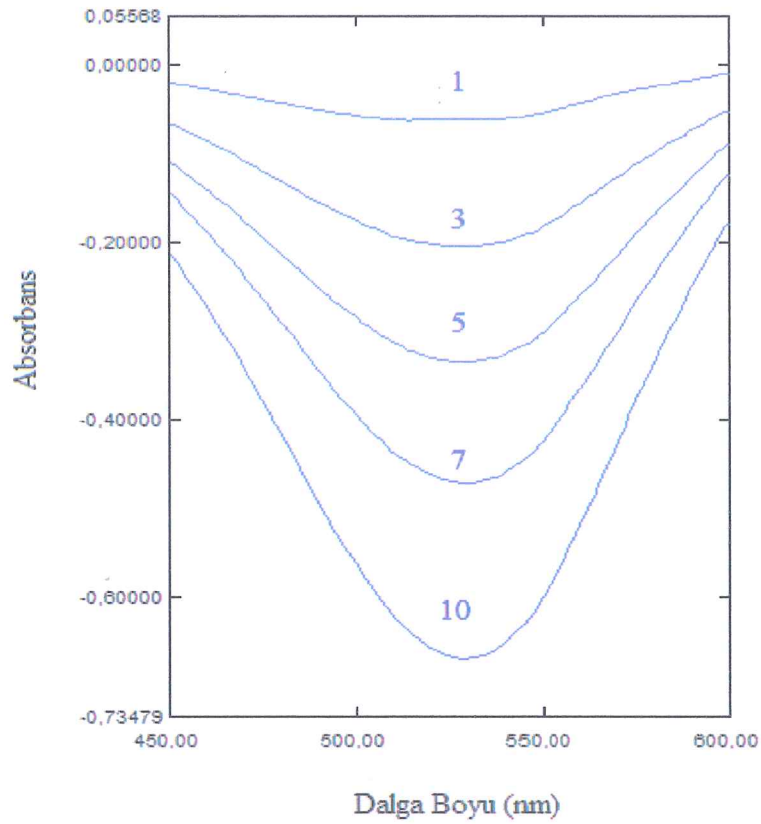


Şekil 6. 31 Kent Olips Limon&Portakal ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin fark absorpsiyon spektrumları

6.3 Modifiye Spektrofotometrik Yöntem

6.3.1 Askorbik Asit Tayini İçin Uygun Koşulların Sağlanması

Bölüm 5.3.3.2 de anlatıldığı şekilde yapılan spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini için 1-10mg.L⁻¹ konsantrasyon aralığında hazırlanan standart askorbik asit çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları Şekil 6.32 de görülmektedir. Absorbans değerlerinden çizilen ölçü eğrilerine ait doğru denklemi, numunelerde askorbik asit tayini için kullanılmıştır.



Şekil 6. 32 Standart askorbik asit çözeltilisinin (1-10mg.L⁻¹) absorpsiyon spektrumları

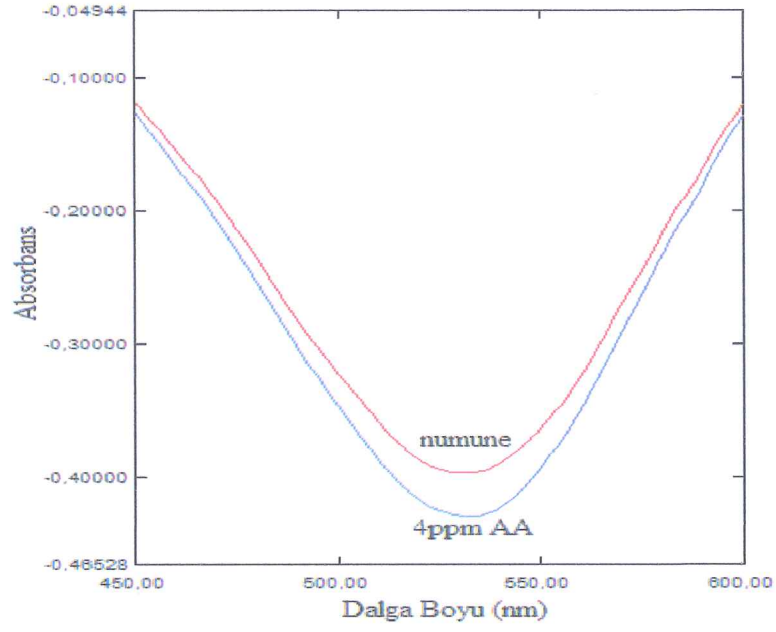
Modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit analizi yapılırken 2,6-DCIP çözeltisi, numunede askorbik asit analizi için günlük olarak hazırlandı. Numunelerde askorbik asit tayini için kullanılan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler Çizelge 6.3 de gösterilmiştir.

Çizelge 6.3 Numunelerde askorbik asit tayini için kullanılan ölçü eğrilerinin regresyon analizlerine ait parametreler

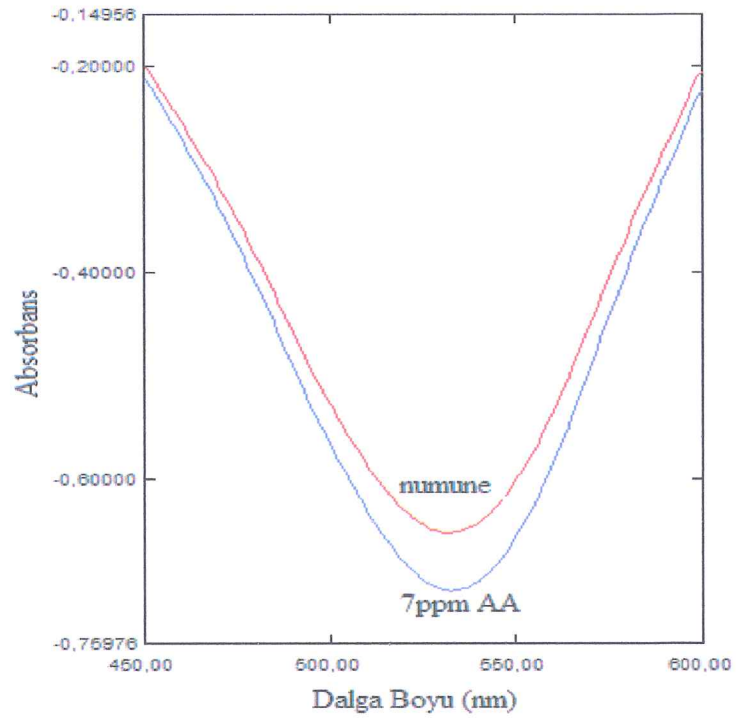
	Olips	Kırmızı biber Juss Portakal Juss Karışık	Çilek Tamek Kan Portakal	Tang Vişne	Tang Limon Redoxor	Sırma Limon SırmaMandali na Bebelac Mama Aspirin Plus C	Kızılıcık
a	0.0845	0.0869	0.0909	0.0826	0.0674	0.0698	0.0618
b	0.0318	-0.015	0.0578	0.0693	-0.0028	-0.0192	-0.0816
r	0.9934	0.9935	0.9941	0.9968	0.9998	0.9981	0.9984

6.3.2 Meyve ve Sebzelerde (Kırmızı Biber, Çilek ve Kızılıcık) Askorbik Asit Tayini

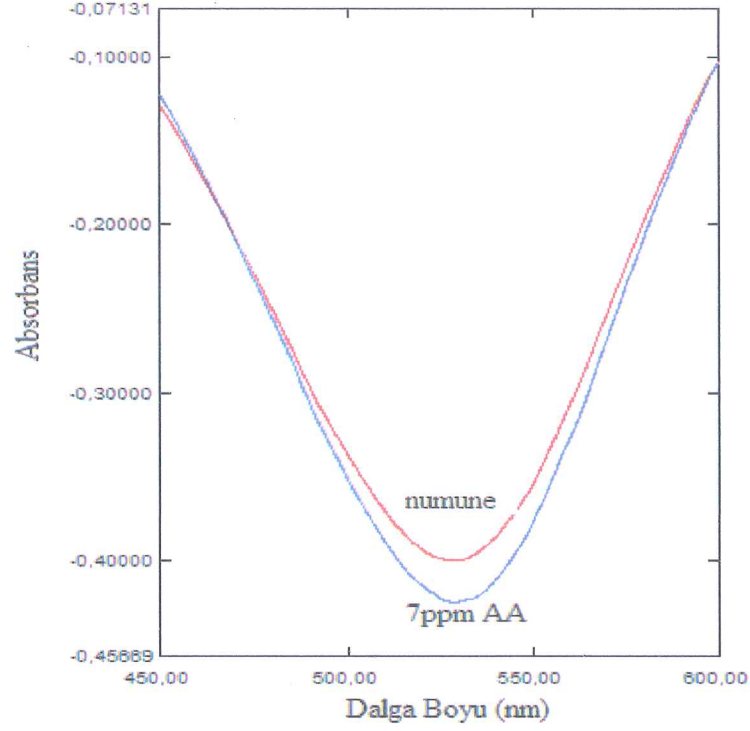
Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları kırmızı biber için Şekil 6.33, çilek için Şekil 6.34, kızılıcık için ise Şekil 6.35 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu meyve ve sebzelerde (kırmızı biber, çilek ve kızılıcık) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyve ve sebzelerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları kırmızı biber için Çizelge 6.4, çilek için Çizelge 6.5, kızılıcık için ise Çizelge 6.6 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 33 Kırmızı biber ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



