



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİ ÖZÜTLERİ VE TEKSTİL BOYALARINDAKİ
FLAVONOİDLER İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ
YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Mustafa BENER
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**


**Danışman
Prof.Dr. Reşat APAK**


Ocak, 2009

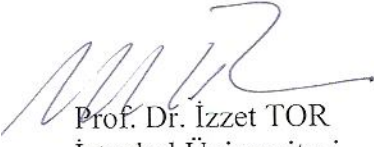
İSTANBUL

Bu çalışma 23/01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. İzzet TOR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi


Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 1438 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen tez danışmanım çok değerli hocam Prof. Dr. Reşat APAK'a, aynı süre boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye, ve birçok çalışmayı beraber yürüttüğümüz grup arkadaşlarım Ar. Gör. Mustafa ÖZYÜREK, Ar. Gör. Burcu BEKTAŞOĞLU, Nilay GÜNGÖR ve Sefa BAKI'ye, en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, çalışmalarım süresince hertürlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 1438 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

OCAK, 2009

Mustafa BENER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
TABLO LİSTESİ.....	IX
SEMBOL LİSTESİ.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. DOĞAL BOYALAR	3
2.1.1. Rubia Tinctorum L. (Kökboya) Doğal Boyası	4
2.1.2. Curcuma Longa L. (Zerdeçal) Doğal Boyası	5
2.1.3. Alkanna Tinctoria (Havaciva) Doğal Boyası	6
2.1.4. Matricaria Chamomilla (Papatya) Doğal Boyası.....	7
2.1.5. Coccus İlicis (Koşnil) Doğal Boyası.....	8
2.2. FLAVONOİDLER.....	8
2.3. ANTRAKİNONLAR.....	16
2.4. TOPLAM FLAVONOİD KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	17
2.4.1. CUPRAC Yöntemi (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini)	17
2.4.2. AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi	17
2.5. LİTERATÜRDE VAROLAN DOĞAL BOYA ANALİZ ÇALIŞMALARI.....	18
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	22
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	22
3.2. KİMYASAL MADDELER	22
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	23

3.3.1. CUPRAC Yöntemi (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini)	23
3.3.2. AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi	23
3.3.3. HPLC Analizi.....	24
3.4. DOĞAL BOYA ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. AlCl ₃ /POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİNİN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ	25
4.1.1. AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yönteminin Uygulanması ve Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	25
4.1.2. Bazı Fenoliklerin AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri.....	30
4.1.2.1. <i>Kuersetin</i>	30
4.1.2.2. <i>Rutin</i>	31
4.1.2.3. <i>Morin</i>	32
4.1.2.4. <i>Fisetin</i>	33
4.1.2.5. <i>Kateşin</i>	34
4.1.2.6. <i>Ellagik asit</i>	35
4.1.2.7. <i>Apigenin</i>	36
4.1.2.8. <i>Luteolin</i>	37
4.1.2.9. <i>Mirisetin</i>	38
4.1.2.10. <i>Kaemferol</i>	39
4.1.2.11. <i>Alizarin</i>	40
4.1.2.12. <i>Purpurin</i>	41
4.1.2.13. <i>Karminik asit</i>	42
4.1.2.14. <i>Kurkumin</i>	43
4.1.3. Fenolik Bileşiklerin AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Molar Absorblama Katsayıları, Lineer Aralıkları ve QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi	44
4.1.4. Dörtlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve AlCl ₃ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi Uygulanarak Beklenen ve Ölçülen QREFC Değerlerinin Eldesi.....	45
4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ	46
4.2.1. Bazı Fenoliklerin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri.....	46
4.2.1.1. <i>Kuersetin</i>	46
4.2.1.2. <i>Rutin</i>	47
4.2.1.3. <i>Morin</i>	48

4.2.1.4.	<i>Fisetin</i>	49
4.2.1.5.	<i>Kateşin</i>	50
4.2.1.6.	<i>Ellagik asit</i>	51
4.2.1.7.	<i>Apigenin</i>	52
4.2.1.8.	<i>Luteolin</i>	53
4.2.1.9.	<i>Mirisetin</i>	54
4.2.1.10.	<i>Kaemferol</i>	55
4.2.1.11.	<i>Alizarin</i>	56
4.2.1.12.	<i>Purpurin</i>	57
4.2.1.13.	<i>Karminik asit</i>	58
4.2.1.14.	<i>Kurkumin</i>	59
4.2.2.	Fenolik Bileşiklerin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Molar Absorblama Katsayıları, Lineer Aralıkları ve QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi.....	60
4.3.	DOĞAL BOYA ÖZÜTLERİNE STANDART KATKI YÖNTEMİNİN UYGULANMASI	61
4.3.1.	<i>Rubia Tinctorum L. (Kökboya) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması</i>	61
4.3.2.	<i>Curcuma Longa L. (Zerdeçal) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması</i>	63
4.3.3.	<i>Alkanna Tinctoria (Havaciva) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması</i>	65
4.3.4.	<i>Matricaria Chamomilla (Papatya) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması</i>	67
4.3.5.	<i>Coccus İlicis (Koşnil) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması</i>	69
4.4.	HPLC İLE FENOLİKLERİN KALİBRASYON DOĞRULARININ OLUŞTURULMASI	70
4.5.	DOĞAL BOYA VE BOYANMIŞ TEKSTİL ÖRNEKLERİ	72
4.5.1.	<i>Doğal Boya Özütlerine CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemlerinin Uygulanması</i>	72
4.5.2.	<i>Rubia Tinctorum L. (Kökboya) Doğal Boyası ile Boyanmış Tekstil Örneğine CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemlerinin Uygulanması</i>	73
4.5.3.	<i>Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) Doğal Boyalarının HPLC Analizi</i>	74
4.6.	SENTETİK KARIŞIMLARIN ANALİZ SONUÇLARI	75
4.6.1.	<i>Sentetik Karışım-1</i>	75
4.6.2.	<i>Sentetik Karışım-2</i>	76
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	77

KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Rubia Tinctorum L. bitkisinin görünümü.....	4
Şekil 2.2	: Alizarin ve purpurinin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.3	: Curcuma Longa L. bitkisinin görünümü.....	5
Şekil 2.4	: Kurkuminin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.5	: Alkanna Tinctoria bitkisinin görünümü.....	6
Şekil 2.6	: Matricaria chamomilla bitkisinin görünümü.....	7
Şekil 2.7	: Apigenin, luteolin ve kuersetinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.8	: Coccus İlicis böceğinin görünümü.....	8
Şekil 2.9	: Karminik asitin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.10	: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.11	: Flavonoidlerin gruplarının temel kimyasal yapıları.....	10
Şekil 2.12	: Rutin, apigenin, krisin ve luteolinin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.13	: Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaemferol'ün moleküler yapıları.....	11
Şekil 2.14	: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 2.15	: Genistein ve daidzeinin kimyasal yapıları.....	12
Şekil 2.16	: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.17	: Siyanidin, malvidin, apigenidin, delphinidin kimyasal yapıları.....	14
Şekil 2.18	: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.....	16
Şekil 2.19	: Antrakinonların kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.20	: CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) bakır(I) kelatının 'Cu(I)-Nc' kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.21	: Al(III)'un kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 4.1	: Çeşitli konsantrasyonlarda kuersetin (QR) varlığında oluşan Al(III)-kuersetin kompleksinin görünür bölge spektrumu.....	26
Şekil 4.2	: 10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sıcaklıklarında uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları.....	27
Şekil 4.3	: 10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sürelerinde uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları.....	28
Şekil 4.4	: 2×10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik pH'larda uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları.....	28

Şekil 4.5	: 10^{-3} M kuersetin çözeltisinin değişik oranlarda seyreltilmesiyle ele geçen çözeltilere uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları.....	29
Şekil 4.6	: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi.....	30
Şekil 4.7	: Rutinin kalibrasyon eğrisi.....	31
Şekil 4.8	: Morinin kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 4.9	: Fisetinin kalibrasyon eğrisi.....	33
Şekil 4.10	: Kateşinin kalibrasyon eğrisi.....	34
Şekil 4.11	: Ellagik asitin kalibrasyon eğrisi.....	35
Şekil 4.12	: Apigeninin kalibrasyon eğrisi.....	36
Şekil 4.13	: Luteolinin kalibrasyon eğrisi.....	37
Şekil 4.14	: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi.....	38
Şekil 4.15	: Kaemferolün kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 4.16	: Alizarinin kalibrasyon eğrisi.....	40
Şekil 4.17	: Purpurinin kalibrasyon eğrisi.....	41
Şekil 4.18	: Karminik asitin kalibrasyon eğrisi.....	42
Şekil 4.19	: Kurkuminin kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.20	: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 4.21	: Rutinin kalibrasyon eğrisi.....	47
Şekil 4.22	: Morinin kalibrasyon eğrisi.....	48
Şekil 4.23	: Fisetinin kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.24	: Kateşinin kalibrasyon eğrisi.....	50
Şekil 4.25	: Ellagik asitin kalibrasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.26	: Apigeninin kalibrasyon eğrisi.....	52
Şekil 4.27	: Luteolinin kalibrasyon eğrisi.....	53
Şekil 4.28	: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi.....	54
Şekil 4.29	: Kaemferolün kalibrasyon eğrisi.....	55
Şekil 4.30	: Alizarinin kalibrasyon eğrisi.....	56
Şekil 4.31	: Purpurinin kalibrasyon eğrisi.....	57
Şekil 4.32	: Karminik asitin kalibrasyon eğrisi.....	58
Şekil 4.33	: Kurkuminin kalibrasyon eğrisi.....	59
Şekil 4.34	: CUPRAC yöntemi ile Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.35	: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	62
Şekil 4.36	: CUPRAC yöntemi ile Curcuma Longa L. (Zerdeçal) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	63
Şekil 4.37	: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile Curcuma Longa L. (Zerdeçal) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.38	: CUPRAC yöntemi ile Alkanna Tinctoria (Havaciva) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	65
Şekil 4.39	: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile Alkanna Tinctoria (Havaciva) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	66
Şekil 4.40	: CUPRAC yöntemi ile Matricaria Chamomilla (Papatya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi.....	67

Şekil 4.41 :	AlCl ₃ /potasyum asetat yöntemi ile Matricaria Chamomilla (Papatya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi	68
Şekil 4.42 :	CUPRAC yöntemi ile Coccus Ilicis (Koşnil) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 4.43 :	AlCl ₃ /potasyum asetat yöntemi ile Coccus Ilicis (Koşnil) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi	70
Şekil 4.44 :	Karminik asit standardının kromatogramı	71
Şekil 4.45 :	Alizarin standardının kromatogramı	72
Şekil 4.46 :	Kurkumin standardının kromatogramı	72
Şekil 4.47 :	Curcuma Longa L. (Zerdeçal) özütü kromatogramı	74
Şekil 4.48 :	Coccus İlicis (Koşnil) özütü kromatogramı	74
Şekil 4.49 :	Sentetik Karışım-1'in kromatogramı	75
Şekil 4.50 :	Sentetik Karışım-2'nin kromatogramı	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans).....	30
Tablo 4.2	: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	31
Tablo 4.3	: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	32
Tablo 4.4	: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	33
Tablo 4.5	: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	34
Tablo 4.6	: Ellagik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	35
Tablo 4.7	: Apigeninin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	36
Tablo 4.8	: Luteolinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	37
Tablo 4.9	: Mirisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	38
Tablo 4.10	: Kaemferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	39
Tablo 4.11	: Alizarinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	40
Tablo 4.12	: Purpurinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	41
Tablo 4.13	: Karminik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	42
Tablo 4.14	: Kurkuminin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	43
Tablo 4.15	: Çeşitli flavonoidlerin $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemine göre doğru denklemleri, molar absorbtivite ve QREFC (kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu) değerleri	44
Tablo 4.16	: Sentetik karışım çözeltilerinin $AlCl_3$ /Potasyum asetat yöntemine göre mM Kuersetin(QR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.17	: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	46
Tablo 4.18	: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	47
Tablo 4.19	: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	48
Tablo 4.20	: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	49
Tablo 4.21	: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	50
Tablo 4.22	: Ellagik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi ...	51
Tablo 4.23	: Apigeninin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	52
Tablo 4.24	: Luteolinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	53
Tablo 4.25	: Mirisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	54
Tablo 4.26	: Kaemferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi....	55
Tablo 4.27	: Alizarinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	56
Tablo 4.28	: Purpurinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	57
Tablo 4.29	: Karminik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.....	58
Tablo 4.30	: Kurkumin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi	59
Tablo 4.31	: Çeşitli flavonoidlerin CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri, molar absorbtivite ve QREFC (kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu) değerleri	60
Tablo 4.32	: Çeşitli fenoliklerin HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve alıkonma zamanları (y: pik alanı, c: molar konsantrasyon).....	71

Tablo 4.33 :	Doğal boya örneklerinin belirlenen kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek).....	73
Tablo 4.34 :	Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası ile boyanmış iplik örneğinin belirlenen kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değeri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek).....	73
Tablo 4.35 :	Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) doğal boya örneklerinde belirlenen Kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek).....	75
Tablo 4.36 :	Sentetik Karışım-1'in kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri (mM QR-eşdeğeri)	76
Tablo 4.37 :	Sentetik Karışım-2'nin kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri (mM QR-eşdeğeri)	76

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
QREFC	: kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ROS	: reaktif oksijen türleri
RNS	: reaktif azot türleri
UV	: ultraviyole
QR	: kuersetin
Rut	: rutin
Mor	: morin
Fis	: fisetin
Cat	: kateşin
EA	: ellagik asit
Ap	: apigenin
Lut	: luteolin
Myr	: mirisetin
Kaem	: kaemferol
Alz	: alizarin
Pur	: purpurin
Kar	: karminik asit
Cur	: kurkumin
ε	: molar absorblama katsayısı

ÖZET

BİTKİ ÖZÜTLERİ VE TEKSTİL BOYALARINDAKİ FLAVONOİDLER İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK ANALİZ YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Bitki ve hayvanlar gibi doğal yaşam kaynaklarından elde edilen doğal boyalar elyafların boyanmasında kullanılmaktadır. Bu boyalar başlıca karetonoidler, hidroksiketonlar, antrakinonlar, naftakinonlar, flavonoidler, indigoitler ve benzer bileşikleri içermektedir. Tekstil ürünlerinde bulunan bu flavonoid boyaların analizi; FTIR mikroskopisi ve SEM/EDS gibi non-invasive (tahribatsız) teknikler, dizi diyod dedektörlü HPLC gibi ekstraktif teknikler veya hekzametildisilazan ile türevlendirmenin ardından piroliz-GC/MS tekniği gibi yöntemler ile yapılmaktadır. Ancak bu yüksek maliyetli ve karmaşık teknikler çoğu analiz laboratuvarlarında bulunmamaktadır. Bu nedenle doğal boyaların toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi için kolay, ucuz, hızlı ve duyarlı tayin yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda bu tez çalışmasının amacı; bitki özütleri ve tekstil boyalarındaki toplam flavonoid miktarının geliştirilen yöntemlerle belirlenmesi ve sonuçların referans yöntem ile uyumunun araştırılmasıdır.

Bu çalışmada; antioksidan etki gösterdikleri bilinen flavonoidler için literatürde CUPRAC (Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi olarak bilinen ve toplam antioksidan kapasite ölçümleri için laboratuvarlarımızda geliştirilen spektrofotometrik yöntem temel alınmıştır. CUPRAC yöntemi doğal boyalardaki flavonoid kapasite ölçülmesinde kullanılabilir duruma getirilmiştir. Kromojenik yükseltgenme aracı olarak kullanılan bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktifi varlığında flavonoidlerin, Cu(II)-Nc kompleksini 450 nm dalgaboyunda maksimum ışık soğurması gösteren Cu(I)-Nc kompleksine indirgemesi ve kendilerinin uygun kinonlara yükseltgenmesinden yararlanılarak flavonoid kapasite tayinleri yapılmıştır.

Çalışmada karşılaştırma için uygun referans yöntem olarak literatürde $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi olarak bilinen flavonoid tayin yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem doğal boyalardaki toplam flavonoid konsantrasyonu ölçülmesinde kullanılmıştır. $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin esası alüminyum klorürün flavon ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle oluşturduğu stabil kelat formudur. Oluşan renkli kompleksin, flavonoid kapasite tayininde kullanılan referans bileşik olan kuersetinin Al-kompleksinin maksimum absorbans verdiği 427 nm dalgaboyunda ölçülmesinden yararlanılarak flavonoid kapasite tayini yapılmıştır. Seçilen doğal boya özütlerine C-18 kolonu kullanan HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) referans yöntemi uygulanarak elde edilen bulguların CUPRAC ve $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemlerinininkilerle uyumu araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulamasında optimum deney koşulları belirlenmiştir. Çalışmanın diğer

kademelerinde ilk olarak doğal boya içerisinde bulunması muhtemel polifenolik bileşiklerin (flavonoid, antrakinon, vs.) her iki yöntemle kalibrasyon doğruları oluşturularak, QREFC (Kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu) katsayıları bulunmuştur. Her iki yöntem için kuersetin kullanımıyla standart katkı çalışmaları yapılarak herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı gözlenmiştir. Boyama işlemlerinde kullanılan, bitki ve hayvanlardan elde edilen, *Rubia tinctorum* (Kökboya), *Curcuma longa* L. (Zerdeçal), *Alkanna tinctoria* (Havaciva), *Matricaria chamomilla* (Papatya) ve *Coccus ilicis* (Koşnil) doğal boyalarının toplam flavonoid kapasiteleri; CUPRAC yöntemine göre sırasıyla 21.49, 38.91, 19.04, 48.60, 143.49 $\mu\text{mol QR g}^{-1}$, AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre ise sırasıyla 24.58, 165.89, 6.53, 15.02, 33.02 $\mu\text{mol QR g}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Farklı yöntemlerle ölçülen fenoliklerin QREFC katsayılarındaki farklılıklar, boya özütlerinin TFC (Toplam flavonoid kapasite) sıralamasında değişime neden olmuştur. Her iki spektrofotometrik yöntem, HPLC yöntemine göre valide edilmiştir.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHODS OF ANALYSIS FOR FLAVONOIDS IN PLANT EXTRACTS AND TEXTILE DYES

Natural dyes used in dyeing fibers are made from natural living sources such as plants and animals. These dyes include mainly carotenoids, hydroxyketones, anthraquinones, naphthoquinones, flavonoids, indigoids and related compounds. These compounds can be found either directly in crude extracts or gain colour from extracted colourless precursors as a result of such reactions as hydrolysis, oxidation, condensation, etc. Flavonoid dyes on textile products can be detected by non-invasive techniques such as FTIR microscopy and SEM/EDS, or estimated by extractive techniques such as HPLC with diode-array detection, RP-HPLC/MS or pyrolysis-GC/MS after derivatization with hexamethyldisilazane. Naturally these high-cost sophisticated techniques are not available to many conventional laboratories, and visible spectroscopy has been widely applied to such analyses. Unfortunately, these sophisticated and costly techniques are not available to many routine laboratories. Thus it is necessary to develop simple, low-cost, rapid, and sensitive methods for the assay of flavonoid content of natural dyes. In this regard, the aim of this thesis work is to determine the total flavonoid contents of plant extracts and textile dyes with the devised methods and to establish the compliance of the obtained results with those found by the reference method.

In this study, the determination of antioxidant flavonoids was based on the use of the cupric ion reducing antioxidant capacity assay (known in the literature as CUPRAC method) originally developed in our laboratories for the measurement of total antioxidant capacity (TAC). The CUPRAC method was rendered to measure the flavonoid capacity of natural dyestuffs. The flavonoid capacity measurement was based on the oxidation of these compounds to the corresponding quinones by the chromogenic copper(II)-neocuproine (Cu(II)-Nc) reagent, which was itself reduced to the cuprous neocuproine chelate showing maximum absorbance at 450 nm wavelength.

As the reference method of comparison, the widely used AlCl_3 /potassium acetate spectrophotometric method was applied to total flavonoid assay of these dyes. This method is based on the chelate formation of Al(III) with the C-4 keto and either one of C-3 or C-5 hydroxyl substituents of the flavonoid molecule (flavones and flavonols). The flavonoid capacity was measured by absorbance measurement of this coloured Al-chelate at the 427 nm-analytical wavelength of Al(III)-quercetin chelate used as reference. The results of the proposed (CUPRAC) and comparison (AlCl_3 /potassium acetate) methods applied to selected natural dye extracts were correlated with the reference high performance liquid chromatography (HPLC) findings using a C-18 column.

During the first phase of the study, the optimal conditions of measurement with the AlCl_3 /potassium acetate were determined. In the succeeding phases, the calibration equations for the polyphenolic compounds potentially contained in natural dyes (*e.g.*, flavonoids, anthraquinones, etc.) were established with the use of both spectrophotometric methods, and the quercetin (QR) equivalent flavonoid concentrations (QREFC) of each compound was found. The method of standard additions using quercetin increments was applied to both methods to see if there was any deviation from Beer's law; the results showed the absence of any chemical deviations. The quercetin capacities with respect to both methods (in the units of QREFC coefficients) of some natural dyes widely used in fibre dyeing were; *Rubia tinctorum* (common madder), *Curcuma longa* L. (curcumin), *Alkanna tinctoria* (dyers' bugloss), *Matricaria chamomilla* (chamomile), and *Coccus ilicis* (cochineal); CUPRAC values: 21.49, 38.91, 19.04, 48.60, and 143.49 $\mu\text{mol QR g}^{-1}$, and AlCl_3 /potassium acetate values: 24.58, 165.89, 6.53, 15.02, and 33.02 $\mu\text{mol QR g}^{-1}$, respectively. The differences in the QREFC coefficients of individual phenolics measured with different assays caused variations in the TFC (Total flavonoid capacity) order of the measured dye extracts. Both of spectrophotometric methods were validated against HPLC method.

1. GİRİŞ

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridir. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal farklılıklar bu bileşikleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır.

Bitki ve hayvanlar gibi doğal yaşam kaynaklarından elde edilen doğal boyalar elyafların boyanmasında kullanılmaktadır. Doğal boyalar başlıca karotenoidler, hidroksiketonlar, antrakinonlar, naftakinonlar, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, indigoitler ve benzer bileşikler içerirler. Doğal boyaların analizleri sonucu oluşturulan renk indeksi, tekstile verilen rengin hemen hemen %50'sinin doğal boyalardaki flavonoid bileşiklerden kaynaklandığını göstermektedir [1]. Bu renkli bileşikler ham özütten doğrudan veya renksiz özüte uygulanan hidroliz, oksidasyon, kondenzasyon gibi işlemler sonrasında elde edilir. Bunların bazıları metal katyonlarıyla kompleksleri sonrası renk değiştirirler [2].

Arkeolojik nesnelere için boyaların incelenmesi uzun zamandır kullanılmaktadır. Tarihi tekstillerdeki boyaların yapısının aydınlatılması bize kalıntının nerede, ne zaman ve nasıl yapıldığı hakkında önemli bilgiler vermektedir [3].

Literatürde tekstil ürünlerindeki doğal boyaların analizine yönelik birçok çalışma yer almaktadır. Ancak bu çalışmalarda kullanılan yüksek maliyetli ve karmaşık teknikler çoğu analiz laboratuvarlarında bulunmamaktadır. Bu nedenle hemen hemen her laboratuvarında bulunan UV-görünür bölge spektrofotometreleri ile ölçümün yapılabileceği bitkisel özütler ve flavonoid esaslı tekstil boyalarına uygulanabilecek spektrofotometrik yöntemlerin bulunmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışması kapsamında bitki özütlerinde ve flavonoid esaslı tekstil boyalarındaki toplam flavonoid miktarını tayin etmek amacıyla; Anabilim Dalımızda geliştirilen CUPRAC (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) toplam antioksidan kapasite tayin yöntemi [4] kullanıldı. Diğer yandan toplam flavonoid tayininde kullanılan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi [5] incelenerek, bu yöntemin Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma ve karışımların analizinde toplamsallıktan sapma gösterip göstermediğinin araştırılması yapıldıktan sonra $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi kullanılarak toplam flavonoid miktarı tayini yapıldı. Bu yöntemlerin geçmişte bitkisel flavonoid esaslı boyaların elde edilmesinde kullanılan bitkilerin özütlerine ve flavonoid boyalarla boyanmış tekstil örneği üzerinden kaynar çözeltide asit-alkol-su ile çıkarılan flavonoid boya özütlerine uygulanması yapılmıştır. Ayrıca tüm bu analizlerden elde edilen sonuçların referans yöntem olarak kullanılan HPLC yöntemi bulgularıyla doğrulaması yapılmıştır.

Elde edilen kapasite değerleri kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu (QREFC) cinsinden verilmiştir.

Spektrofotometrik flavonoid tayin yöntemleriyle, bitki özütleri ve tekstil boyalarındaki flavonoid tayini için düşük maliyetli, hızlı ve basit bir analiz yapılabilmesi çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DOĞAL BOYALAR

Kumaşların boyanmasında XIX. Yüzyıl ortalarına gelinceye kadar yalnız bitkisel kökenli veya böceklerden elde edilen boyarmaddeler kullanılmıştır. XVII. Yüzyıldan başlayarak birkaç tane yarı sentetik veya sentetik boyarmadde de sınırlı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Buna göre, boyamacılık tarihi 1860'lara kadar süren doğal boyamacılık dönemi ve bunu izleyen sentetik boyamacılık dönemi olarak iki döneme ayrılabilir.

Geçmişte özellikle renklendirme amacıyla kullanılan doğal boyaların ticareti de geniş bir şekilde yapılmaktaydı. Günümüzde ticari tekstil boyamasında kullanılan boyaların çoğu sentetiktir ve doğal boyaların kullanımı uzman şirketler ile el sanatları dışında maalesef modern boyamada fazla kullanılmamaktadır. Genel bir yanlış anlaşılmaya göre doğal boyaların yalnızca bej ve kahve renkte üretildikleri ve solgun gözüktükleridir. Oysa gerçekte canlılıkları gibi birçok özellikleriyle doğal boyalar, sentetik boyalara üstünlük sağlamaktadırlar [6].

Bitkilerin mevsimlik olması bunların sağlanmasında, içerdikleri boyarmadde miktarlarının yetiştikleri yer ve koşullara göre değişmesi boyamada aynı renk tonunun tutturulmasında önemli güçlükler yaratmaktaydı. Sentetik boyarmaddeler başlangıçta fazla ucuz olmadıkları, bazı durumlarda bitkisel boyarmaddelerden daha pahalı oldukları halde kullanım kolaylığı ve verdikleri standart boyama nedeniyle tercih edilmişler ve hızla yaygınlaşmışlardır. Buna karşın, bitkisel boyarmaddelerin çoğunun haslığı, yani yıkama ve güneş ışığına karşı dayanıklılığı oldukça yüksektir.

Boyarmadde içeren ve boyamada kullanılan bitkilerin sayısı çoktur. Boyarmadde bu bitkilerin kök, kabuk, yaprak, çiçek, meyve ve tohumlarında bulunabilir. Liken ve yosunların bazıları da boyama yeteneğine sahiptirler [7].

Bitkilerde rastlanılan boyarmaddeler indigo ve berberin dışında azot içermezler. Bitkisel boyarmaddelerin önemli bir bölümü aromatik benzen halkası ve karbonil ($>C=O$) grubu içeren zayıf asit özelliğindeki maddelerdir ve mordanlı boyarmaddeler sınıfına girerler.

Boya bitkileri başlangıçta yalnız doğadan elde edilirken zamanla indigo, kökboya, cehri gibi önemli olanlarının tarımı yapılmaya başlanmıştır. Osmanlı İmparatorluğu döneminde kökboya ve cehri tarımı yaygın olarak yapılmış ve bunlar iç gereksinimi karşıladıkları gibi önemli birer ihraç ürünü olmuşlardır. Anadolu florası boya bitkileri açısından çok zengindir [7].

Günümüzün gelişmiş kimyasal analiz yöntemleri yardımıyla tarihsel tekstil ürünlerinin boyanmasında kullanılmış olan boyarmaddeler ve boya bitkileri kolaylıkla saptanabilmektedir. Böyle bir analiz için 1 mikrogram (10^{-6} g) boyarmadde yeterlidir. Bu miktardaki boyarmadde bir halıdaki tek bir ilmekten sağlanabilir. Boyarmaddelerin analiz ve ayrılmasında kullanılan başlıca yöntemler kromatografi türleri ve spektrofotometrik yöntemlerdir [7].

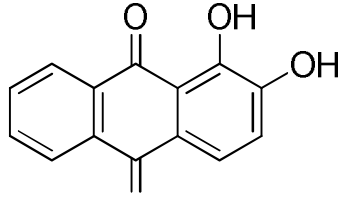
Tez çalışması kapsamında kullanılan doğal boyalar hakkındaki bilgiler kısaca aşağıda sıralanmaktadır:

2.1.1. *Rubia Tinctorum* L. (Kökboya) Doğal Boyası

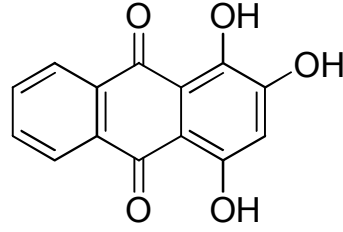


Şekil 2.1: *Rubia Tinctorum* L. bitkisinin görünümü

Antik çağlardan beri kullanılan en önemli boyar maddelerden biri *Rubia tinctorum* bitkisinin köklerinden elde edilen kökboya boyarmaddesidir. Mordanla kullanılan kökboya kırmızı, pembe, turuncu, leylak ve kahverengi gibi değişik renklerde geniş bir boyama spektrumuna sahiptir. En önemli özellikleri yüksek çeşitlilikte ve kalıcılıkta renklerin elde edilmesidir. Kökboya 23 kadar antrakinon içermesine rağmen en önemli boyarmaddeleri Antrakinon grubundan alizarin ve purpurindir [6].



Alizarin



Purpurin

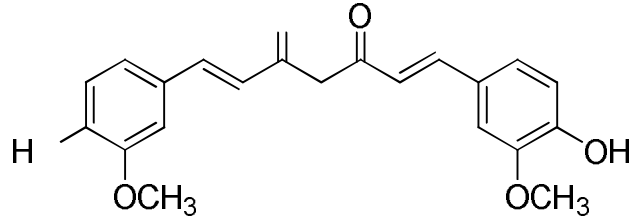
Şekil 2.2: Alizarin ve purpurinin kimyasal yapısı

2.1.2. *Curcuma Longa* L. (Zerdeçal) Doğal Boyası



Şekil 2.3: *Curcuma Longa* L. bitkisinin görünümü

Curcuma longa, önemli bir baharat çeşidi ve boya maddesi olup yaklaşık 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. *Curcuma longa*, turmerik, zerdeçal ve kurkumin isimleri ile de anılmaktadır. Sarı renk pigmentleri, bitkinin kökünün öğütülmesiyle elde edilir. Hindistan ve diğer Asya ülkelerinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır ve etken maddesi kurkumindir [8].



Şekil 2.4: Kurkuminin kimyasal yapısı

2.1.3. Alkanna Tinctoria (Havaciva) Doğal Boyası



Şekil 2.5: Alkanna Tinctoria bitkisinin görünümü

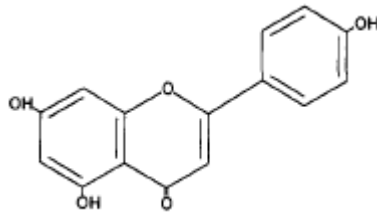
Hodangiller familyasından olan Alkanna tinctoria Akdeniz bölgesinde yetişen bir bitkidir. Havaciva otu, tüylü boya, yer ineği isimleri ile de anılır. Kuru ve güneşe bakan taşlıklı yerlerde bulunur. Mart-Haziran aylarında çiçek açar. Çiçekleri mavidir, kökleri kırmızı renkli boyarmadde olarak kullanılır. Bu bitki hayvanların adale incinmelerinde bir merhem olarak kullanılır, ağrıları giderir ve bağırsak hastalıklarında faydalıdır.