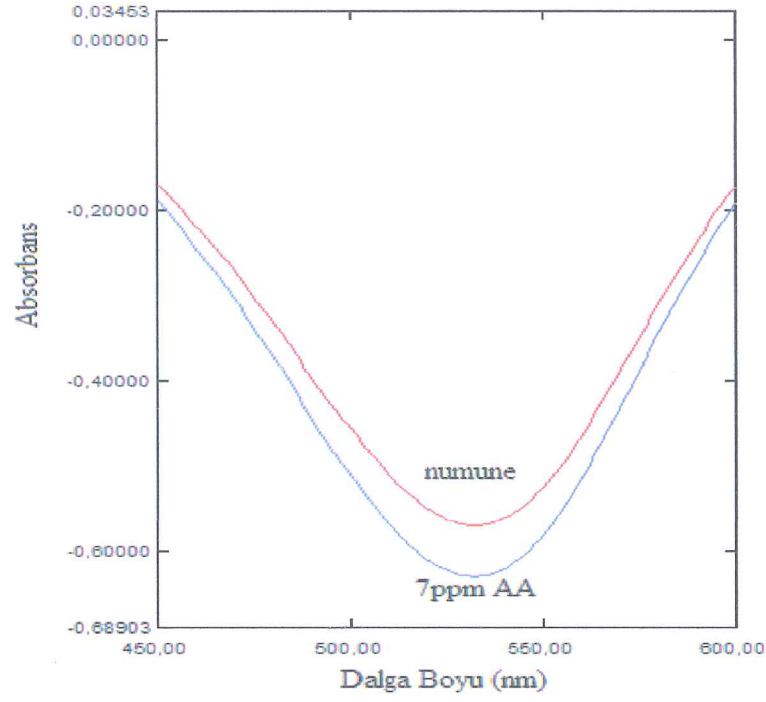
Şekil 6. 34 Çilek ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



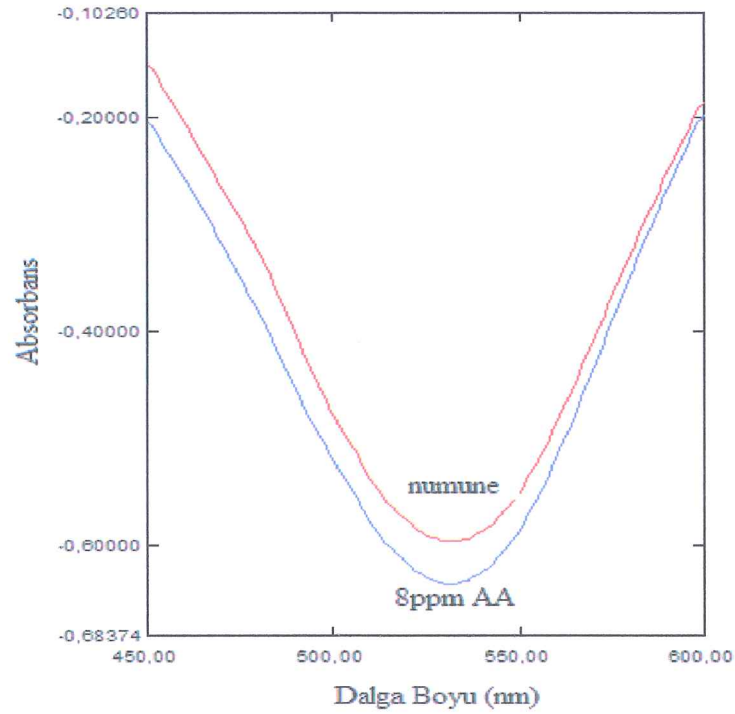
Şekil 6.35 Kızılıcık ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.3 Meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal Nektarı) Askorbik Asit Tayini

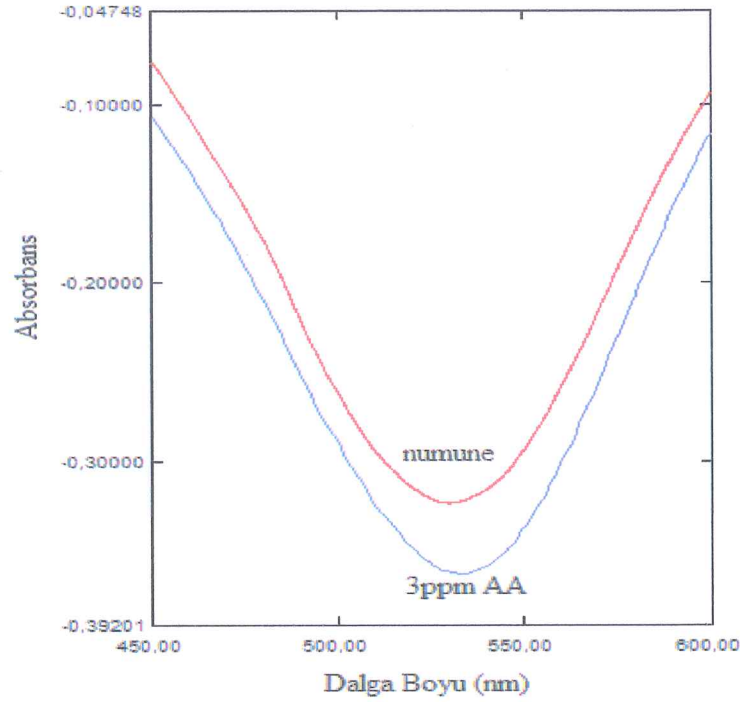
Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları spektrumları Juss Portakal Nektarı için Şekil 6.36, Juss Karışık Meyve Nektarı için Şekil 6.37, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Şekil 6.38 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu meyvesularında (Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı ve Tamek Kan Portakal Nektarı) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan meyvesularında askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Juss Portakal Nektarı için Çizelge 6.7, Juss Karışık Meyve Nektarı için Çizelge 6.8, Tamek Kan Portakal Nektarı için ise Çizelge 6.9 da verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 36 Juss Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



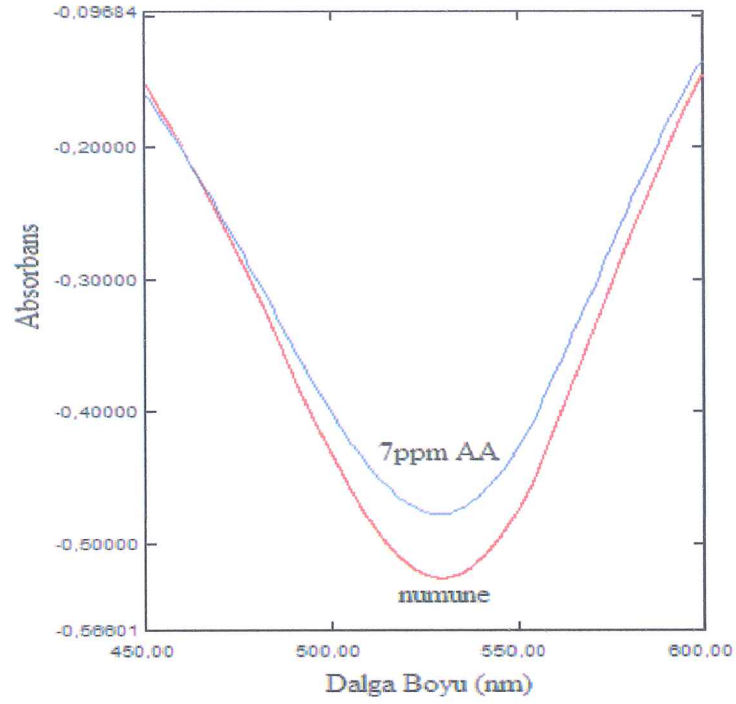
Şekil 6. 37 Juss Karışık Meyve Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



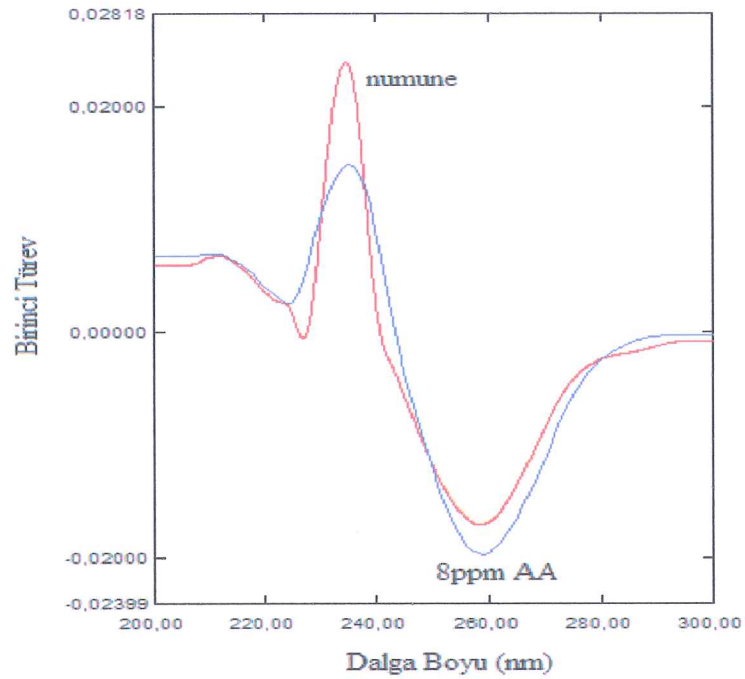
Şekil 6. 38 Tamek Kan Portakal Nektarı ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.4 Gazlı İçeceklerde (Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları Sırma C Plus Mandalina için Şekil 6.39, Sırma C Plus Limon için Şekil 6.40 da görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu gazlı içeceklerde (Sırma C Plus Mandalina ve Sırma C Plus Limon) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan gazlı içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Sırma C Plus Mandalina için Çizelge 6.10, Sırma C Plus Limon için Çizelge 6.11 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



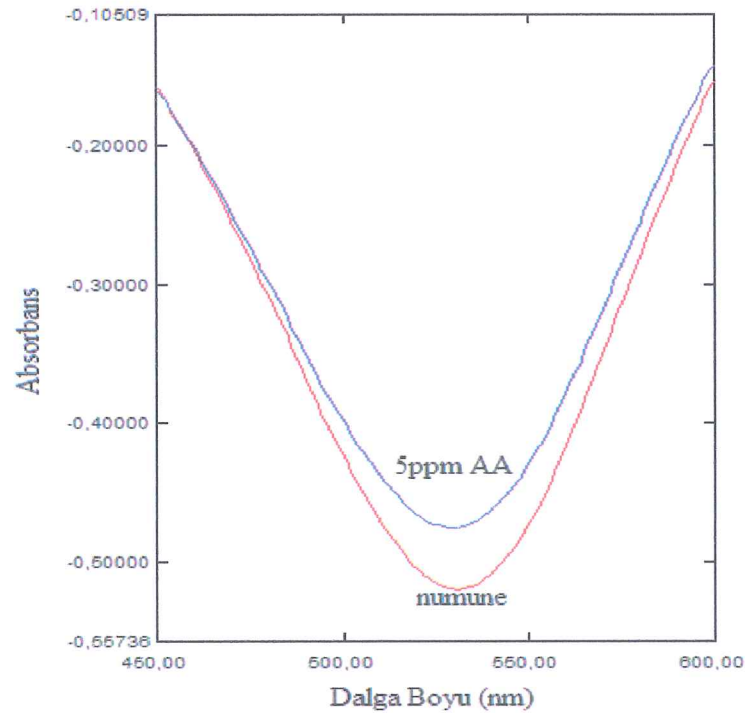
Şekil 6. 39 Sırma C Plus Mandalina ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