2.1.4. Matricaria Chamonilla (Papatya) Doğal Boyası

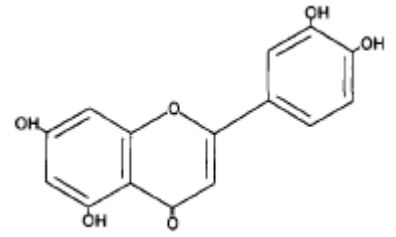


Şekil 2.6: Matricaria chamonilla bitkisinin görünümü

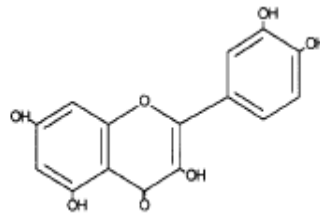
Papatya, 10-15 cm boyunda, parçalı yapraklı tek yıllık otsu bir bitkidir. Çiçek tablası olgunlukta konik, üstü çıplak ve içi boştur. Batı ve Güney Anadolu'da yol kenarlarında ve kültür alanlarında yayılış gösterir [9]. Çiçeklerinden sarı renk elde edilir. Boyarmaddeleri apigenin, luteolin ve kuersetindir [10].



Apigenin



Luteolin



Kuersetin

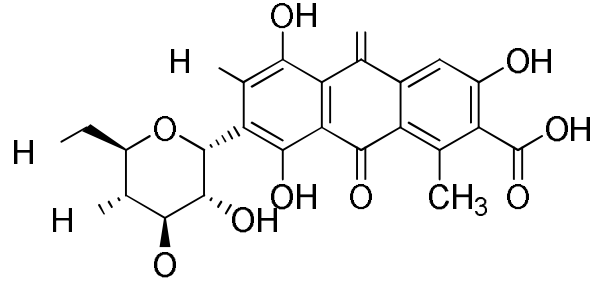
Şekil 2.7: Apigenin, luteolin ve kuersetinin kimyasal yapısı

2.1.5. Coccus İlıcıs (Koşnil) Doğal Boyası



Şekil 2.8: Coccus İlıcıs böceğinin görünümü

Kırmızı böceğinin boyarmaddesini oluşturan etken madde karminik asittir. Kırmızı böceklerinin kaktüslerinden fırçayla süpürülerek torbalara doldurulduktan sonra, ajitasyon yöntemiyle ya da sıcak su, buhar, güneş ışığıyla öldürülerek kurutulmasıyla elde edilir.

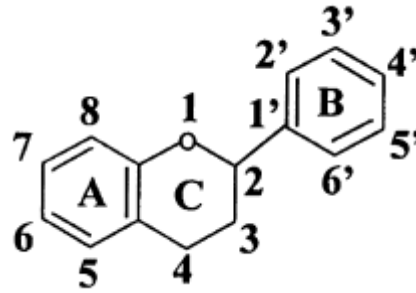


Şekil 2.9: Karminik asitin kimyasal yapısı

2.2. FLAVONOİDLER

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.10). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve

çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-*orto* glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz da bulunabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal yutma ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [11].



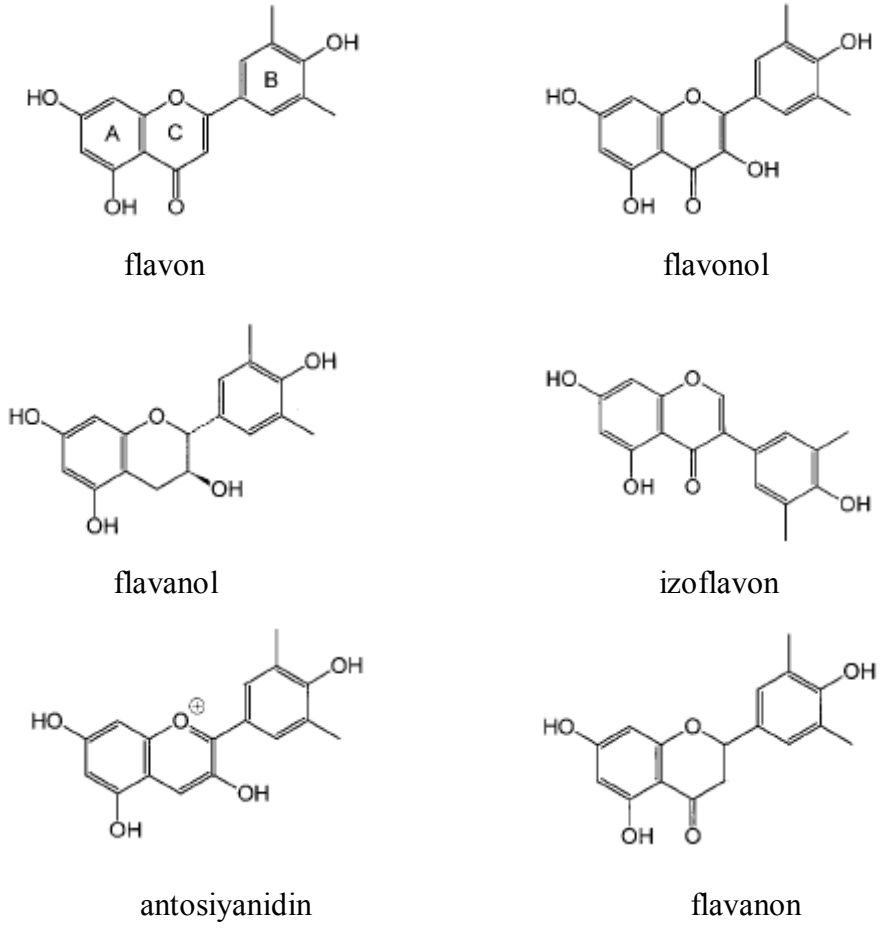
Şekil 2.10: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridir [11]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır [12]. Bu sınıflardan biri antoksaninler, diğeri antosiyaninlerdir. Antoksaninler kendi arasında 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1. Antoksaninler

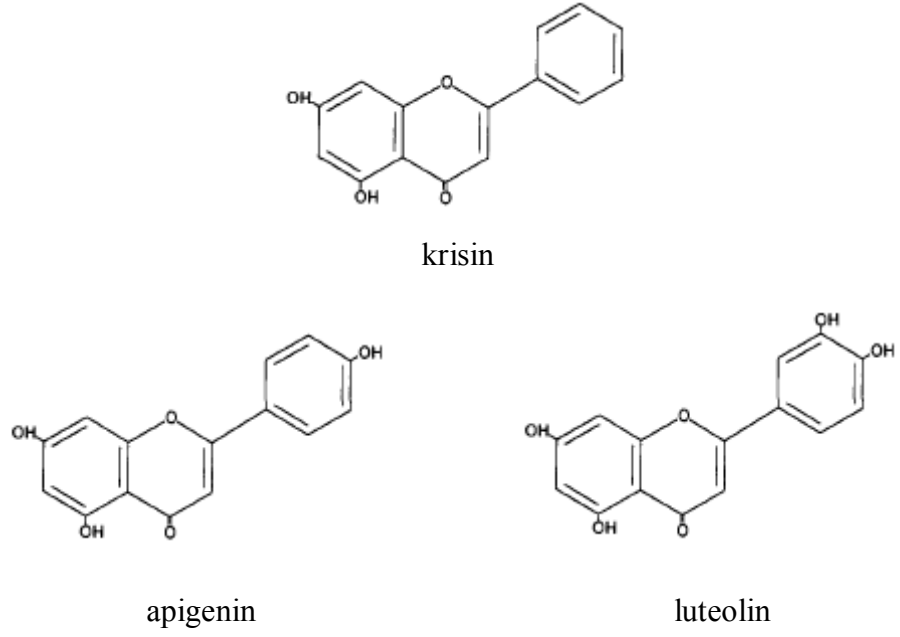
- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



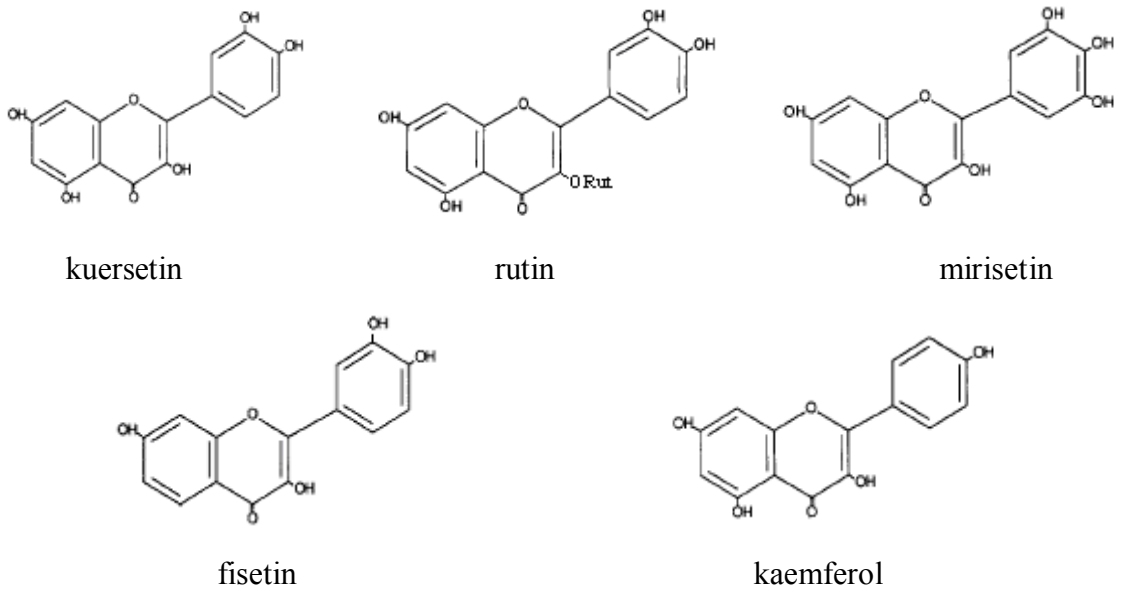
Şekil 2.11: Flavonoidlerin gruplarının temel kimyasal yapıları

Flavonoidler sınıfının temel maddesi *2-fenil kromon* olan *flavon*'dur. En önemli flavonlar; apigenin, krisin ve luteolin'dir (Şekil 2.12). Apigenin; maydonoz ve kereviz sapında, krisin; meyve kabuğunda, luteolin ise acı biberde bulunmaktadır.



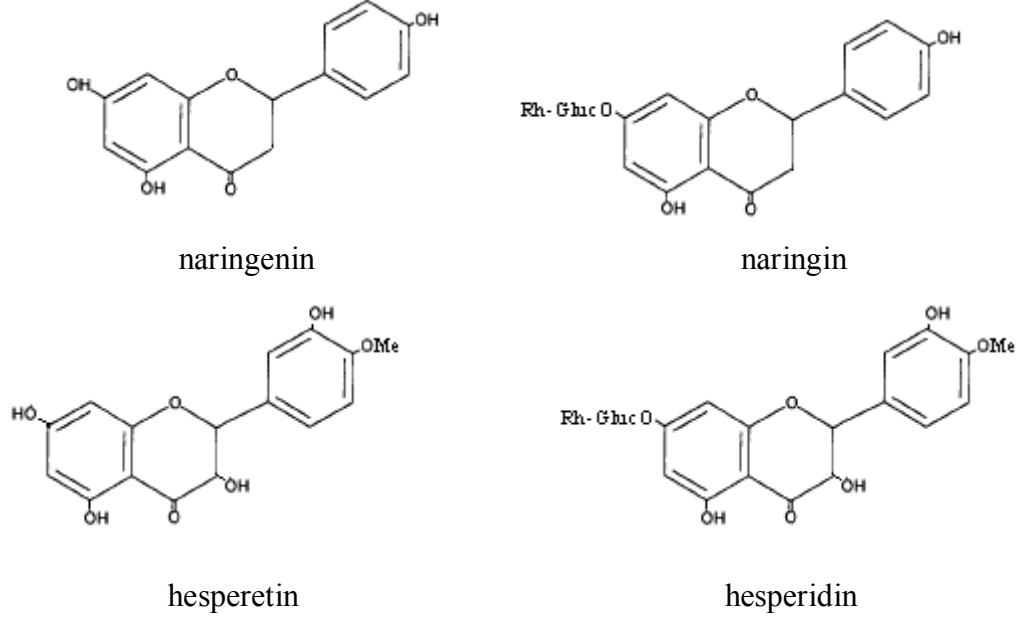
Şekil 2.12: Apigenin, krisin ve luteolinin kimyasal yapısı

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, rutin, mirisetin, fisetin ve kaemferoldur. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir. Soğanda, elmada ve lahanada bol miktarda bulunur. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur [13].



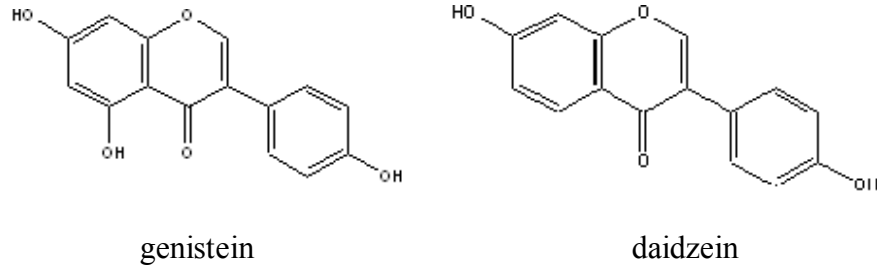
Şekil 2.13: Kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaemferolün kimyasal yapıları

Flavonun dihidroksi türevi *flavanon*'dur. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringenin 3-hidroksi flavanon'dur. Greyfurtun karakteristik acılığını veren bileşik naringenin glikozidi olan naringin'dir. Turunçgillerden ekşi portakalda bulunur ve son derece acıdır. Naringenin aglikonu olan naringenin ise acı değildir. Hesperidin ve hesperetin limon ve portakalda bolca bulunur. Hesperidin, hesperetin glikozididir.



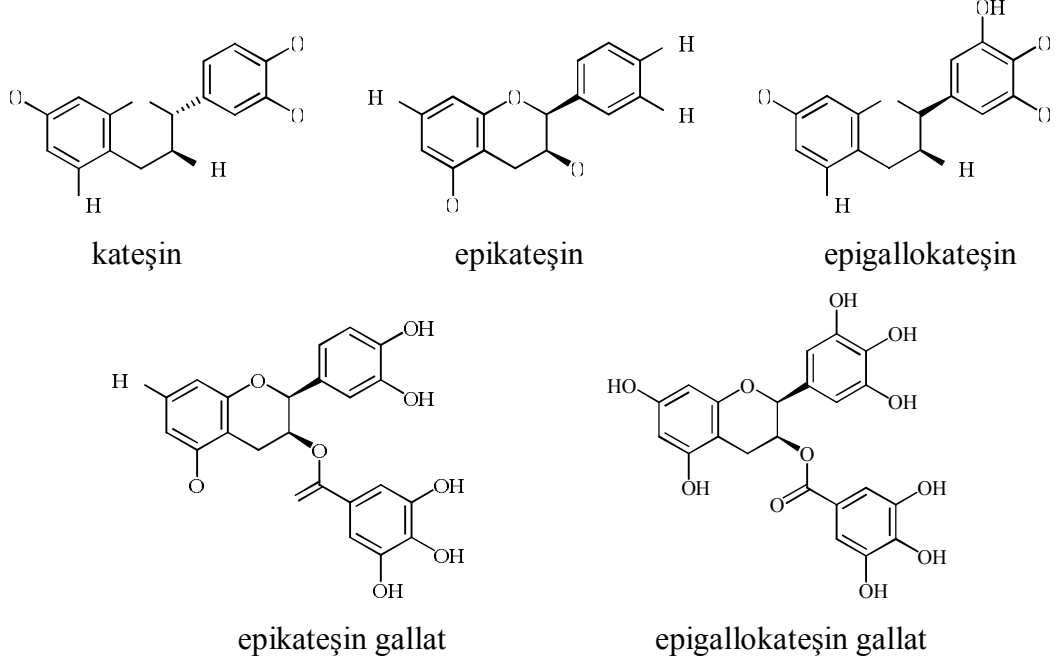
Şekil 2.14: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin kimyasal yapıları

Flavonların izomeri olan *izoflavonlar* ise aromatik B halkasının, C halkasının 3. karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur. Genistein, daidzein ve bunların glikozidleri olan genistin ve daidzin başlıca izoflavonlar olup soya fasulyesi ve soya fıstığında mevcuttur [14].



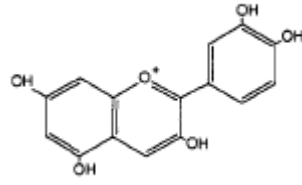
Şekil 2.15: Genistein ve daidzeinin kimyasal yapıları

Flavonollerin C halkasında bulunan çifte bağlı oksijen atomunun yerine $-CH_2$ grubu geldiğinde *flavanol* oluşur. Flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin' dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada bol miktarda bulunurlar [13,15,16].

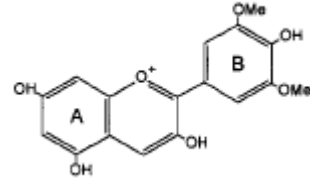


Şekil 2.16: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat, epigallokateşin gallatın kimyasal yapıları

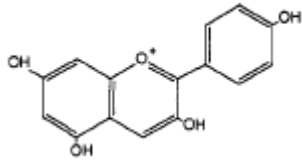
Antosiyaninler, flavanollerin B aromatik halkasına bir hidroksil grubunun bağlanmasıyla meydana gelir. Aglikonları *antosiyanidinler*'dir. En önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvidin ve delphinidin'dir. Renkli meyvelerde özellikle kırmızı ve mor renkli meyvelerde bol miktarda bulunur [15].



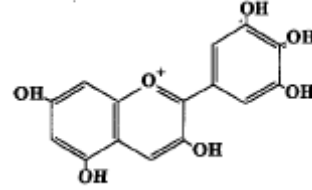
siyanidin



malvidin



apigenidin



delfinidin

Şekil 2.17: Siyanidin, malvidin, apigenidin, delfinidin kimyasal yapıları

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki süstitüentlerin yerleşimi itibarıyla antioksidan aktiviteleri, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu aktiviteden daha yüksek olabilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür [17,18].

Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil süstitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:



Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır:

- B halkasındaki o-dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)

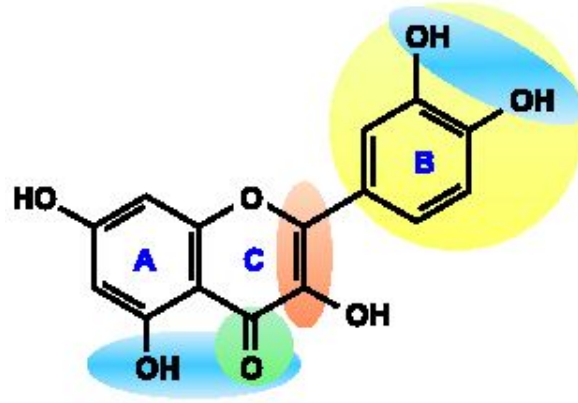
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyonundaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)

Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır [19].

B halkası hidroksil konfigürasyonu; reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerinin süpürülmesinde en önemli öğedir. B halkasındaki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirirler [17].

B halkasındaki 3',4'-kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır [20]. Bu yerleşim çoğu antioksidanın en göze çarpan özellikleridir. Örneğin luteolin kaemferol'den daha güçlü antioksidan kapasitesine sahiptir. Her ikisi de benzer hidroksil sayısına sahip olmalarına rağmen kaemferol B halkasındaki kateşol yapısından yoksundur (Şekil 2.12, 2.13). Kateşinin radikal süpürme yeteneği çoğunlukla bu kateşol yapısına sahip olmasından kaynaklanır (Şekil 2.16). Kateşol veya pirogallol sistemlerinden yoksun flavonlar kararsız radikaller oluşturur ve zayıf süpürücülerdir [21,22].

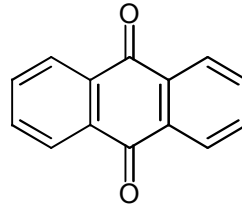
Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler radikallere karşı daha etkilidirler. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [11]. Şekil 2.18'de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya orto-dihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı, yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonel gruplar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transisyon metallerini kelatlama yeteneği sağlar [23].



Şekil 2.18: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı

2.3. ANTRAKİNONLAR

Kapalı formülü $C_{14}H_8O_2$ olan, antrasenin en önemli kinon türevidir olan antrakinonlar, birçok boyarmadde ve pigment sınıfının ana maddesidir. Antrakinonların temel yapısı şekil 2.19’da görülmektedir. Sanayide, antrasenin yükseltgenmesiyle veya benzen ile ftalik anhidritin kondenzasyon ürününden su giderilmesiyle elde edilir. Antrakinon yükseltgenmeye karşı son derece karardır. Buna mukabil kolayca indirgenerek çeşitli ürünlere dönüşebilir. Antrakinon suda çözünmez, ancak alkol, eter ve aseton gibi çözücülerde çözünür.



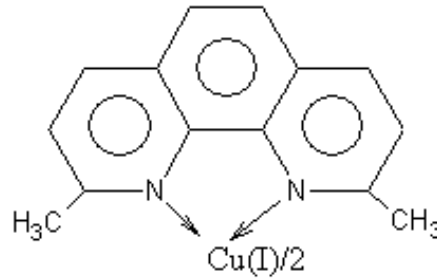
Şekil 2.19: Antrakinonların kimyasal yapısı

Kinonların en geniş grubu olan antrakinonlar en bilinen mordan boyalardır. En önemli özelliklerinden biri de diğer bitkisel boyalarla birlikte kullanılabilirlerdir. Birçok farklı bitkiden elde edilebilirler ve genellikle genç bitkilerin içinde glikozidleri halinde bulunurlar.

2.4. TOPLAM FLAVONOİD KONSANTRASYONUN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

2.4.1. CUPRAC Yöntemi (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini)

Besin yoluyla alınan polifenoller, C ve E vitaminleri, flavonoidler ve glukozidleri ile insan serumu antioksidanları için geçerli olabilecek, hem hidrofilik hem de lipofilik maddeler için elverişli, basit, ucuz, pratik, seçici ve duyarlı bir antioksidan kapasite tayin yöntemi olan CUPRAC yönteminde reaktif, amonyum asetat tampon ortamında iyi bir yükseltgen olan bakır(II)-neokuproin çözeltisidir. Reaktifin indirgenmesiyle oluşan Cu(I)-neokuproin kelatının (Şekil 2.20) 450 nm dalgaboyundaki absorbansı okunmaktadır. Bu yöntemde, toplam antioksidan kapasite, bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden ölçüldüğünden dünya literatürüne CUPRAC adıyla kazandırılmıştır. Toplam antioksidan kapasite/aktivite tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem; bakır(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (doğrudan veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [4].



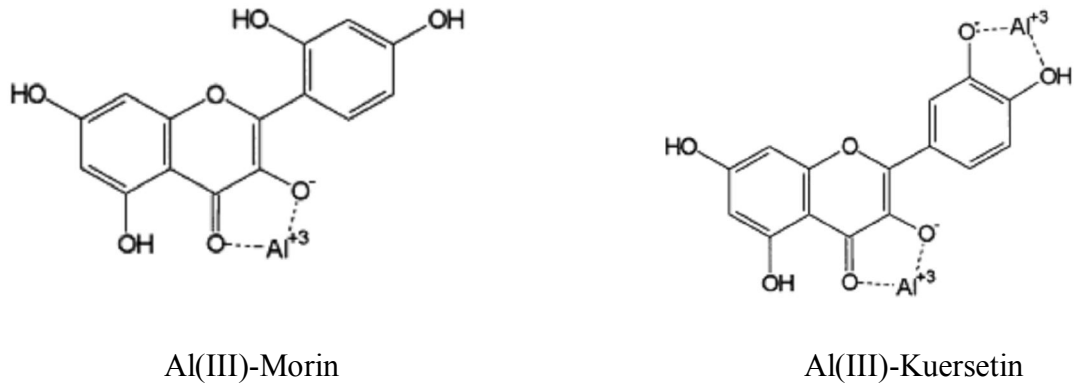
Şekil 2.20: CUPRAC yönteminin kromoforunu oluşturan Bis(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) bakır(I) kelatının ‘Cu(I)-Nc’ kimyasal yapısı

2.4.2. AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde alüminyum klorür, flavon ve flavonol grubu bileşiklerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle stabil bir kelat oluşturmaktadır (Al-Flavon veya Al-Flavonol kompleksi). Bununla birlikte alüminyum flavonoid grubu bileşiklerin A ve B halkarındaki orto-dihidroksi gruplarıyla da kararsız kompleksler oluşturmaktadır. Şekil 2.21’de Al(III)’un kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapıları verilmiştir.

La(III)'te flavonoid bileşiklerle kompleks oluşturmaktadır. La(III)'ün bu özelliği kullanılarak askorbik asit tayinine göre flavonoidlerin La(III) kompleksleri oluşturulduktan sonra ekstraksiyon yolu ile etilasetat fazına çekilmekte ve sulu faza CUPRAC yöntemi uygulanarak askorbik asit tayini spektrofotometrik olarak yapılmaktadır [39].

Toplam flavonoid tayininde kullanılan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi; etanol, alüminyum(III) klorür çözeltisi ve potasyum asetat çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine flavonoid çözeltisinin (flavon, flavonol veya isoflavon bileşikleri) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 415 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [5].



Şekil 2.21: Al(III)'ün kuersetin ve morin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı

2.5. LİTERATÜRDE VAROLAN DOĞAL BOYA ANALİZ ÇALIŞMALARI

Doğal boyaların analizlerine ait literatürde birçok çalışma mevcuttur. Bunların bazılarını örneklendirmek çalışmanın içeriğinin anlaşılması açısından yararlı olacaktır.

M. J. Casas-Catalan ve diğ. [24] tarafından doğal boyalardan organik sınıfları farklı dört örnek olan; doğal kökboya (antrakinoid), zerdeçal (kurkuminoid), safran (karotenoid) ve indigo (indigotik) doğal boyalarının analizi hekzametildisilazan ile türevlendirmenin ardından piroliz-GC/MS tekniği uygulanarak yapılmıştır. Çalışma sonunda kökboya için alizarin, kuinizarin, ksantopurpurin ve purpurinin, trimetilsilil türevlerinin karakteristik pikleri elde edilmiştir. Safran için safranal, isopron ve krosetinin, trimetilsilil türevi

pikleri, zerdeçalın primer piroliz ürünleri 4-(4-hidroksi-3-metoksi)fenil-3-buten-2-on ve 4-(4-hidroksi-3-metoksi)fenil-3-butanon'un pikleri, indigonun primer piroliz ürünleri indol, 2-metilindol ve 2.3-dihidroindol-2-on'un pikleri ve diğerleri elde edilmiştir. Katı formda çalışılan bu dört boya örneğinin tanımlanması için gereken prosedür rapor edilmiştir.

S. M. Halpine yaptığı çalışma [25] sonucunda organik renklendiricilerin geniş bir alanda karakterizasyonu için yeni bir analitik yöntem tasarlamıştır. Bu çalışmada dizi diyod dedektörle donatılmış HPLC kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılarak kalın örme duvar halısından (Ulusal Sanat Galerisi, Washington DC) alınan ipliğin boya ekstraktının ve Winslow Homer'e ait suluboya kutusundan (Portland Sanat Müzesi) alınan lake pigmentlerinin analizi bu teknikle başarılı bir şekilde yapılmıştır. Koşnil ve indigo doğal boyaları her iki örnekte de belirlenmiştir. Suluboyanın içinde renk pigmenti olarak hind zamkı, duvar halısında da muhabbet çiçeği ile birlikte en az iki çeşit kökboya boyarmaddesi tanımlanmıştır.

I. Karapanagiotis ve diğ. çalışmalarında [26] dizi diyod dedektörle donatılmış HPLC kullanarak Bizans sonrası ikonlardaki kırmızı doğal boyaların tanımlamasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada ilk olarak dizi diyod dedektörle donatılmış HPLC kullanılarak 5 ayrı kırmızı doğal boya olan koşnil, kökboya, lak boya, ejder kanı ve kızılağaç örneklerinin ayrılması ve tanımlanması, ardından orijinal beş Bizans sonrası ikon ekstraktına uygulanan yöntem sonucunda organik boyaların tanımlanması yapılmıştır. Dört ikon örneğinde koşnil doğal boyasının etken renklendiricisi karminik asit, bir ikon örneğinde ise kızılağaç doğal boyası belirlenmiştir.

I. Surowiec ve diğ. çalışmalarında [27] floresans dedektör ile donatılmış HPLC ve dizi diyod dedektör ile donatılmış HPLC kullanarak arkeolojik koptik tekstillerinin doğal boyarmadde analizi ve yöntemlerin karşılaştırılmasını gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak yapılan deneme sonucunda en iyi ayırmayı sağlayan pH 2.5'ta 25mM fosforik asit tamponu ile gradient olarak değişen konsantrasyonlarda metanol kullanılmıştır. Bitkisel özüt ve koptik tekstil ekstraktlarının araştırılmasında, yaptıkları deneme sonucunda kolon sonrası türevlendirme reaktifi olarak en yüksek artışta floresans sinyali gösteren Ga(III) iyonu seçilmiştir.

R. D. Gillard ve diğ. çalışmalarında [28], kazıdan çıkarılan tekstil örneği üzerindeki boya kalıntısının tanımlama analizini FTIR mikroskopi yöntemi uygulayarak yapmışlardır. Örnek hazırlanışı çok küçük işlemler gerektirmekle beraber yararlı sinyalin alınabilmesi için tek bir lif örneği yeterli bulunmuştur. Yöntem hızlıdır ve toprak altındaki örnek kontaminasyonundan kaynaklanan infrared sinyal maskeleyişinden ötürü oluşan problemler de önlenmektedir.

P. Guinot ve diğ. çalışmalarında [29] yaygınca kullanılan 43 çeşit boya bitkisinin renklendirme özelliklerini araştırmışlardır. Kumaşların üzerindeki renklerin başlıca sarı destekli ve doymamış olduğu kolorimetrik analiz sonucu gösterilmiştir. Fotokimyasal analiz sonucunda sarı-turuncu renklerin flavonoidlerden, kırmızı renklerin ise antrakinonlardan ileri geldiği belirtilmiştir. Antosiyanin türlerini içeren bitkilerden gelen renkler mavi-viyolede kırmızıya kadar sadece bitki içindeki antosiyanin yapılarından ileri gelmektedir.

P. C. Crews çalışmasında [1] seçilmiş doğal boyaların solma hız eğrilerini, tristimulus kolorimetre kullanarak renk farkları ölçümüyle ortaya koymuştur. Eğrilerin incelenmesi sonucunda çoğu doğal boyanın solması hızlıca başlar ve bunu takiben yavaşlayan hızda solma işlemi devam eder. Müze tekstilleri için bulunan sonuçlar tartışılmıştır.

I. Joosten ve diğ. çalışmalarında [30] tarihi Hallstatt tekstillerinin renk ve şekil tanımlaması için mikro analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada boyarmaddelerin analizi foto dizi diyod dedektör ile donatılmış HPLC kullanılmış, mordan analizi için ise tarama elektron mikroskopisi (SEM) ile birlikte enerji ayırıcı X-ray (EDS) spektroskopisi uygulanmıştır. Analiz sonucunda tüm tekstillerin bitkisel ve böcek bazlı boyalarla boyandığı belirlenmiştir. Sarı bitki boyası ve kırmızı böcek boyası mordan boyalardır ama mordanların ayrıca belirlenmesi zordur. Lifin kontamine olmamış küçük bir kısmına uygulanan SEM/EDS analizi sonucunda alüminyum, demir ve bakır elementlerinin çoğu örnekte bulunduğu belirlenmiştir. Bu elementler boyamada mordan olarak kullanılmaktadır.