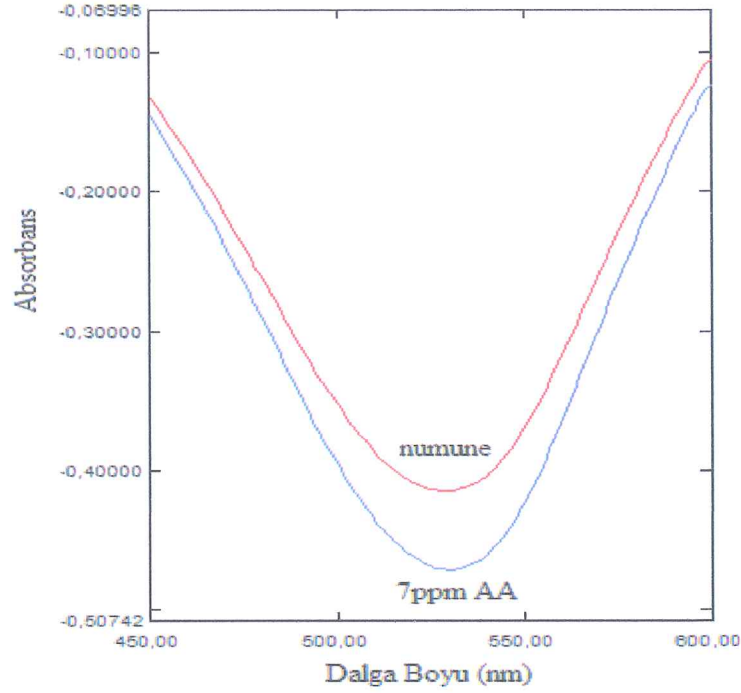
Şekil 6. 40 Sırma C Plus Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.5 Toz İçeceklerde (Tang Vişne ve Tang Limon) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları Tang Vişne için Şekil 6.41, Tang Limon için Şekil 6.42 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu toz içeceklerde (Tang Vişne ve Tang Limon) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan toz içeceklerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Tang Vişne için Çizelge 6.12, Tang Limon için Çizelge 6.13 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



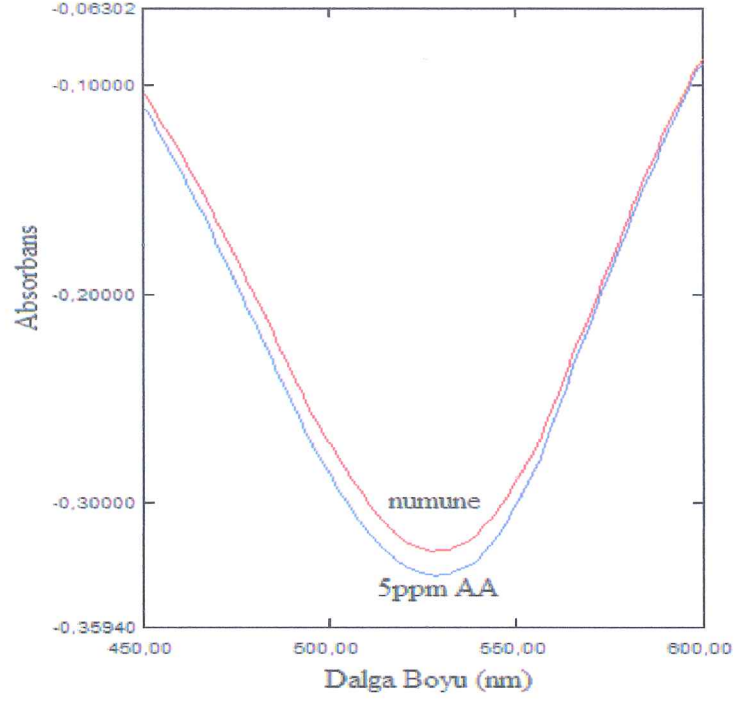
Şekil 6. 41 Tang Vişne ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



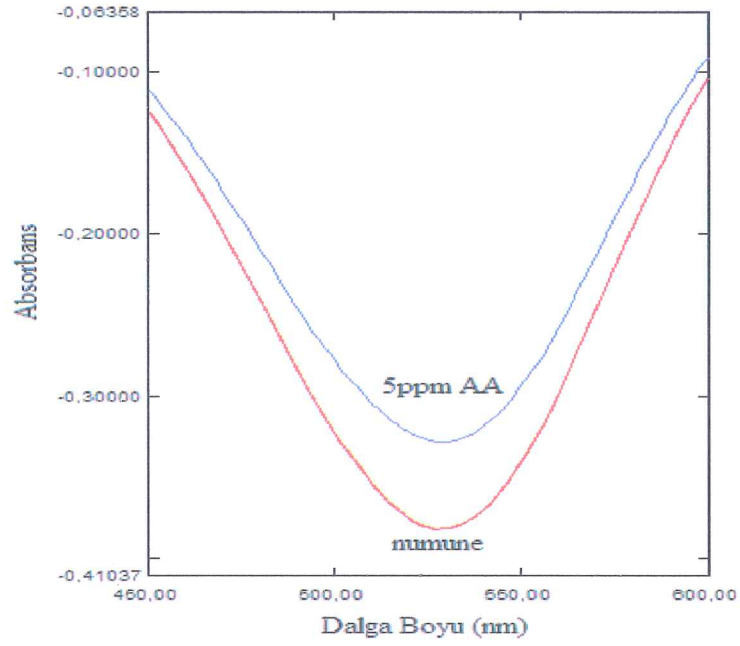
Şekil 6. 42 Tang Limon ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.6 Farmasötik Numunelerde (Redoxor Çiğneme Tableti ve Aspirin Plus C) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları Redoxor Çiğneme Tableti için Şekil 6.43, Aspirin Plus C için Şekil 6.44 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu farmasötik numunelerde (Redoxor Çiğneme Tableti ve Aspirin Plus C) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan farmasötik numunelerde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonuçları Redoxor Çiğneme Tableti için Çizelge 6.14, Aspirin Plus C için Çizelge 6.15 de verilmiştir. Üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (\bar{X}_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($\bar{X}_{ort} \pm t \cdot s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



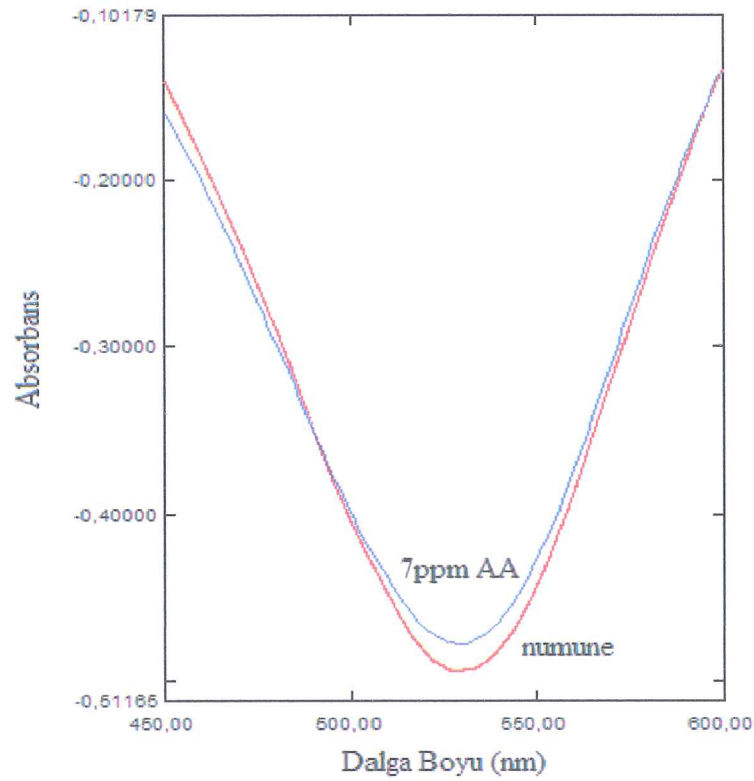
Şekil 6. 43 Redoxor Çiğneme Tablet ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 6. 44 Aspirin Plus C ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.7 Bebek Mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) Askorbik Asit Tayini

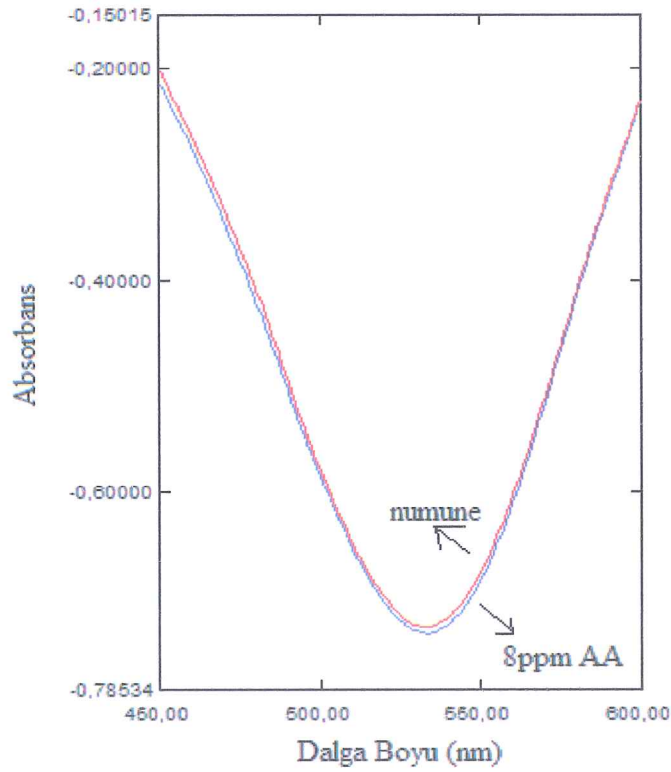
Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları Bebelac Elma Armut Püresi için Şekil 6.45 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu bebek mamasında (Bebelac Elma Armut Püresi) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan bebek mamasında askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.16 da verilmiştir. Aynı çizelgede üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 45 Bebelac Elma Armut Püresi ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.3.8 Şekerde (Kent Olips Limon&Portakal) Askorbik Asit Tayini

Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen absorpsiyon ve standart askorbik asit absorpsiyon spektrumları Kent Olips Limon&Portakal için Şekil 6.46 de görülmektedir. Bu spektrumların karşılaştırılması sonucu şekerde (Kent Olips Limon&Portakal) askorbik asit tayini için absorpsiyon spektrumunda 531 nm'deki minimuma ait absorbans değerlerinden yararlanıldı. Çalışılan şeker numunesinde askorbik asit tayini için 3 paralel tayin yapıldı ve Çizelge 6.3 de belirtilen ölçü eğri denkleminde yararlanılarak hesaplama yapıldı. Analiz sonucu Çizelge 6.17 de verilmiştir. Aynı çizelgede üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}), standart sapma (S), bağıl standart sapma (%S) ve %95 güven aralığı ($X_{ort} \pm t.s/n^{1/2}$) değerleri verilmiştir.



Şekil 6. 46 Kent Olips Limon&Portakal ekstresinin ve standart askorbik asit çözeltisinin absorpsiyon spektrumları

6.4 Askorbik Asit Analizi İçin Numunelere Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

6.4.1 Meyve ve Sebze Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

Kırmızı biber, çilek ve kızılıcak örneklerinde türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Kırmızı biber, çilek ve kızılıcak örneklerinin analizi sonunda elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 6.4, çizelge 6.5 ve çizelge 6.6 da toplu halde verilmiştir. Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. (Çizelge 6.4) Kırmızı biberde askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için ise t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür.

Çizelge 6.4 Kırmızı biberde askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Analiz	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.
Tarihi	(mg/100 g) ^a	n	Yöntem		Yöntem
Kırmızı biber 03.08.2011	93mg/100g	1	91,8	96	95,2
		2	91,4	93,2	94,6
		3	90,6	88,4	94
		X _{ort}	91,3	92,5	94,6
		S	0,61	3,84	0,60
		%S	0,66	4,15	0,63
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	91,26±0,7	92,53±4,3	94,6±0,6
		t testi	6,76	0,92	
		F testi	1,03	40,96	
			n₁=n₂ =3	P= 0,05	t_{tablo} = 2,92

a: Verilen rakam çeşitli türlerin ortalamasıdır.

(Çizelge 6.5) Çilekdede askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için ise t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyük. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.5 Çilekte askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Analiz Tarihi	Asit İçeriği (mg/100 g) ^a	Parametreler n	Spektrofotometrik Yöntem	Yöntemi	Spek.Yöntem
Çilek 17.08.2011	70mg/100g	1	36,72	39,11	36,72
		2	37,70	38,44	36,11
		3	38,30	38,11	35,55
		X _{ort}	37,57	38,55	36,12
		S	0,79	0,50	0,58
		%S	2,1	1,3	1,6
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	37,57±0,9	38,55±0,6	36,12±0,6
		t testi	2,56	5,49	
		F testi	1,85	1,34	
			n ₁ =n ₂ =3	P= 0,05	t _{tablo} = 2,92

a: Verilen rakam çeşitli türlerin ortalamasıdır.

(Çizelge 6.6) Kızılıcıkda askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t ve F değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. Fark yöntemi için ise t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.6 Kızılıcıkda askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Analiz	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.Yöntem
Tarihi	(mg/100 g) ^a	n	Yöntem		
Kızılıcık 03.08.2011	55mg/100g	1	78,24	56,28	93,96
		2	78,74	54,53	89,22
		3	77,87	53,66	87,10
		X _{ort}	78,28	54,82	90,09
		S	0,43	1,33	3,51
		%S	0,55	2,42	3,90
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	78,28±1,7	54,82±1,5	90,09±3,9
		t testi	5,78	16,27	
		F testi	66,3	6,96	
n₁=n₂ =3		P= 0,05	t_{tablo}= 2,92	F_{tablo}= 19	

a: Verilen rakam çeşitli türlerin ortalamasıdır.

6.4.2 Meyvesuyu Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı, Tamek Kan Portakal Nektarı örneklerinde türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Juss Portakal Nektarı, Juss Karışık Meyve Nektarı, Tamek Kan Portakal Nektarı örneklerinin analizi sonunda elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 6.7, çizelge 6.8 ve çizelge 6.9 da toplu halde verilmiştir. Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı.

(Çizelge 6.7) Juss Portakal Nektarında askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için ise hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.7 Juss Portakal Nektarında askorbik asit tayini

Numune	Üretim tarihi	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Son Kullanma Tarihi	Analiz Tarihi	Asit İçeriği (mg/100 mL) ^a	Parametreler n	Spektrofotometrik Yöntem	Yöntemi	Spek. Yöntemi
Juss Portakal Nektarı	11.11.2010 11.11.2011 05.08.2011	21mg/100mL	1	13,85	17,75	17,55
			2	13,75	17,55	17,20
			3	13,67	17,50	17,05
			X _{ort}	13,76	17,60	17,26
			S	0,09	0,13	0,25
			%S	0,65	0,75	1,48
			X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	13,76±0,1	17,60±0,2	17,26±0,3
			t testi	22,36	2,04	
			F testi	8,09	3,76	
		n₁=n₂ =3	P= 0,05	t_{tablo} = 2,92	F_{tablo} = 19	

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

(Çizelge 6.8) Juss Karışık Meyve Nektarında askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.8 Juss Karışık Meyve Nektarında askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.
Son Kullanma Tarihi	(mg/100 mL) ^a	n	Yöntem		Yöntem
Analiz Tarihi					
Juss Karışık Meyve Nektarı	21 mg/100mL	1	20,16	24,82	23,82
		2	19,96	24,66	23,60
		3	19,86	24,60	23,32
		X_{ort}	19,99	24,70	23,58
		S	0,15	0,11	0,25
		%S	0,76	0,45	1,06
		$X_{ort} \pm t \cdot S/n^{1/2}$	19,99±0,2	24,70±0,1	23,58±0,3
02.02.2011		t testi	21,55	7,07	
02.02.2012		F testi	2,70	4,90	
10.08.2011					
	$n_1=n_2=3$	$P=0,05$	$t_{tablo}=2,92$	$F_{tablo}=19$	

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

(Çizelge 6.9) Tamek Kan Portakal Nektarında askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür.

Çizelge 6.9 Tamek Kan Portakal Nektarında askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.
Son	(mg/100 mL) ^a	n	Yöntem		Yöntem
Kullanma Tarihi					
Analiz Tarihi					
Tamek Kan Portakal Nektarı	21 mg/100mL	1	9,6	10,2	9,4
		2	9,5	9,5	9,3
		3	9,4	9,5	9,3
		X _{ort}	9,5	9,9	9,3
		S	0,085	0,4	0,05
		%S	0,9	4,0	0,5
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	9,5±0,1	9,9±0,4	9,3±0,1
02.02.2011		t testi	1,93	2,27	
02.02.2012		F testi	2,90	64	
10.08.2011					
	n₁=n₂ =3	P= 0,05	t_{tablo} = 2,92	F_{tablo} = 19	

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

6.4.3 Gazlı İçecek Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştıırılması

Sırma C Plus Mandalına, Sırma C Plus Limon örneklerinde türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Sırma C Plus Mandalına, Sırma C Plus Limon rneklerinin analizi sonunda elde edilen sonuçlar sırasıyla izelge 6.10, izelge 6.11 de toplu halde verilmiştir. Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştıırıldı.

(Çizelge 6.10) Sırma C Plus Mandalinada askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.10 Sırma C Plus Mandalinada askorbik asit tayini

Numune					
Üretim tarihi	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Son Kullanma Tarihi	Asit İçeriği (mg/100 mL) ^a	Parametreler	Spektrofotometrik Yöntem	Yöntemi	Spek. Yöntem
Analiz Tarihi		n			
Sırma C Plus Mandalina 08.12.2010 08.12.2011 15.09.2011	60 mg/100mL	1	60,9	75	66,5
		2	61,0	77	63,3
		3	60,0	73	62,7
		X _{ort}	60,6	75,0	64,2
		S	0,55	2	2,04
		%S	0,9	2,6	3,18
		X _{ort±t.S/n^{1/2}}	60,6±0,6	75,0±2,3	64,2±2,3
		t testi	2,89	6,57	
		F testi	13,75	1,04	
			n₁=n₂ =3	P= 0,05	t_{tablo} = 2,92

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

(Çizelge 6.11) Sırma C Plus Limonda askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.11 Sırma C Plus Limonda askorbik asit tayini

Numune	Üretim tarihi	Askorbik Asit İçeriği (mg/100 mL) ^a	İstatistik Parametreler n	Türev Spektrofotometrik Yöntem	Fark Yöntemi	Modifiye Spek. Yöntem
Sırma C Plus Limon	08.12.2010	60mg/100mL	1	71,3	73,4	62,7
	08.12.2011		2	71,0	71,9	66,5
	15.09.2011		3	68,7	72,0	63,3
			X_{ort}	70,3	72,4	64,2
			S	1,42	0,81	2,04
			%S	2	1,12	3,18
			$X_{ort} \pm t.S/n^{1/2}$	70,3±1,6	72,4±0,9	54,2±2,3
			t testi	4,29	6,51	
			F testi	2,06	6,34	
			$n_1=n_2=3$	P= 0,05	$t_{tablo}= 2,92$	$F_{tablo}= 19$

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

6.4.4 Toz İçecek Numunelerine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştıırılması

Tang Vişne, Tang Limon örneklerinde türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve modifiye spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Tang Vişne, Tang Limon rneklerinin analizi sonunda elde edilen sonuçlar sırasıyla izelge 6.12, izelge 6.13 de toplu halde verilmiştir. Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştıırıldı.