Domenech-Carbo ve diğ. çalışmalarında [31] doğal boyalardan zerdeçal ve yalancı safranın elektrokimyasal belirlemelerinin sanatsal çalışmalar ve arkeolojik sanat eserlerinin mikro kimyasal araştırmaları için yararlı olduğunu söylemiş ve bu analizi de katı hal voltametri işlemleriyle gerçekleştirmişlerdir. Boyaların mikro analizi için kullanılan voltametri işleminde ise elektrod olarak parafin emdirilmiş grafit elektrod kullanmışlardır. Zerdeçal ve yalancı safran için iyi tanımlanan voltametrik kare dalga cevaplarıyla birlikte potansiyel alanda iyi tanımlanan oksidasyon pikleri, her iki boyanın mikro örneklerinin kesin bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında AX200 SHIMATZU markalı hassas terazi, hazırlanan çözeltilerin karşılaştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, inkübasyon işlemi için IKA HB4 basic su banyosu, Varian Cary 1E model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, Perkin Elmer HPLC cihazı: Perkin Elmer Series 200 pompa, Perkin Elmer Series 200 UV/Vis dedektör, enjeksiyon valfi (Model 7725i, Rheodyne, USA), Hamilton Hx Sil C18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5µm), Hamilton (Reno, NV, USA) marka 25 µL şırınga kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), amonyum asetat, etil alkol (%96), sodyum hidroksit, hidroklorik asit, fosforik asit, alüminyum klorür heksahidrat, potasyum asetat, metil alkol, kuersetin, rutin, morin, fisetin, kateşin, ellagik asit, apigenin, luteolin, mirisetin, kaemferol, alizarin, purpurin, karminik asit ve kurkumindir.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Kuersetin, rutin, morin, fisetin, kateşin, ellagik asit, mirisetin, kaemferol, alizarin, kurkumin stok çözeltileri etanolde; luteolin stok çözeltisi etanol ve metanol karışımında, apigenin (bazik ortamda çözüldüğünden) stok çözeltisi KOH ve etanol karışımında; karminik asit stok çözeltisi distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Cu(II) klorür çözeltisi, 10^{-2} M olacak şekilde bakır(II)klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M (pH=7) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde

(2,9-dimetil-1,10-fenantrolin)'den 0.039 g tartım alınıp %96'lık etil alkolle 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

AlCl_3 çözeltisi, %10'luk olacak şekilde alüminyum klorür heksahidrat'tan ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 9.06 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Potasyum asetat tamponu, 1 M olacak şekilde KAc'den 4.90 g tartım alınıp su ile 50mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.3. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.3.1. CUPRAC Yöntemi (Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite tayini)

CUPRAC yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan 1'er mL eklendi. Üzerine x mL örnek ilave edilip çalkalandı ve son hacim 4.1 mL olacak şekilde (1.1-x) mL su eklendikten sonra iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplandı.

$$1 \text{ mL Cu(II)} + 1 \text{ mL Nc} + 1 \text{ mL NH}_4\text{Ac} + x \text{ mL örnek} + (1.1-x) \text{ mL su} \quad (3.1)$$

$$V_{\text{toplam}}: 4.1 \text{ mL}$$

3.3.2. AlCl_3 /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre; bir cam tüp içerisine sırasıyla 1.5 mL etanol çözeltisi, x mL örnek çözeltisi, 0.1 mL %10'luk AlCl_3 çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc çözeltisi ilave edilip çalkalandı ve son hacim 5 mL olacak şekilde (3.3-x) mL su eklendikten sonra tekrar iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı 427 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans ile referans olarak alınan bir flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplandı.

$$1.5 \text{ mL EtOH} + x \text{ mL örnek} + 0.1 \text{ mL \%10 AlCl}_3 + 0.1 \text{ mL KAc} + (3.3-x) \text{ mL su} \quad (3.2)$$

$$V_{\text{toplam}}: 5 \text{ mL}$$

3.3.3. HPLC Analizi

Polifenolik bileşiklerin analizi için kullanılan HPLC yönteminde;

Metanol (A) ve %2 *o*-H₃PO₄ içeren bidistile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulandı. Bunun için 280 nm’de pik dedeksiyonuyla ve 1 mL/dakika akış hızıyla;

8 dakika %7 (A), eğim (0.0); 8-13 dakika %30 (A), eğim (-4.0); 13-48 dakika %66 (A), eğim (1.0); 48-55 dakika %75 (A), eğim (-4.0), 55-65 dakika %100 (A), eğim (1.0) gradient elüsyon kullanıldı.

Bu elüsyon yöntemi ile,

Kurkumin, karminik asit, alizarin için $4 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$ M derişim aralığında çalışılarak kalibrasyon doğruları oluşturuldu.

Hazırlanan doğal boya özütleri bu yöntem yardımı ile analizlendi; kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri yapıldı.

Çalışmada her enjeksiyon işlemi öncesinde 10 dakika metanol ile kolonu yıkama işlemi gerçekleştirildi.

3.4. DOĞAL BOYA ÖZÜTLERİNİN HAZIRLANMASI

Doğal boya örneklerinden alınan 1 gramlık kısım üzerine 100 mL %50 Metanol-Su karışımı eklendi ve ısıtıcı üzerinde geri soğutucu eşliğinde 80 °C sıcaklıkta yarım saat ekstraksiyon işlemi uygulandı. Yarım saat sonunda alınan örnekler adi süzgeç kağıdı ardından membran filtrelerden geçirilerek doğal boya özütü elde edildi. Elde edilen örneklere sırayla CUPRAC ve AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri ve HPLC yöntemi uygulandı.

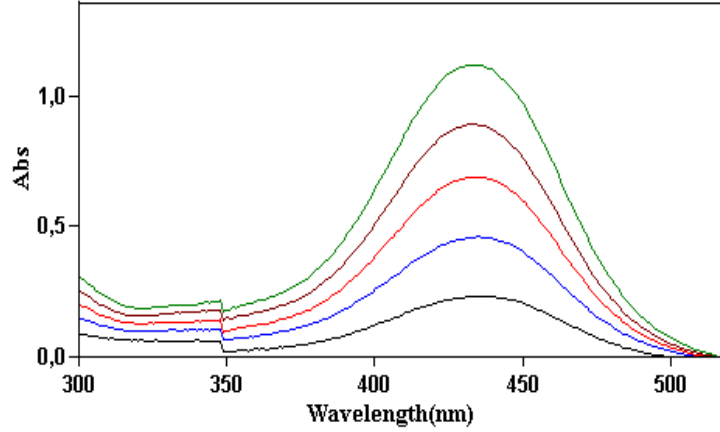
4. BULGULAR

4.1. AlCl₃/POTASYUM ASETAT SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMİNİN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ

4.1.1. AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yönteminin Uygulanması ve Optimum Deneş Koşullarının Belirlenmesi

Deneşsel çalışmaların ilk adımında kullanılacak olan AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla bir dizi uygulama yapıldı. Bunlar sırasıyla inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi, inkübasyon süresinin belirlenmesi, pH çalışması ve değişik seyrelme oranlarındaki sonuçların lineerliğinin incelenmesi olarak belirlendi.

Yöntemde sonuçlar kuersetin referans alınarak inceleneceğinden kuersetinin değişik konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltilerinden alınarak yapılan deneme sonucunda Şekil 4.1'deki spektrumda görüldüğü gibi maksimum absorpsiyon elde edilen dalgaboyu literatürde bulunan 415 nm yerine 427 nm olarak belirlendi. (Kuersetin için bulunan optimal dalgaboyunun literatürde verilenden farklı olması, olasılıkla kuersetinde A ve C halkaları üzerinde bulunan kelatlayıcı (örneğin, 5-hidroksi-4-keto) gruplar dışında B halkasındaki 3',4'-kateşol gruplarının da Al(III) bağlanmasına katılmasından kaynaklanmaktadır).



Şekil 4.1: Çeşitli konsantrasyonlarda kueretin (QR) varlığında oluşan Al(III)-kueretin kompleksinin görünür bölge spektrumu

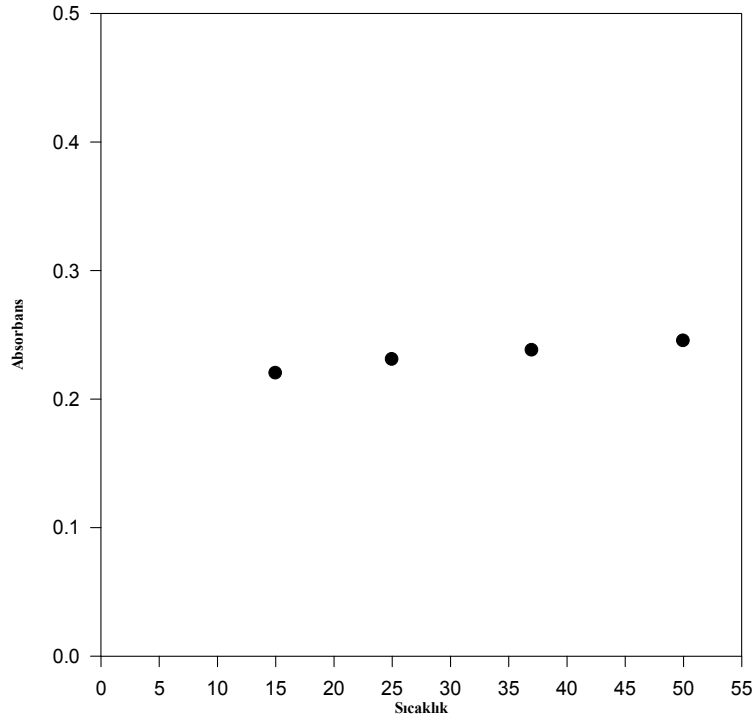
Yöntemin uygulaması şu şekilde yapıldı; x mL alınan örnek üzerine sırasıyla 1.5 mL EtOH, 0.1 mL %10'luk AlCl_3 çözeltisi, 0.1 mL 1 M KAc ve (3.3-x) mL su ekleme işlemiyle toplam hacim 5 mL olacak şekilde tamamlandı ve 30 dakika oda şartlarında inkübasyon sonrasında örnek içermeyen referansa karşı okuma yapıldı. Yöntem yukarıda anlatıldığı gibi kueretin maksimum absorbans verdiği 427 nm dalgaboyunda uygulandı.

Yöntemin optimum çalışma şartlarının belirlenmesinde ilk olarak inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi çalışması yapıldı. Bunun içinde 10^{-3} M kueretin çözeltisinden 50 μL alınarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulandı ve 15, 25, 37 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübasyon işlemi uygulandı. Sonuçlar Şekil 4.2'de özetlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde absorbansın değişik sıcaklıklarda çok büyük bir değişime uğramadığı görülmüştür. Bu nedenle de daha önceden literatürde belirlenen oda sıcaklığında inkübasyon uygulanması uygun görüldü.

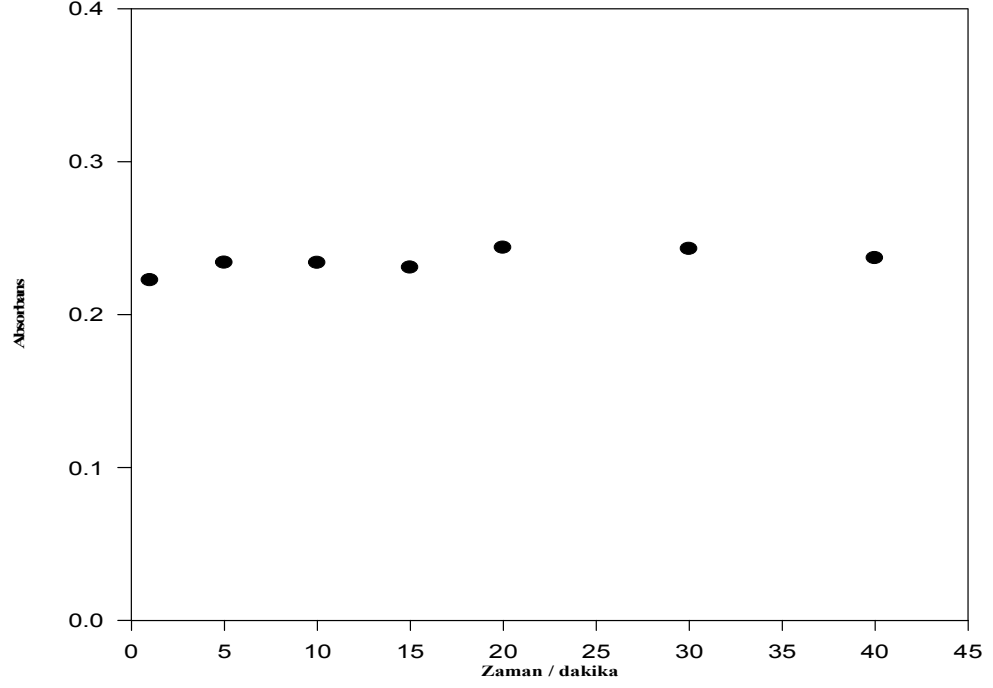
Optimum çalışma şartlarının belirlenmesinde ikinci aşama olarak inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 10^{-3} M kueretin çözeltisinden 50 μL alınarak AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi uygulandı ve değişik inkübasyon sürelerinde oda şartlarında bekletilen çözeltilerin absorbans ölçümleri yapılarak Şekil 4.3'te özetlendi. Sonuçlar incelendiğinde 20 dakikalık süreden sonra absorbansın hemen hemen aynı kaldığı görülmüştür. Sonuçta inkübasyon süresinin daha önceden literatürden belirlendiği gibi 30 dakika olması uygun görüldü.

İnkübasyon sıcaklığı ve süresi belirlendikten sonra pH denemesi yapıldı. Bu denemede yöntemde yer alan potasyum asetat tamponu yerine değişik pH tamponları kullanıldı. 10^{-3} M kuersetin çözeltisinden tüplere 0.1'er mL eklendikten sonra yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.4'te özetlenmiştir ve en yüksek absorbans nötral pH aralığında görülmüştür. Yöntem flavonoid ile Al(III) arasında kelat kompleksi oluşumuna dayandığından bağ oluşumu öncesi flavonoid bileşiğinin uygun fenolik protonunun verilmesi nötral pH'da güvenceye alınır. Bu nedenle yöntemin nötral pH'da uygulanması uygun görüldü.

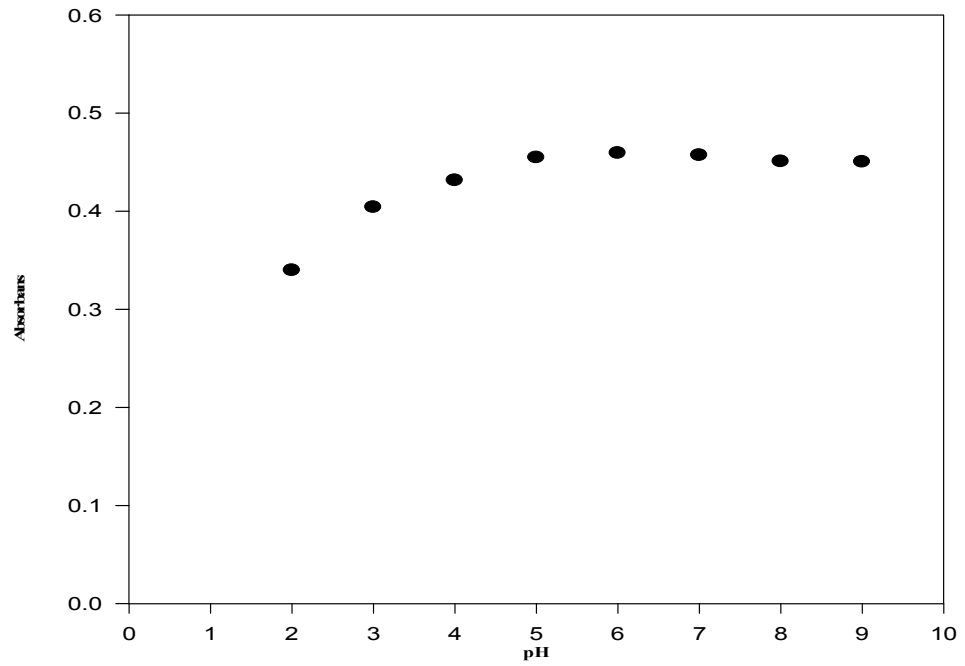
Yöntemin optimum çalışma şartları belirlendikten sonra sıra değişik seyrelme oranlarındaki sonuçların lineerliğinin incelenmesi çalışmasına geldi. 10^{-3} M kuersetin çözeltisinin değişik oranlarda seyreltilmiş çözeltilerine uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları Şekil 4.5'te özetlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde değişik seyrelme oranlarında düşük konsantrasyondan yüksek konsantrasyona doğru gidildikçe absorbansın lineer bir şekilde arttığı görülmüştür.