(Çizelge 6.12) Tang Vişnede askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.12 Tang Vişnede askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.Yöntem
Son Kullanma Tarihi	(mg/100g) ^a	n	Yöntem		
Analiz Tarihi					
Tang Vişne	550 mg/100g	1	650	487	503
		2	646	478	499
		3	626	471	497
		X_{ort}	641	478	500
		S	12,85	8,02	3,05
		%S	2	1,67	0,61
		$X_{ort} \pm t.S/n^{1/2}$	641±14,5	478±9,1	500±3,4
		t testi	18,49	4,23	
F testi	17,75	6,91			
$n_1=n_2=3$		P= 0,05	$t_{tablo}= 2,92$	$F_{tablo}=19$	

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

(Çizelge 6.13) Tang Limonda askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.13 Tang Limonda askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.
Son Kullanma Tarihi	(mg/100g) ^a	n	Yöntem		Yöntem
Analiz Tarihi					
Tang Limon	550 mg/100g	1	574	535	605
		2	563	530	598
		3	560	483	572
		X _{ort}	566	516	591
		S	7,37	28,68	17,38
		%S	1,3	5,5	2,93
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	566±1,6	516±0,9	591±2,3
		t testi	2,37	3,90	
F testi	5,56	2,72			
n₁=n₂=3		P= 0,05	t_{tablo}= 2,92	F_{tablo}= 19	

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

6.4.5 Farmasötik Numunelere Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

Redoxor Çiğneme Tablet ve Aspirin Plus C örneklerinde türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve Spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Redoxor Çiğneme Tablet ve Aspirin Plus C örneklerinin analizi sonunda elde edilen sonuçlar sırasıyla Çizelge 6.14, çizelge 6.15 de toplu halde verilmiştir. Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı.

(Çizelge 6.14) Redoxor Çiğneme Tabletde askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntemi için t değerleri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.14 Redoxor Çiğneme Tabletde askorbik asit tayini

Numune Son Kullanma Tarihi Analiz Tarihi	İstatistik Parametreler n	Türev Spektrofotometrik Yöntem		Fark Yöntemi		Modifiye Spek. Yöntem	
		n	mg/table	%	mg/table	%	mg/table
Redoxor Çiğneme Tablet^(a) 12.2010 12.2012 09.09.2011	1	536,0	107,2	538,15	107,6	595,72	119,14
	2	528,75	105,7	525,25	105,0	595,72	119,14
	3	514,0	102,8	517,0	103,4	568,7	113,74
	X _{ort}	526,25	105,3	526,80	105,4	586,71	117,34
	S		11,21		10,65		15,6
	%S		2,13		2,02		2,65
	X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}		526,25±12,7		526,80±12,1		586,71±17,6
	t testi		5,45		5,49		
	F testi		1,93		2,14		
		n₁=n₂ =3	P= 0,05		t_{tablo} = 2,92		F_{tablo} = 19

a: Herbir tablet 500mg C Vitamini içermektedir.

(Çizelge 6.15) Aspirin Plus C de askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem için t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Fark yöntemi için ise t değeri ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri ise ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür.

Çizelge 6.15 Aspirin Plus C de askorbik asit tayini

Numune Üretim Tarihi Son Kullanma Tarihi Analiz Tarihi	İstatistik Parametreler n	Türev		Fark		Modifiye	
		Spektrofotometrik Yöntem	%	Yöntemi	%	Spektrofotometrik Yöntem	%
Aspirin Plus C ^(a) - 10.2013 16.09.201	n	mg/tablett	%	mg/tablet	%	mg/tablet	%
	1	239,2	99,60	214,67	89,	228,23	95,0
	2	236,0	98,33	214,28	89,	225,13	93,8
	3	234,0	97,50	214,28	89,	224,75	93,6
	X _{ort}	236,4	98,47	214,4	89,	226,0	94,17
	S	2,6		0,22		1,90	
	%S	1,10		0,10		0,84	
	X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	236,4±2,3		214,4±0,3		226,0±2,1	
	t testi	5,54		10,52			
	F testi	1,90		74,58			
n₁=n₂=3		P= 0,05		t_{tablo}= 2,92		F_{tablo}= 19	

a: Herbir tablet 240mg C Vitamini içermektedir.

6.4.6 Bebek Maması Numunesine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

Bebelac Elma Armut Püresi örneğine türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve Spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi yapıldı. Bebelac Elma Armut Püresi örneğine analizi sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 6.16 da toplu halde verilmiştir. (Çizelge 6.16) Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Bebelac Elma Armut Püresi de askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntem için hesaplanan t ve F değerleri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür. Buna göre örneğinin analizinde geliştirilen yöntemler arasında gerek doğruluk gerek presizyon yönünden anlamlı bir fark yoktur.

Çizelge 6. 16 Bebelec Elma Armut Püresinde askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.
Son Kullanma Tarihi	(mg/100 mL) ^a	n	Yöntem		Yöntem
Analiz Tarihi					
Bebelac Elma Armut Püresi	20mg/100g	1	36,56	39	37,25
		2	35,90	38,35	36
		3	35,35	36,1	35,2
		X _{ort}	35,93	37,81	36,15
		S	0,60	1,52	1,03
		%S	1,66	4,02	2,85
		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	35,93±0,7	37,81±1,7	36,15±1,2
		t testi	0,32	1,56	
		F testi	2,94	2,17	
			n ₁ =n ₂ =3	P= 0,05	t _{tablo} = 2,92

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

6.4.7 Şeker Numunesine Uygulanan Yöntemlerin Elde Edilen Sonuçlara Göre Karşılaştırılması

Kent Olips Limon&Portakal örneğine türev spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.1.4, fark yöntemi ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.2.3 ve Spektrofotometrik yöntem ile askorbik asit tayini Bölüm 5.3.3.3 de anlatıldığı gibi

yapıldı. Kent Olips Limon&Portakal örneğine analizi sonunda elde edilen sonuçlar Çizelge 6.15 da toplu halde verilmiştir.

(Çizelge 6.17) Askorbik asit tayini için uygulanan yöntemlerden elde edilen sonuçlar t testi ile ortalamalar, F testi ile presizyonlar yönünden %95 güven düzeyinde karşılaştırıldı. Kent Olips Limon&Portakalda askorbik asit tayininde geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntem ve fark yöntem için hesaplanan t değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden büyüktür. F değeri, ilgili güven düzeyi ve üç deneme için verilen tablo değerlerinden küçüktür.

Çizelge 6.17 Kent Olips Limon&Portakalda askorbik asit tayini

Numune	Askorbik	İstatistik	Türev	Fark	Modifiye	
Üretim tarihi	Asit İçeriği	Parametreler	Spektrofotometrik	Yöntemi	Spek.	
Son Kullanma Tarihi	(mg/100 mL) ^a	n	Yöntem		Yöntemi	
Analiz Tarihi						
Kent Olips Limon&Portakal		1	290	319	342	
		2	290	320	342,5	
		3	292	323	344	
		X _{ort}	291	321	343	
	-	250mg/100g	S	1,15	2,08	1,04
	12.2011		%S	0,4	0,64	0,3
	26.07.2011		X _{ort} ±t.S/n ^{1/2}	291±1,3	321±2,4	343±1,2
			t testi	58,20	16,53	
			F testi	1,23	4	
	n ₁ =n ₂ =3	P= 0,05	t _{tablo} = 2,92	F _{tablo} = 19		

a: Verilen rakam numune üzerinde yazan değerdir.

6.5 Validasyon Çalışmaları

Türev spektrofotometrik yöntemle ait Bölüm 5.3.1.4 (a) da , fark spektrofotometrik yöntemle ait Bölüm 5.3.2.4 (a) da anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen çalışma sonuçları ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma olarak hesaplanan sonuçlar Çizelge 6.18 de verilmiştir.

Çizelge 6.18 Validasyon çalışması

C (mg.L ⁻¹)	Güniçi ^(a)	Günaşırı ^(a)
Türev Spektrofotometrik Yöntem	Vitamin C (¹ D ₂₅₈)	Vitamin C (¹ D ₂₅₈)
4	4,03±0,05(2,8)	3,82±0,11(1,4)
8	8,02±0,04(1,34)	7,66±0,03(0,6)
Fark Spektrofotometrik Yöntem	Vitamin C (D ₂₆₉)	Vitamin C (D ₂₆₉)
4	4,27±0,014(3,1)	4,1±0,02(2,97)
8	8,16±0,035(2,1)	7,98±0,08(1,98)

a: ölçülen konsantrasyon±SD(RSD%), her bir konsantrasyon için ölçümler 5 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge(6.18) Türev spektrofotometrik yöntemle ait Bölüm 5.3.1.4 (b) de, fark spektrofotometrik yöntemle ait Bölüm 5.3.2.4 (b) de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen çalışma sonuçlarından elde edilen standart sapma hesaplandı. LOD değeri için standart sapmanın üç katı, LOQ değeri için standart sapmanın on katı alındı. Türev spektrofotometrik yöntem için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla $9 \cdot 10^{-4}$ ve $3 \cdot 10^{-3}$, fark spektrofotometrik yöntem için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,014 ve 0,046 bulunmuştur.

BÖLÜM 7

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma askorbik asit içeren örneklerde askorbik asit tayini için geliştirilmiş üç kantitatif yöntem önermektedir. Meyve ve sebzelerin askorbik asit analizlerinde en önemli basamak uygun örnek ekstresinin hazırlanmasıdır. Meyve ve sebzelerden askorbik asidin kantitatif ekstraksiyonu için hava oksijeni, enzim ve diğer oksitleyiciler (Fe,Cu... gibi diğer metal iyonları) tarafından oksitlenmesinin önlenmesi, ölçme kademesi için uygun asitliğin sağlanması ve yüksek pH 'daki bozunmasının önlenmesi amacıyla çeşitli asitler ve asit karışımları kullanılmıştır. Bunlar arasında metafosforik asit, asetik asit, trikloroasetik asit, okzalik asit, sitrik asit, asetik asit-metafosforik asit çözeltileri en çok kullanılanlardır. Çalışmalarımızda ekstraksiyon çözeltisi olarak literatürde [89,111,119] bildirilen çözeltiler arasında metafosforik asit- asetik asit (%3-8) çözeltisi ile elde edilen meyve ve sebze ekstralarının spektrumlarının saf askorbik asidinkine en yakın olması nedeniyle bu karışım uygun ekstraksiyon çözeltisi olarak seçilmiştir. Bu çözeltinin diğer çözeltilere bir üstünlüğü iyi bir protein çöktürücüsü olması ve bu nedenle berrak çözeltilerin elde edilmesi ve ayrıca metafosforik asit uygun asitliği sağladığından askorbik asidin oksidatif bozunma hızını da azaltmaktadır. Numuneden askorbik asidin optimum karıştırma süresi ile alınması askorbik asidin ekstraksiyonu için diğer bir önemli unsurdur. Optimum karıştırma süresi sert ve yumuşak dokulu (meyve, sebze, bon bon şeker, bebek maması) örnekler için farklılık göstermektedir. Çalışılan numuneler (meyve ve sebze, bon bon şeker ve bebek maması) den askorbik asidin ekstraksiyonu için uygun ekstraksiyon çözeltisi ve optimum karıştırma süresi önemli iki unsuru oluşturmaktadır.

Çalışmalarımızda türev spektrofotometrik yöntemin uygulanmasıyla bu ortamda ayırma ve zemin düzeltme işlemlerine gerek kalmamıştır.

Askorbik asit tayini için geliştirilen bir diğer yöntem fark spektrofotometrik yöntemdir. Bu yöntemin daha çok ikili ve üçlü etken madde karışımlarında, matriks etkisinin çok olduğu tek etken maddeli örneklere uygulanılan çalışmalar da rastlanılmıştır. Vitamin C tayini için yapılan literatür çalışmalarında bu konuda yapılmış bir çalışmaya rastlanıldı [25]. Bu çalışmada geliştirilen yöntem portakal ve domates suyuna uygulanmış, çalışmada askorbik asit askorbik asit oksidaz enzimiyle dehidroksiaskorbik aside dönüştürülmüş ve total askorbik asit tayini yapılmıştır. Fark spektroskopik yöntemin askorbik asit analizi için geliştirilmesinde, numune çözeltisinden belirli hacimde iki seri alınması ve 1. seri pH2 diğer serinin pH5 tampon çözeltileri ile hacmine tamamlanması ile çözeltilerde renk farkı oluşmakta, bu da spektrofotometrik analizde fark absorbans değerini absorbans değerine ulaşmamızı sağladı.

Modifiye spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesinde, askorbik asit tayini için standart yöntem olan 2-6 DCIP titrasyon yöntemi temel alınmıştır. Açık renkli örneklere titrasyon yöntemi kolaylıkla uygulanabilirken, koyu renkli ekstrak veren örneklerde askorbik asit miktar tayini yapılacağı zaman titrant 2-6 DCIP ile askorbik asidin doğrudan gözleme dayalı titrasyonun uygulanabilir olmaması modifiye spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesinde etkili olmuştur. Çünkü titrasyon yöntemi ile askorbik asit tayininde, bazik ortamda mavi renkli olan titrantın (2,6-DCIP) askorbik asit ile reaksiyonunda rengin gitmekte ve daha fazla ilavesiyle ortam asidik olduğu için pembe renk oluşmakta ve titrasyonun sonlanma noktasındaki pembe renk ekstraksiyonun rengi tarafından maskelenmektedir. Modifiye spektrofotometrik yöntem ile renkli numunelerde askorbik asit tayininde titrant miktarının hacmi Bölüm 5.3.3.2 de anlatıldığı gibi belirlendi. Renkli örneklerde titrasyon yönteminin uygulanması konusundaki literatür çalışmaları ile ulaşılan bilgilere göre bazik ortamda mavi renkli olan titrantın (2,6-DCIP) askorbik asit ile reaksiyonunda rengin gittiği ve daha fazla ilavesiyle ortam asidik olduğu için oluşan pembe rengin ksilen veya butanol fazına [21] eter fazına [22] veya kloroform fazına [23] çekilebileceği titrasyonun bu şekilde sonlandırılabilceği veya organik fazla çekilen pembe rengin spektrofotometrik olarak

ölçülerek askorbik asid tayininin mümkün olabileceği belirtilmekteydi [22]. Türk standardında ise renkli numunelerde vitamin C ksilen [23] ile ekstraksiyon işleminden sonra absorbans değerinin ölçülmesi ile tayin edimiştir. Ağır solventler ile ekstraksiyonda, emülsiyon oluşumu yüzünden pembe rengin organik faza çekilmesi uzunca bir işlem oluşturmakta iken hafif solventler, özellikle etil eter bu dezavantaja sahip değildir. Bu nedenle etil eter titrasyon sonlanmasını gösteren pembe rengin organik faza çekilmesi için en uygun organik çözücü olarak belirlendi ve modifiye spektroskopik yöntemin geliştirilmesinde titrasyonun sonlandığını belirten pembe renk ayrı bir faz oluşturmak için etil eterle ekstrakte edildi. Böylece numune ekstratının koyu rengi tarafından maskelenen titrasyonun sonlanma noktasını belirlenememesi söz konusu değildir. Geliştirilen modifiye spektrofotometrik yöntemim renkli numunelere uygulanabilir olduğunun gösterilmesi için Bölüm 5.2 de anlatıldığı gibi hazırlanan numune çözeltilerinden alınan belirli miktarda numune örneğinin son hacmine tamamlanmasında numune ekstratının rengini değiştirmeyecek pH4 tampon çözeltisi kullanıldı. Böylece numune ekstratının kendine özgü rengi korunarak askorbik asit tayini yapılmasına olanak sağlandı. Antosiyaninler düşük pH değerlerinde mor-kırmızı, daha yüksek ise yeşil-mazi bir renk alır. Antosiyaninler asit ortamda açık kırmızı, nötr ortamda mor, alkali ortamda mavi-yeşil-menekşe, yüksek alkali ortamda mavi renk alır [21]. Tampon çözelti seçimi esnasında birçok antosiyanin rengi pH derecesine göre değişmesi ve pH yükseldikçe rengin zayıflaması göz önüne alındı.

Asorbik asit tayini için yapılan deneysel çalışmada geliştirilen yöntemlerden türev spektrofotometrik yöntemde, kimyasal ayırım yapılmaksızın iki veya daha fazla bileşen içeren numunelerin simultane analizinde normal spektrofotometrik yöntemden daha çok hassasiyet sağlamaktadır. Numunenin yapısından kaynaklanan girişimler türev spektrofotometrik yöntem ile elimine edilmektedir. Fark yöntem, karışımlarda yer alan çeşitli maddeleri kantitatif olarak analiz etmeyi ya da çevre koşulları nedeniyle küçük değişimlere rağmen hassas bir ölçüm sağlar. Fark yöntemi ile spektrofotometrik analizlerin doğruluğu ve seçiciliği belirgin bir biçimde geliştirilmiştir. Fark yöntemin esas önemli özelliği eşit kütlelere sahip çözeltilerin farklı formlarını elde etmektir. Fark yöntemin temelini çoklu karışımların analizinde yarar sağlayan pH değişimleri oluşturur. Asidik ortamdaki askorbik asit çözeltisi referans hücreesine, aynı konsantrasyondaki alkali çözeltisi örnek hücreesine konulduğu deneme uygun çalışma

düzeni olarak bulundu. Böylece askorbik asit çözeltisinin pH'ı değiştirilerek absorpsiyon spektrumunda girişimlere neden olabilecek bozunma ürünleri ve bileşenlerin elimine edilmesi sağlandı. Modifiye spektrofotometrik yöntem, askorbik asidin tayini için kullanılan 2-6 DCIP titrasyon yöntemi temel alınarak geliştirildi. Titrasyon yöntemi ile yalnızca L-askorbik asit (Vitamin C) tayin edilmektedir. Titrasyon yönteminin modifiye edilmesi özellikle renkli örneklerde askorbik asit tayini için önem kazanmaktadır. Askorbik asit tayini için standart yöntem olarak kullanılan titrasyon yönteminden geliştirilmesi nedeni ile diğer geliştirdiğimiz yöntemler modifiye spektrofotometrik yöntem ile kıyaslandı.

Bölüm 6. 4 de askorbik asit analizi için numunelere uygulanan yöntemlerde elde edilen sonuçlar belirtildi. Geliştirilen yöntemlerde numunede askorbik asit miktarı üç adet tayin üzerinden hesaplanan ortalama (X_{ort}) lar, standart sapma (S) lar kapsamında değerlendirildi. Deneysel çalışmada kullanılan çoğu örnekte geliştirilen üç yöntemin uygulanmasıyla hesaplanan askorbik asit miktarı ortalamaları çok fazla farklılık göstermemiştir. Standart sapma değerleri kıyaslandığında geliştirilen yöntemlerin askorbik asit tayini için kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Tekman, Ş ve Öner, N., (1994). Genel Biyokimya, İstanbul, 314-315,165-166,193-197.
- [2] Lenghor, N., J. Jakmunee, Vilen M., Sara R., Christian G.D. and Grudpan, K., (2002). "Sequential Injection Redox or Acid-Base Titration for Determination of Ascorbic Acid or Acetic Acid", Talanta. 58: 1139.
- [3] Rajantie, Strutwolf, H. J. and Williams, D. E., J. (2001). "Theory and practice of electrochemical titrations with dual microband electrodes", Electroanalysis Chemical. 500: 108-120.
- [4] Shekhovtsova, T.N., Muginova, S.V., Luchinina, J.A. and Galimova, A.Z., (2006). "Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables", Anal. Chim. Acta, 125:573-574,
- [5] Fontannaz, P., Kilinc, T. And Heudi, O., (2006). "Analytical, Nutritional and Clinical Methods HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products", Food Chemistry. 94: 626-631
- [6] Gazdik, Z., Zitka, (2008). Petrlova, J., Adam, V., Zehnalek, J., Horna, A., Reznicek, V., Beklova, M. and Kizek, R., "Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical", Sensors. 8:7097-7112.
- [7] Zeng, W., Martnuzzi and MacGregor, F. A., (2005). "Development and application of a novel UV method for the analysis of ascorbic acid", J. Pharm. and Biomed. Anal. 36: 1107
- [8] Serrano, I.O., Jover, T.H. and Belloso, O.M., (2007). "Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits", Food Chemistry,.105:1151