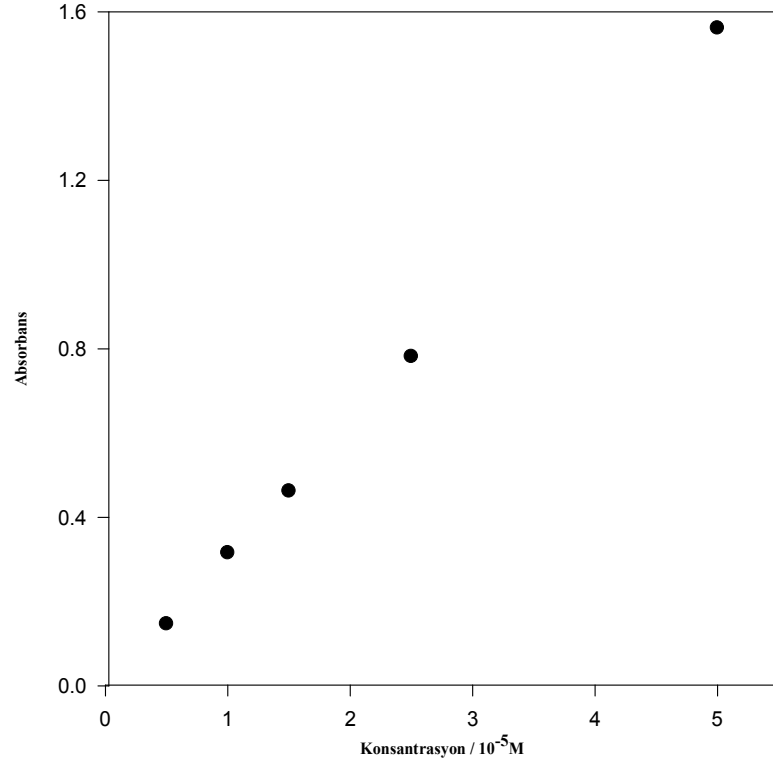
Şekil 4.2: 10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sıcaklıklarında uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları



Şekil 4.3: 10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik inkübasyon sürelerinde uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları



Şekil 4.4: 2×10^{-5} M kuersetin çözeltisine değişik pH'larda uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları



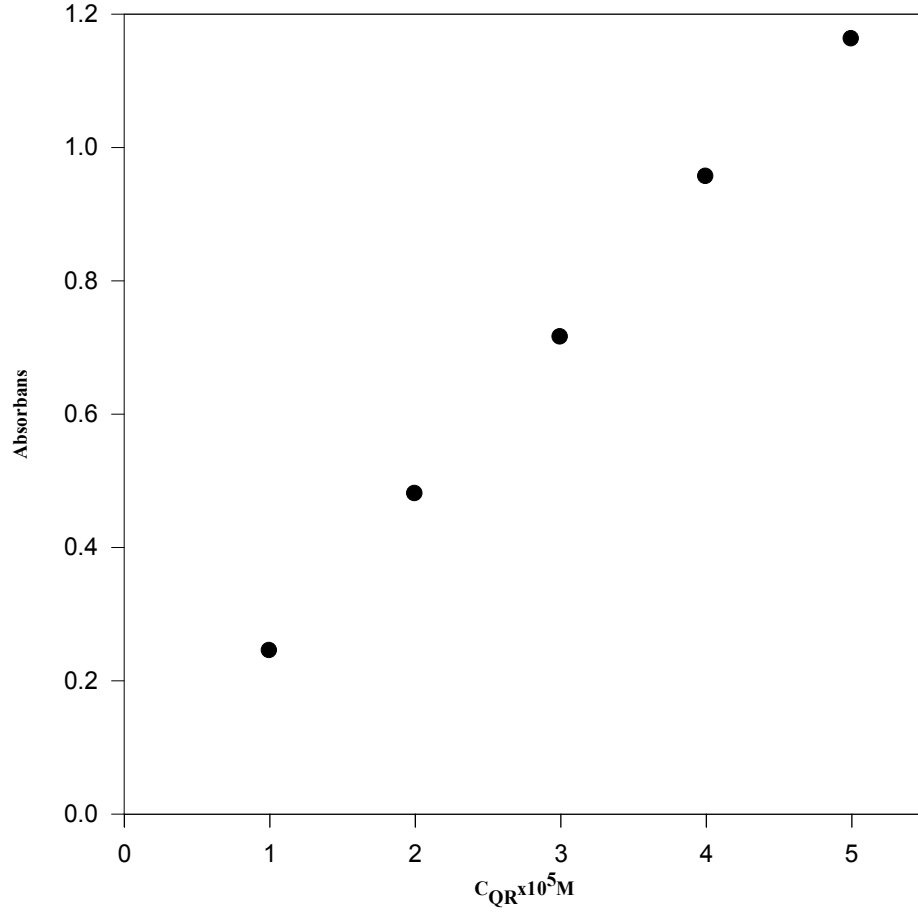
Şekil 4.5: Kueretin çözeltisinin değişik oranlarda seyreltilmesiyle ele geçen çözeltilere uygulanan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin sonuçları

4.1.2. Bazı Fenoliklerin $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.1.2.1. Kuersetin

Tablo 4.1: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (x: molar konsantrasyon ve y: absorbans)

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.2448
2×10^{-5}	0.4803
3×10^{-5}	0.7153
4×10^{-5}	0.9562
5×10^{-5}	1.1627
Doğru Denklemi : $y = 23117 x + 0.018$ $r = 0.999$	

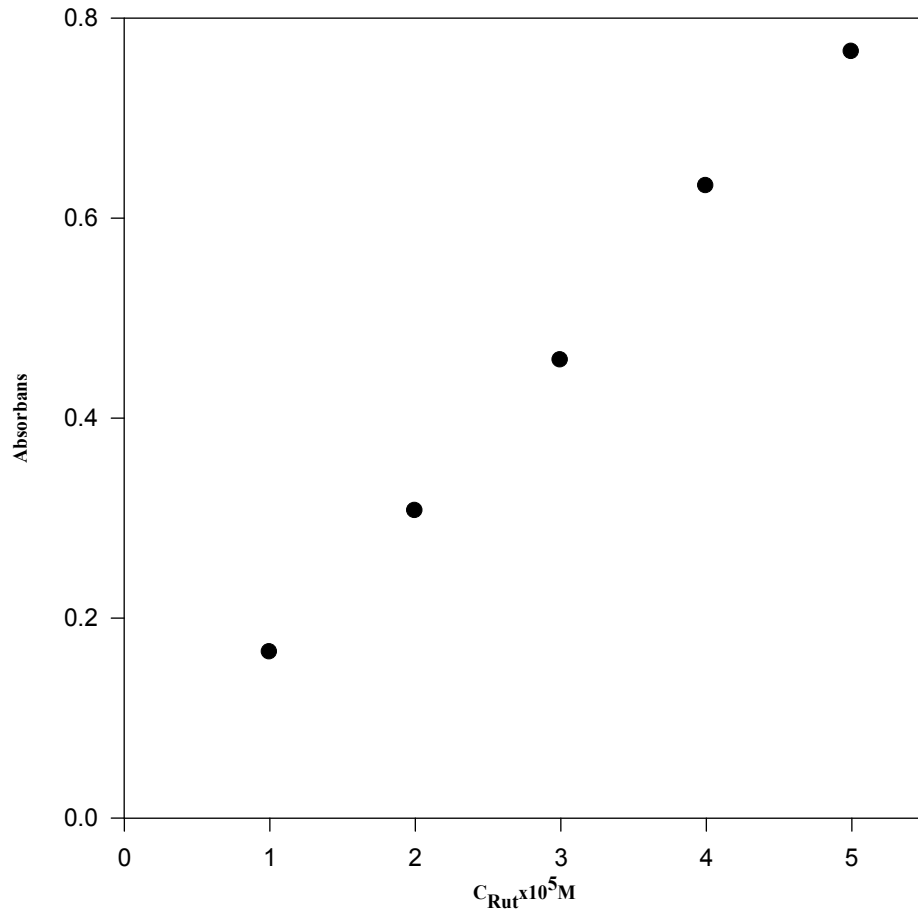


Şekil 4.6: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.2. Rutin

Tablo 4.2: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.1658
2×10^{-5}	0.3072
3×10^{-5}	0.4578
4×10^{-5}	0.6321
5×10^{-5}	0.7665
Doğru Denklemi : $y = 15263 x + 0.007$ $r = 0.999$	

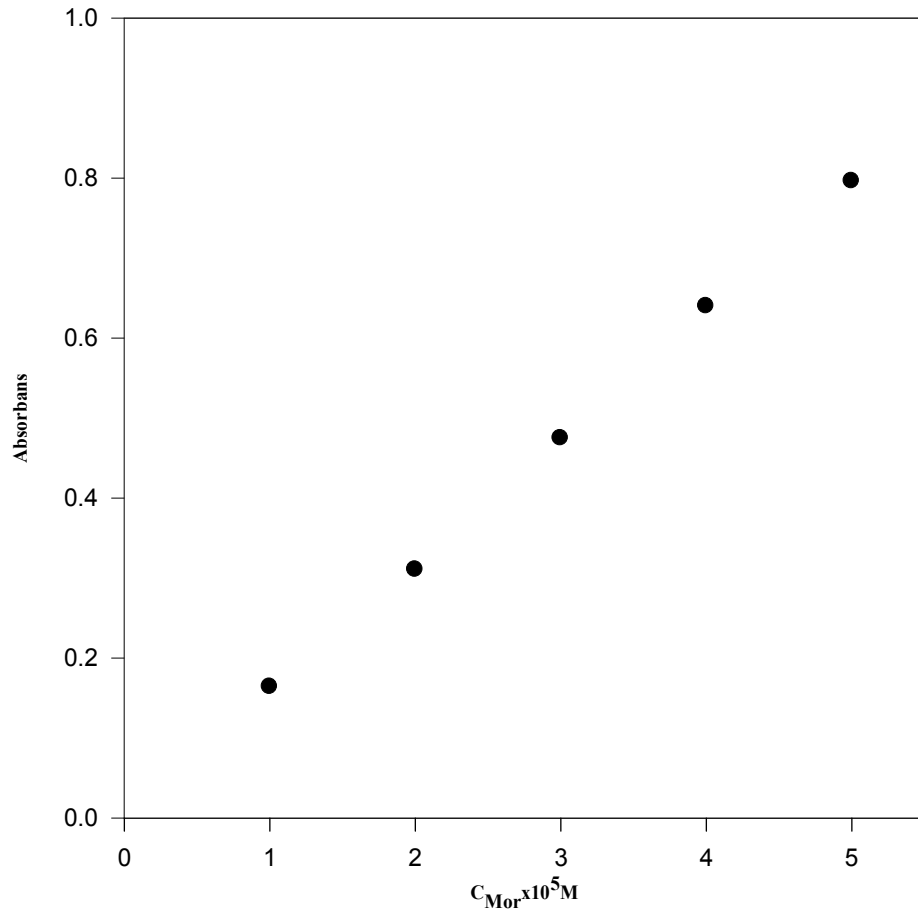


Şekil 4.7: Rutinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.3. Morin

Tablo 4.3: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.1642
2×10^{-5}	0.3108
3×10^{-5}	0.4750
4×10^{-5}	0.6401
5×10^{-5}	0.7964
Doğru Denklemi : $y = 15937x - 0.0008$ $r = 0.999$	

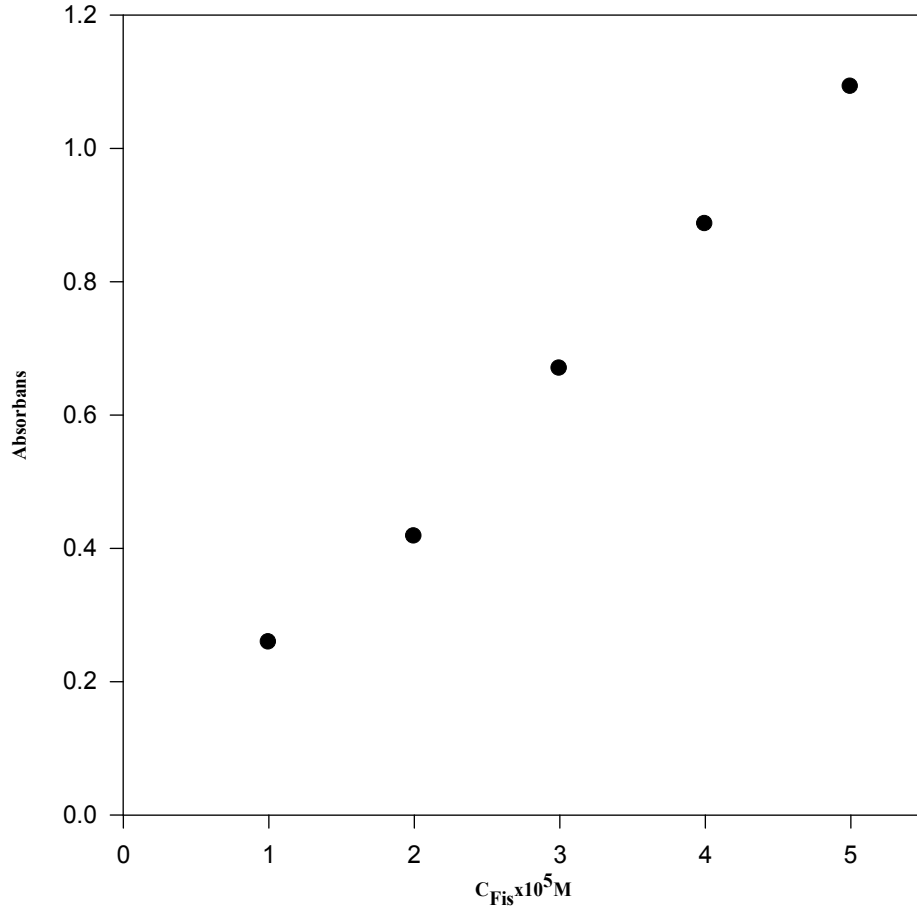


Şekil 4.8: Morinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.4. Fisetin

Tablo 4.4: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.2592
2×10^{-5}	0.4180
3×10^{-5}	0.6697
4×10^{-5}	0.8866
5×10^{-5}	1.0928
Doğru Denklemi : $y = 21358 x + 0.024$ $r= 0.998$	