- [9] Medina, A.R., Córdova, M.L.F. and Díaz, A.M., (1999). "Determination of Ascorbic Acid in Tablet Dosage Forms and Some Fruit Juices by DPV", *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 247
- [10] Cantu, R., Evans O., Kawahara, F. K. and Shoemaker, J. Dufour, (2000). "An HPLC method with UV detection, pH control, and reductive ascorbic acid for cyanuric acid analysis in water", *Anal. Chem.* 23:5320-5328.
- [11] Revanasiddappa, H. D. and Veena, M. A., (January 2008). "Sensitive Spectrophotometric Methods for the Determination of Ascorbic Acid", *CODEN ECJHAO E-Journal of Chemistry.* 5:10-15.
- [12] Fujita, Y., Mori, I., Yamaguchi, Hoshino, M., Shigemura, Y. and Shimano, M., (2001). "Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid with Iron(III) and p-Carboxyphenylfluorone in a Cationic Surfactant Micellar Medium", *Anal. Sci.* 7:853-857.
- [13] Karasakal, A., (Ocak 2011). Kuşburnu Bitkisinde Spektrofotometrik Yöntemle Askorbik Asit Tayini, İstanbul Teknik Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi
- [14] Mirsad, S., Amra, S. and Husejin, K., (2011). "Spectrophotometric Determination of L-ascorbic Acid in Pharmaceutical Preparations using Glycine as a Stabilizer", *European Journal of Scientific Research.* 53:193-198
- [15] Grahovac, M., Sneana, S., Todor, M., Pecev, G., Emilija Pecev, T., and Pavlovi, A.N., (2008) "Kinetic Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid in Pharmaceutical Samples by Oxidation of Ponceau 4R by Hydrogen Peroxide", *Journal of the Chinese Chemical Society.*, 55:137-142
- [16] Shrivastava, K., Agrawala, K. and Kumar, D., "A Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid", *International Journal of Food Science and Technology.* (2007). 42:1402–1407
- [17] Arya, S.P., Mahajan, M. and Jain, P., (2000). "The Voltammetric and Titrimetric Determination of Ascorbic Acid Levels in Tropical Fruit Samples", *Analytical Chemical Acta.* 417: 1
- [18] Tetsuharu, I., Shuuji, H., Masatoshi, Y., Masaru, N. and Yosuke, O., (1985). "Determination of total ascorbic acid in human serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *Chem. & Pharm. Bull.* 33:3499
- [19] Spickenreither, M., Braun, S., Bernhardt, G., Dove, S. and Buschauer, A., (2006). "Novel 6-O-acylated vitamin C derivatives as hyaluronidase inhibitors with selectivity for bacterial lyases". *Bioorg. & Medicin. Chem.Lett.* 16:5313
- [20] Amini, M.K., Shahrokhian, S., Tangestaninejad, S. and Mirkhani, V., (2001). "Iron(II) Phthalocyanine Modified Carbon-Paste Electrode for Potentiometric Detection Of Ascorbic Acid", *Analytical Biochemistry.* 290:277

- [21] Nadkarni, B.Y., "Determination of Ascorbic Acid in Coloured Extracts: A New Modification of the Indophenol Technique", (1964). *Microchim. Acta*, 21-27
- [22] Türk Standartı 6397, (Ocak1989). 1-6
- [23] Fujita, T.T., "Determination of Ascorbic Acid in Foods by the spectrophotometric Method Based on Difference Spectra", *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2947-2949
- [24] Arya S.P., Mahajan M. and Jain P., (1998). "Photometric Methods for the Determination of Vitamin C", *Anal. Sciences*. 14:889-895
- [25] MEGEB (Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi), (2006). "Gıda Teknolojisi Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri" S:8
- [26] Cemeroğlu, B., " Meyve ve Sebze İşleme Endüstrisinde Temel Analiz Metotları", (1992). Biltav Yayınları, Ankara,
- [27] Gilman ,A.G.,Theodore, W., Rall, A.N. and Palmer, T., (1991). *The Pharmacological Basic of Therapeutics*, s.1547-1549
- [28] Vitaminler, <http://www.belgeler.com/blg/4r3/vitamin>, 15 Mart 2012.
- [29] Çelik, C., (Mart 2005). "Sağlıklı yaşamın vazgeçilmezleri – Vitaminler", *Bilim ve Teknik Dergisi*.
- [30] Vitaminler, <http://www.fenokulu.net/portal/> 10 Şubat 2012.
- [31] Vitaminlere verilen B1, B2, B5, B9, B12 gibi adlar neye göre verilmiştir? Neden B10, B11 vitamini yoktur?, http://www.biltek.tubitak.gov.tr/merak_ettikleriniz, 15 Şubat 2012.
- [32] Selçuk, İ. Oktar, S. and Şahna, E. , (2006) " Farmakoloji AD", Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ. 2:35.
- [33] Sauberlich, H.E., (1985). " Bioavailability of vitamins", *Prog. Food Nutr. Sci.* 9:1-33.
- [34] Olson, R.E., Munson, P.L., Mueller, R.A. and Bresse, G.R., (1990) " Water soluble vitamins In:Principles of pharmacology", (Chapman and Hall, New York), Ch 59.
- [35] Özgür, M., (Ağustos 1992). Türev Spektrofotometrik Yöntem İle Askorbik Asit Tayini, Doktora tezi: 1-15,31-45
- [36] Tietz,N.W., (1986). *Textbook of Clinical Chemistry*, Third Edi.:959-984, Philadelphia.
- [37] Tannebaum, S.R., Young, V.R. and Archer, M.C., (1985). *Vitamins And Minerals In Food Chemistry*, O.R. Fennema (Edt.), New York: 478-543

- [38] Hellman, L. and Burns, J.J., (1958). "Metabolism of L-askorbic acid-1-C¹⁴ in man", *Biol. Chem.* 230: 923-930
- [39] Cemeroglu, B. and Acar, J., (1986). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 6:509*
- [40] wikipedia http://tr.wikipedia.org/wiki/C_vitamini Başlık Vitamin C
- [41] Baykut, F., "Vitamin C, L-askorbik asid", *İ.Ü. Biyomedikal Mühendislik ve Araştırma Merkezi, 1-17.*
- [42] Turan, B., (1991). *Kuşburnundan C Vitamini izolasyonu ve çekirdek yağlarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul.*
- [43] Horio F, Ozaki K, Kohmura M, Yoshida A, Makino S. and Hayashi Y., (1986). Ascorbic acid requirement for the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid, *J Nutrition.* 11: 2278-2289.
- [44] McDowell, L.R., (1989). Vitamin C. In: *Vitamins in Animal Nutrition, Academic Press, Inc, San Diego, CA.*
- [45] Jacob, R.A., (1999). Vitamin C In: Shils ME Olson JA, Shike M, Ross AC, Eds. *Modern Nutrition in Health and Diseases, 9th ed. Baltimore, Williams and Wilkins.*
- [46] Baspınar, N. and Kurtoglu, F., (2003). *Vitaminler, S.Ü. Veteriner Fak. Yayın Ünitesi, Konya*
- [47] Englard, S. and Seifter, S., (1986). "The biochemical functions of ascorbic acid", *Annu Rev Nutrition.* 6: 365-406
- [48] Johnston, C.S. and Corte, C., (1999). "Tissue carnitine fluxes in vitamin C depleted-repleted guinea pigs", *J Nutr Biochemical.* 12: 696-699
- [49] Serpek, B., Baspınar, N., Haliloglu, S. and Erdem, H., (2001). "The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol And Progesterone In Plasma And In Ovaries During The Sexual Cycle In Cattle", *Revue Med Vet.* 3: 253 – 260
- [50] Haliloglu, S., Baspınar, N., Serpek, B., Erdem, H. and Bulut, Z., (2002). "Vitamin A And BCarotene Levels In Plasma, Corpus Luteum And Follicular Fluid Of Cyclic And Pregnant Cattle", *Reprod. Dom. Anim.* 37: 96 – 99
- [51] Goetzl, E.J., Wasserman, S.I., Gigli, I. and Austen, K.F., (1974). "Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid", *J Clin Invest.* 53:813-818
- [52] Orgill, D. and Demling, R.H., (1988). "Current concepts and approaches to wound healing", *Crit Care Med,* 9: 899-908
- [53] Scholl, D. and Langkamp-Henken, B., (2001). "Nutrient recommendations for wound healing", *J Intraven Nurs.* 24:124-132
- [54] Rocha, P., Lucio, D.P. and Tde L, S., (2002). "Effects of a vitamin pool (vitamins A, E, and C) on the tissue necrosis process: experimental study on rats", *Aesthetic Plast Surg.* 26:197-202

- [55] Peterkofsky, B., (1991). "Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy", *Am J Clin Nutr.* (6 Suppl): 1135-1140
- [56] Fauci, A.S., Braunwald, E. and Isselbacher, K.J., (1998). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed, McGraw-Hill, New York.
- [57] Nicosia, R.F., Belser, P., Bonanno, E. and Diven, J., (1991). "Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism", *In Vitro Cell Dev Biol.* 12: 961-966
- [58] Waldorf, H. and Fewkes, J., (1995). "Wound Healing", *Adv Dermatol*, 10:77-96.
- [59] Barbul, A. and Purtill, W.A., (1994). "Nutrition in wound healing" *Clinics in Dermatology.*, 12:133-140.
- [60] Pugliese, P.T., (1998). "The skin's antioxidant systems", *Dermatol Nurs.* 10:401-416
- [61] MacKay, D.J. and Miller, A.L., (2003). "Nutritional support for wound healing", *Altern Med Rev.* 4:359-377
- [62] Senel, O., Cetinkale, O., Ozbay, G., Ahcioglu, F. and Bulan, R., (1997). "Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin", *Ann Plast Surg.* 39:516-523
- [63] Gupta A, Singh RL. and Raghubir R., (2002). "Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats", *Mol Cell Biochem*, 241, 1-7
- [64] Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M. and Roy S., (2002). "Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm", *Ann N Y Acad.* 957, 239-249
- [65] Thomas, L., (September 2002), " Vitamin C, Infectious Diseases, and Toxins, Xlibris Corporation (Paperback)", ISBN, 1401069630 (self-published).
- [66] Namyslowski, L., (1956:1957) " *Roczniki Panstwowego Zakladu Hig*", 1956; 7:97,-Ref., C.A., 1957; 51:4518
- [67] Counsell, J.N. and Horning, D.H., (1973). " Vitamin C", *Applied Science Publishers London and New Jersey.* 501
- [68] Cort, W.M.,(1974). "Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their modes of action", *J. Amer. Oil Chem. Soc.*,5:321, -Ref., C.A., 1974; 118673x.
- [69] Keskin, H., (1987). *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık Tic.Ltd.Şti., İstanbul,; Cilt I, 320.
- [70] Turan, B., (1991). Kuşburnundan C vitamini izolasyonu ve çekirdek yağlarının

- incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İ.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- [71] Mutlu, S., (Mayıs 2005) . Kalp hastalarında vitamin C miktarı, vitamin C'nin HDL ve LDL ile ilişkisinin incelenmesi, Bitirme tezi. 11-13.
- [72] Pauling, L., (1970). “ Vitamin C and the common cold”, Freeman, San Francisco.
- [73] Cameron, E. and Pauling, L., (1993). Cancer and Vitamin C, Camino Books Inc.
- [74] Cameron, S. and Pauling, L., (1979). “ Cancer and Vitamin C”, (W.W. Norton and Company, Inc., New York). 132.
- [75] Askorbik Asit ve Vitamin C, [http:// mevcut.neteyaz.com/ wp-content/ fotograflar/ HAMİLELİKTE C.jpg](http://mevcut.neteyaz.com/wp-content/fotograflar/HAMİLELİKTE_C.jpg), 04 Mart 2012.
- [76] Gray, S.L., Anderson, M.L., Crane, P.K., Breitner, J.C., McCormick, W., Bowen, J.D. and Larson, E., (2008 Feb). “Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer’s disease in older adults”, J. Amer. Geriart. Soc., 56(2):291-5.
- [77] Arya, S.P., Mahajan, M. and Jain P., (2000). “Non-spectrophotometric method for the determination of Vitamin C”, Anal. Chim. Acta. 417:1-14.
- [78] Pandey, N.K., (1982). “Spectrophotometric and titrimetric determinations of Ascorbic Acid”, Anal. Chem. 54: 793.
- [79] Kumar, K.G. and Indresenan, P., (1990). “Titrimetric methods for the determination of vitamin C in some pharmaceutical preparations by use of two N-bromoimides”, Talanta 37: 269.
- [80] Verma, K.K., (1982). “Determination of ascorbic acid with o-iodobenzoate analysis of mixtures of ascorbic acid with methionine and cysteine or glutathione”, Talanta. 29: 41.
- [81] Gupta D., Sharma P.D. and Gupta Y.K., (1975). “Thallic perchlorate in acid medium as a reagent for oxidimetric determination of ascorbic acid in drugs and fruit”, Talanta. 22: 913.
- [82] Rao, G.G. and Sastry, G.S., (1971). “Titrimetric determinations of ascorbic acid with cerium(IV) sulphate”, Anal. Chim. Acta. 56: 325.
- [83] Sahbaz, F. and Somer, G., (1992). “Determination of ascorbic acid in fruit and vegetables using normal polarography”, Food Chem. 44: 141.
- [84] Fung Y.S. and Mo S.Y., (1992). “Application of square-wave voltammetry for the determination of ascorbic acid in soft drinks and fruit juices using a flowinjection system”, Anal. Chim. Acta. 261: 375.

- [85] Blanco, D., Moran, M.J., Gutierrez, M.D. and Mangas, J.J., (1991). "Determination of Organic Acids in Apple and Cider by Liquid Chromatography with ordinary and narrow-bore columns", *Journal of Liquid Chromatography*. 14(14): 2707-2719.
- [86] Paim, APS., Almeida, CMNV., Reis, BF., Lapa RAS., Zagatto, EAG. and Lima, JLFC., (2002). "Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination with pharmaceutical formulation", *J. Of Pharm.and Biomed. Anal.* 28(6): 1221-1125.
- [87] Ruiz, T.P., Lozano, C.M. and Sanz, A., (1995). "Flow-injection chemiluminometric determination of ascorbic acid based on its sensitized photooxidation", *Anal. Chim. Acta.* 308: 299.
- [88] Navas, M.J. and Jimenez, A.M., (1999). "Chemiluminescent methods in alcoholic beverage analysis", *J. Agricul. Food Chem.* 47: 183-189.
- [89] Tang B., Wang Y., Du M., Ge JC. and Chen Z.Z., (2003). "Catalytic spectrophotometric determination of ascorbic acid in tea drink with 1,5 bis(phydroxybenzaldene) thiocarbohyrazone as the substrate for horseradis peroxidase ", *J. Agricul. Food Chem.* 51 (15): 4198-4201.
- [90] Yebra, M.C., Cespon, R.M. and Moreno-Cid, A., (2001). "Automatic determination of ascorbic acid by flame atomic absorption spectrometry", *Anal. Chim. Acta.* 448(1-2):157-164.
- [91] Yebra, M.C., Cespon, R.M. and Moreno-Cid, A., (2001). "Flow injection flame AAS determination of ascorbic acid based on permanganate reduction", *Atomic Spectroscopy.* 22(4): 346-349.
- [92] Norozifar, M. and Khorasani-Motlagh, M., (2003). "Aplication of potassium choramate-diphenylcarbazine in the quantitative determination of ascorbic acid by spectrophotometry", *Turk. J. Chem.* 27(6): 717-722.
- [93] Themelis, D.G. and Kika, F.S., (2001). "On-line dilution flow ijection manifold for the selective spectrophotometric determination of ascorbic acid based on the Fe(II)'yi 2,2-dipyridylhydrazone complex formation", *Talanta.* 55(1): 127-134.
- [94] Avcıoğlu, S., (1994). Çeşitli gıda maddelerinde L-askorbik asit (vitamin C) tayini, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Yüksek Lisans Tezi. 18-20.
- [95] Özgür, M.Ü. ve Sungur, S., (1995). "Third order derivative spectrophotometric determination of ascorbic acid in fruits and vegetables", *Talanta.* 42:1631.
- [96] Barrales, P. O., de Córdova, M. L. F., and Díaz, A. M., (1988). "Indirect determination of ascorbic acid by solid-phase spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta.* 360:143.

- [97] Medina, A. R., de Córdova, M.L.F. and Díaz, A.M., (1999). "A rapid and selective solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and urine", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20:247.
- [98] Aburjai, T., Amro, B.I., Aiedeh, K., Abuirjeie, M. and Al-Khalil, S., (2000). "Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrone", *Pharmazie*. 55:751.
- [99] Arya, S.P., Mahajan, M. and Jain, P., (2000). "Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complex", *Anal. Chim. Acta*. 427: 245
- [100] Pfenđt, L.B., Vukašinović, V.L., Blagojević, N.Z. and Radojević, M.P., (2003). "Second order derivative spectrophotometric method for determination of vitamin C content in fruits, vegetables and fruit juices, *Eur. Food Res. Technol.* 217:269.
- [101] Noroozifar, M. and Khorasani-Motlagh, M., (2003). "Solid-phase iodine as an oxidant in flow injection analysis: determination of ascorbic acid in pharmaceuticals and foods by background correction", *Talanta*. 61:173.
- [102] Legnerová, Z., Šatínský, D., and Solich, P., (2003). "Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis", *Anal. Chim. Acta*. 497:165.
- [103] Noroozifar, M., Khorasani-Motlagh, M. and Farahmand, A., (2004). "Automatic spectrophotometric procedure for determination of l-ascorbic acid based on reduction of iron(III)-thiocyanate complex", *Acta Chim. Slov.* 51:717.
- [104] Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. ve Apak, R., (2005). "Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceuticals", *Talanta*. 65:1226.
- [105] Wu, X., Diao, Y., Sun, C., Yang, J., Wang, Y. and Sun, S., (2003). "Fluorimetric determination of ascorbic acid with o-phenylenediamine", *Talanta*. 59:95.
- [106] Topsoy, H., (1998). "Ankara Piyasasında Satılan Bazı Şeker ve Şekerli Gıda maddelerine Katılan Gıda Boyalarının Türev Spektroskopi Yöntemi ile Kantitatif Tayini", Doktora Tezi, Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Ana Bilim Dalı, Ankara
- [107] Gündüz, T.,(1992). *İnstrümental Analiz*
- [108] Duygu, E., (1989). *Yaz Okulu Notları*
- [109] Sungur, S., (1990). *Seminer Notları*

- [110] Saraf, S., (2003). "Various UV spectrophotometric Simultaneous Estimation Method", Pharmaceutical Reviews. Vol.4 Issue 2,
- [111] Indian Pharmacopoeia, Photolithio Press, Faridabad. (1985). 45.
- [112] Sarwar, M., Iqbal, Z. and Zaidi, S., (1975). "Modified method for the estimation of ascorbic acid and squashes", Mikrochim Acta (Wien) 2:699-704.
- [113] Verma, K.K. and Gulati, A.K., (1980). "Determination of vitamin C with chloramine-T", Anal. Chem. 52:2236.
- [114] Silva, A.B., Martins Neto, J. P. and Silva, E.M., (1985). Rev. Quim. Ind. 54:11.
- [115] Verma, K. K., (1982). "Determination of ascorbic acid with *o*-iodosobenzoate", Talanta, 29:41.
- [116] Sirivastava, A. and Singh, S. K., . (1988). "Determination of vitamin C in chemical, pharmaceutical and biological samples by spectrophotometric titrimetry with *o*-diacetoxyiodobenzoate. Analysis of mixtures of vitamin C with methionine and cysteine or glutathione", Analyst, 113: 259.
- [117] Turak, F., Dulger, O. and Ozgur, M., (2010). "Modified colorimetric Spectrophotometric Method for Ascorbic Acid Determination in Vegetable, Fruit, Pharmaceutical and Fruit Juice", 24. Ulusal Kimya Kongresi
- [118] Dokuzlu, C., Gıda Kontrol Analizleri, (2000). Marmara Kitabevi Yayınları, Bursa.
- [119] Gömül, M., Tomris A., Boyacıoğlu, D., Ülker NOKA, Gıda Analizleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çoğaltma Yayın No:64, Bornova,
- [120] Kara, S. (Temmuz 2007). Ankara M. Rüştü UZEL Kimya Meslek Lisesi, Görüşme Notları, Ankara,

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Öznur DÜLGER
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.04.1984 İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : oznur_dulger@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2010
Önlisans	Kimya	Uludağ Üniversitesi	2005
Lise	Fen	Bakırköy İmam Hatip Lisesi	2000

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2009	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	Stajyer
2003	Kinteks Dokuma Boyama San. Tic. A.Ş.	Stajyer