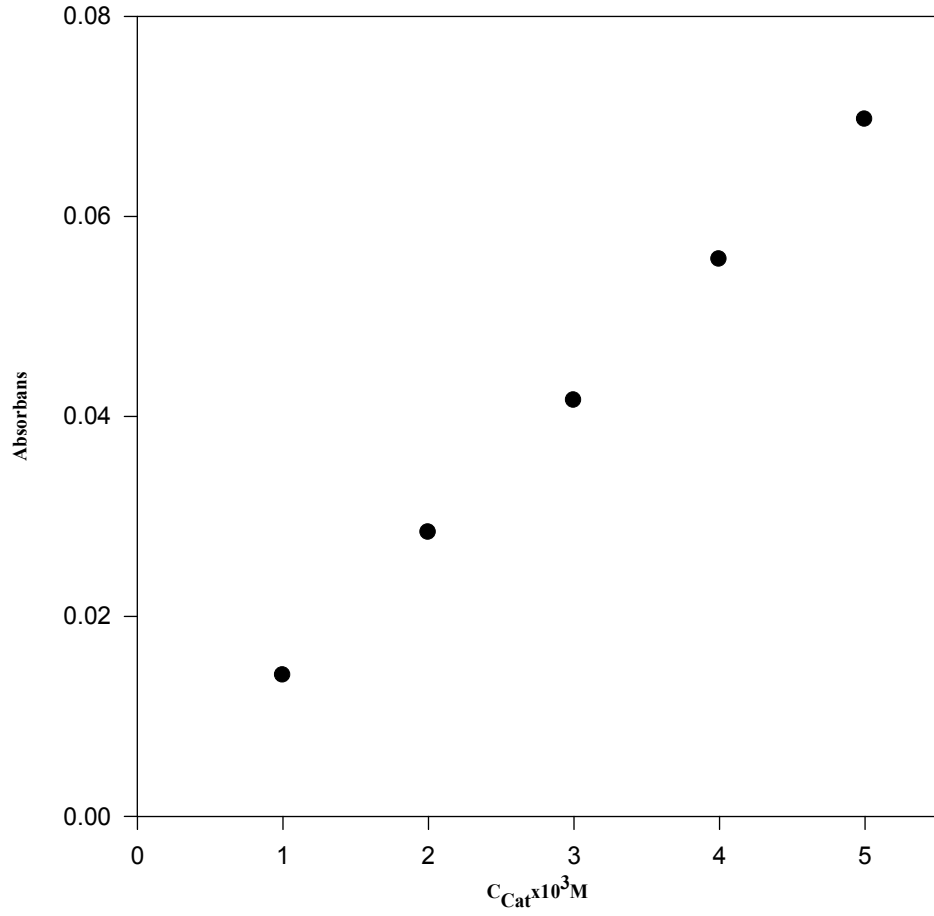


Şekil 4.9: Fisetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.5. Kateşin

Tablo 4.5: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemini

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-3}	0.0141
2×10^{-3}	0.0284
3×10^{-3}	0.0416
4×10^{-3}	0.0557
5×10^{-3}	0.0897
Doğru Denklemi : $y = 13.09 x + 0.001$ $r = 0.999$	

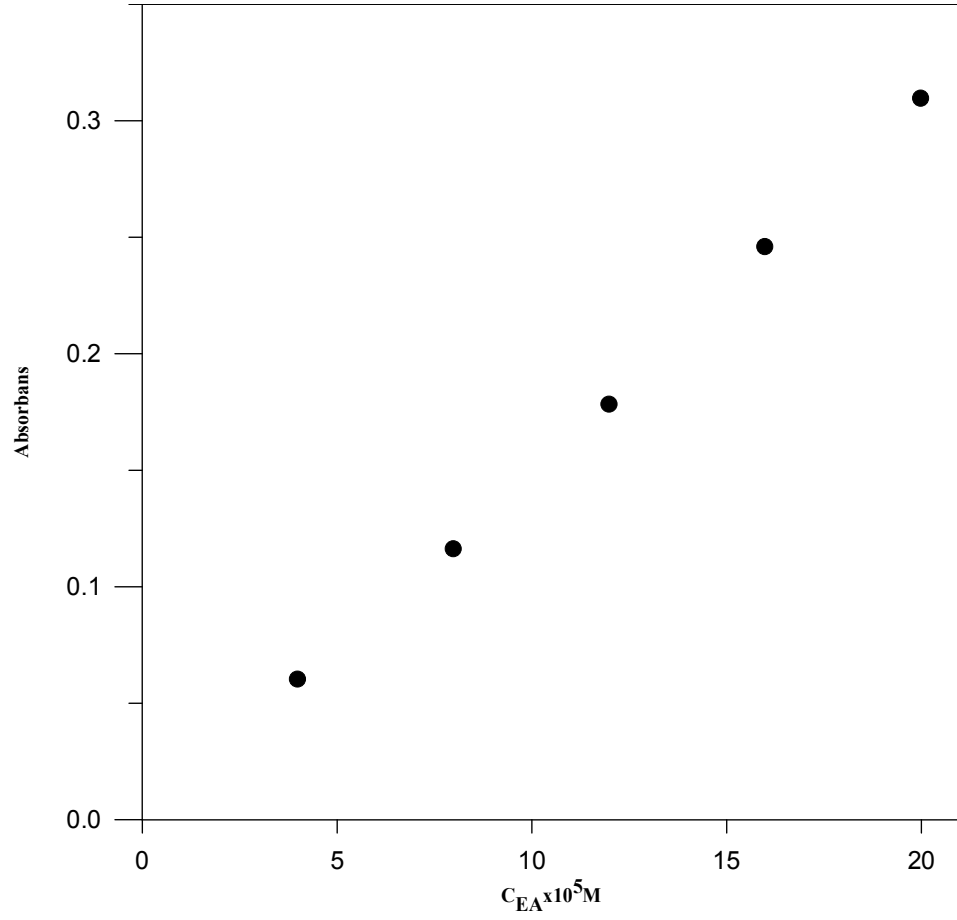


Şekil 4.10: Kateşinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.6. Ellagik asit:

Tablo 4.6: Ellagik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.0600
2×10^{-5}	0.1160
3×10^{-5}	0.1780
4×10^{-5}	0.2457
5×10^{-5}	0.3094
Doğru Denklemi : $y = 1571.2 x - 0.006$ $r=0.999$	

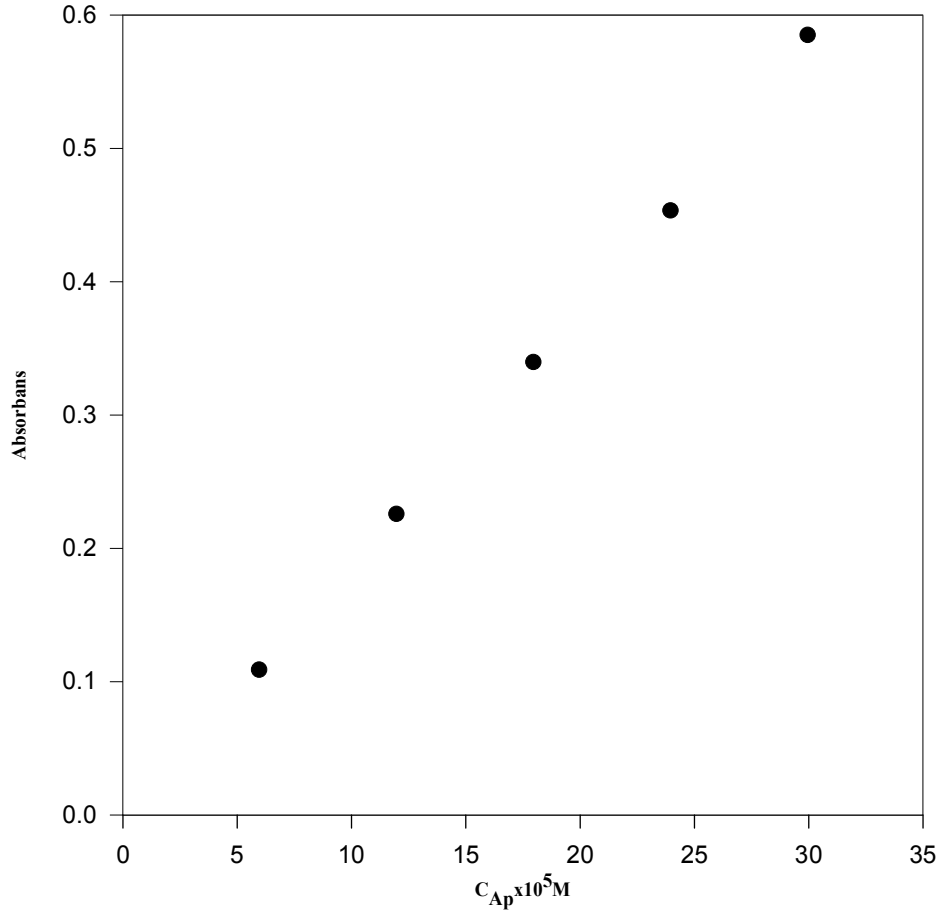


Şekil 4.11: Ellagik asitin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.7. Apigenin

Tablo 4.7: Apigeninin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
6×10^{-5}	0.1084
12×10^{-5}	0.2252
18×10^{-5}	0.3391
24×10^{-5}	0.4528
30×10^{-5}	0.5845
Doğru Denklemi : $y = 1966.3 x - 0.0119$ $r = 0.999$	

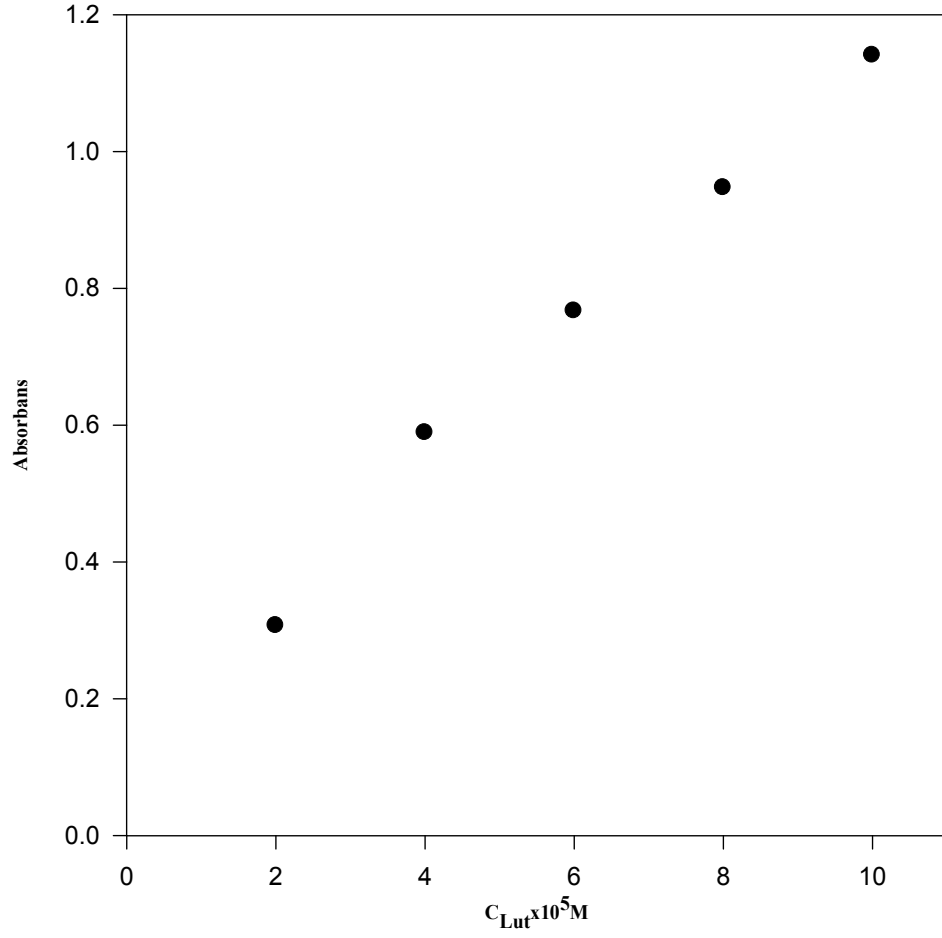


Şekil 4.12: Apigeninin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.8. Luteolin

Tablo 4.8: Luteolinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2×10^{-5}	0.2209
4×10^{-5}	0.4221
6×10^{-5}	0.6288
8×10^{-5}	0.7850
10×10^{-5}	1.0080
Doğru Denklemi : $y = 10130 x + 0.1425$ $r = 0.995$	

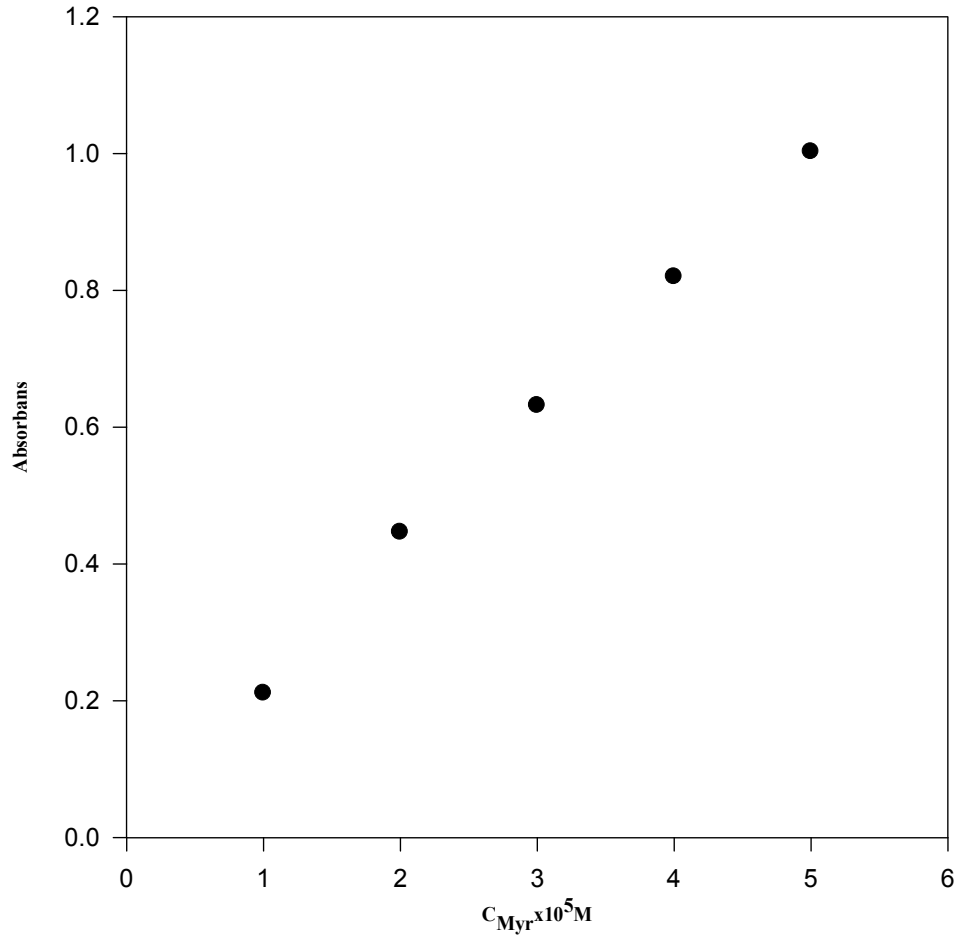


Şekil 4.13: Luteolinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.9. Mirisetin

Tablo 4.9: Mirisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-5}	0.2111
9.75×10^{-5}	0.4466
14.63×10^{-5}	0.6317
19.51×10^{-5}	0.8200
24.39×10^{-5}	1.0028
Doğru Denklemi : $y = 19568 x + 0.0354$ $r = 0.998$	

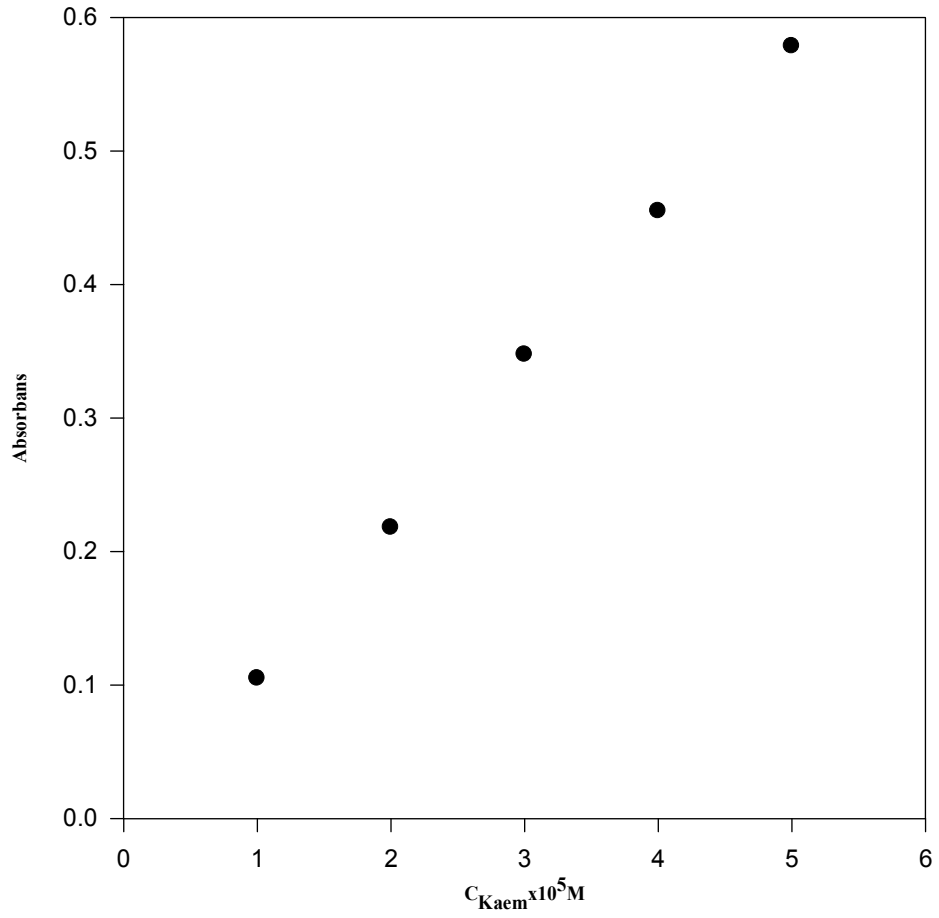


Şekil 4.14: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.10. Kaemferol

Tablo 4.10: Kaemferolün hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1×10^{-5}	0.1051
2×10^{-5}	0.2181
3×10^{-5}	0.3476
4×10^{-5}	0.4551
5×10^{-5}	0.5786
Doğru Denklemi : $y = 11840 x + 0.0143$ $r = 0.999$	

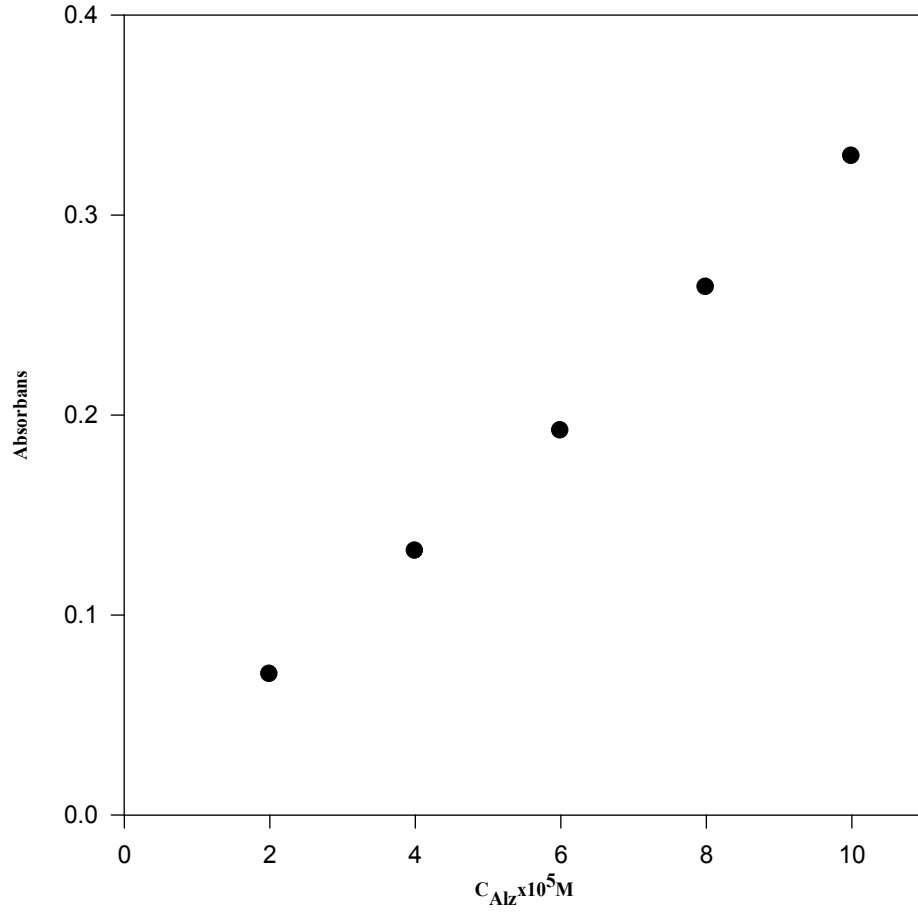


Şekil 4.15: Kaemferolün kalibrasyon eğrisi

4.1.2.11. Alizarin

Tablo 4.11: Alizarinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2×10^{-5}	0.0704
4×10^{-5}	0.1320
6×10^{-5}	0.1922
8×10^{-5}	0.2639
10×10^{-5}	0.3295
Doğru Denklemi : $y = 3250.5 x + 0.002$ $r = 0.999$	

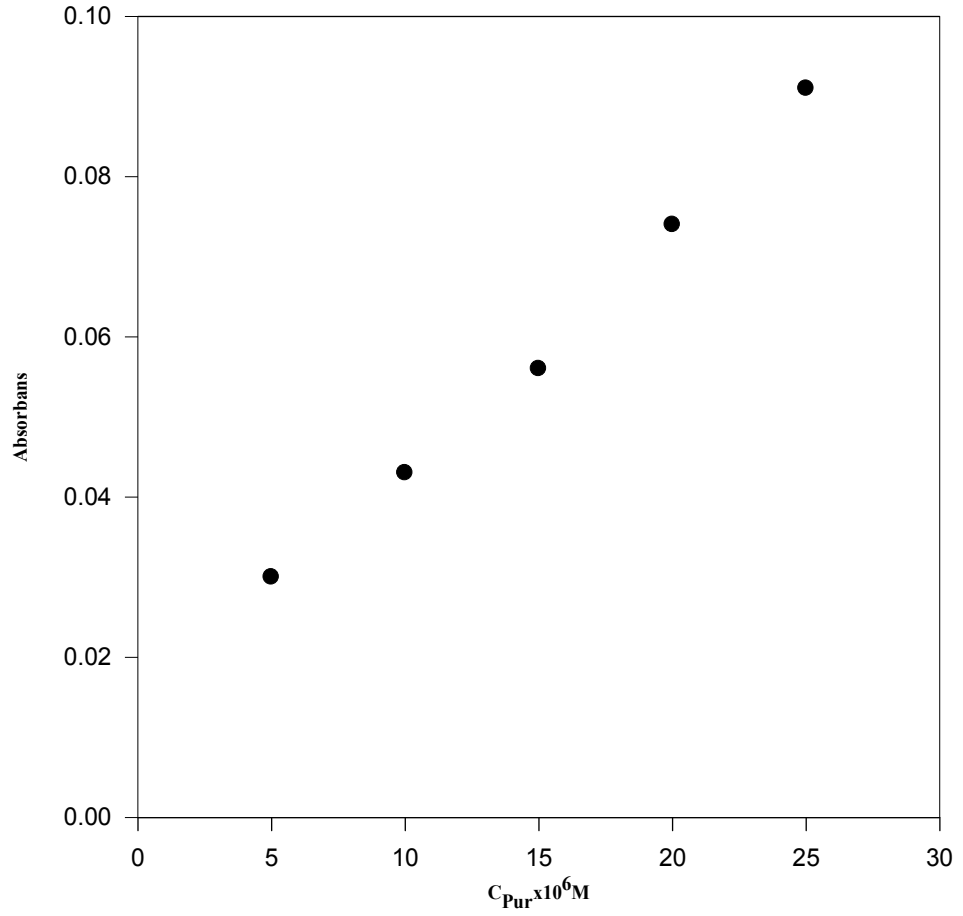


Şekil 4.16: Alizarinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.12. Purpurin

Tablo 4.12: Purpurinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
5×10^{-5}	0.1212
10×10^{-5}	0.2519
15×10^{-5}	0.3780
20×10^{-5}	0.5147
25×10^{-5}	1.6529
Doğru Denklemi : $y = 2652.4 x - 0.0141$ $r = 0.999$	

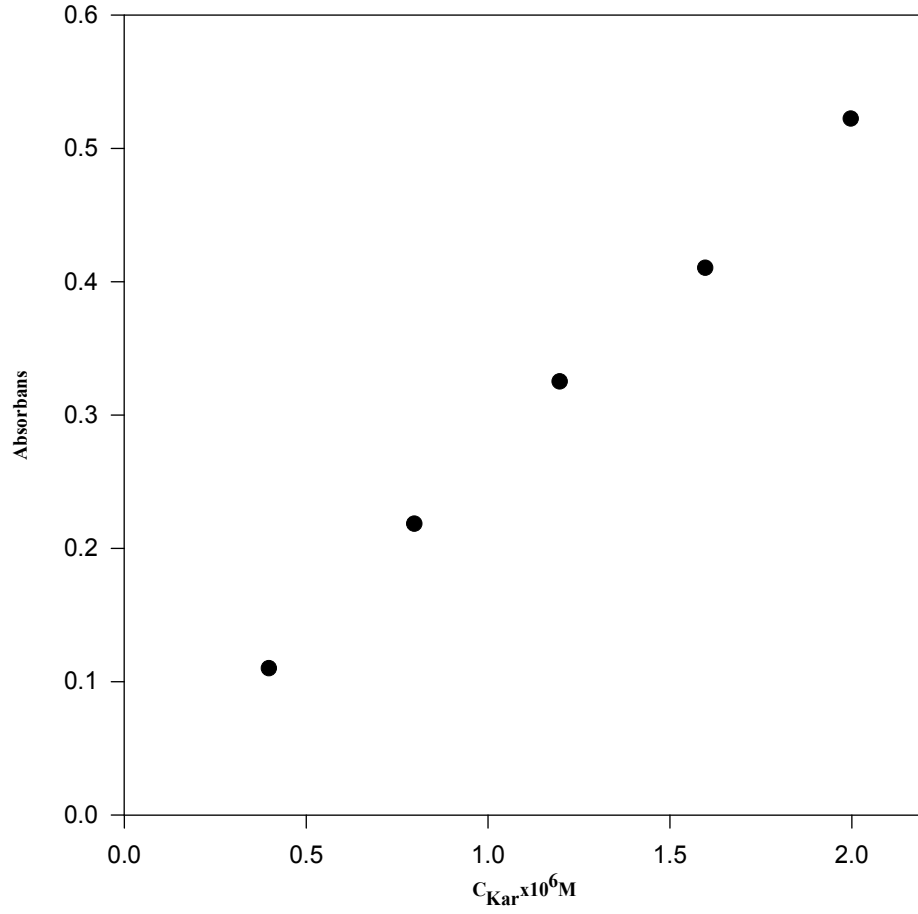


Şekil 4.17: Purpurinin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.13. Karminik asit

Tablo 4.13: Karminik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4×10^{-5}	0.1095
8×10^{-5}	0.2179
12×10^{-5}	0.3246
16×10^{-5}	0.4098
20×10^{-5}	0.5217
Doğru Denklemi : $y = 2540.7 x + 0.0118$ $r = 0.999$	

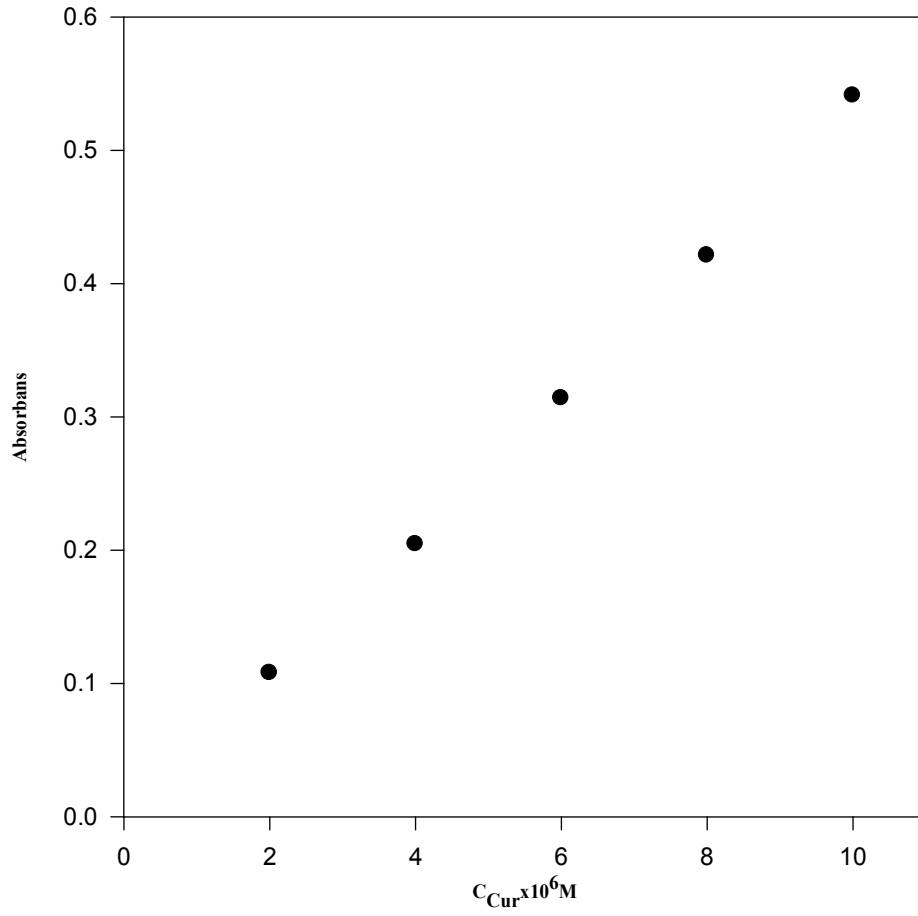


Şekil 4.18: Karminik asitin kalibrasyon eğrisi

4.1.2.14. Kurkumin

Tablo 4.14: Kurkuminin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2×10^{-6}	0.1080
4×10^{-6}	0.2047
6×10^{-6}	0.3142
8×10^{-6}	0.4213
10×10^{-6}	0.5413
Doğru Denklemi : $y = 54160 x - 0.00706$ $r = 0.999$	



Şekil 4.19: Kurkuminin kalibrasyon eğrisi

4.1.3. Fenolik Bileşiklerin AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi ile Elde Edilen Molar Absorblama Katsayıları, Lineer Aralıkları ve QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin molar absorblama katsayıları (ϵ) AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Çeşitli flavonoidlerin AlCl₃/potasyum asetat yöntemine göre doğru denklemleri, molar absorbtiviteleri ve QREFC (kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu) değerleri

Flavonoid	Doğru Denklemi	ϵ (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹)	Lineer Aralık (M)	QREFC
Kuersetin	$y=2.31 \times 10^4 x + 0.018$ $r = 0.999$	2.31×10^4	$1.38 \times 10^{-6} - 5.54 \times 10^{-5}$	1.00
Rutin	$y=1.52 \times 10^4 x + 0.007$ $r = 0.999$	1.52×10^4	$2.81 \times 10^{-6} - 8.47 \times 10^{-5}$	0.66
Morin	$y=1.59 \times 10^4 x - 0.008$ $r = 0.999$	1.59×10^4	$3.63 \times 10^{-6} - 8.2 \times 10^{-5}$	0.69
Fisetin	$y=2.14 \times 10^4 x + 0.024$ $r = 0.998$	2.14×10^4	$1.21 \times 10^{-6} - 5.97 \times 10^{-5}$	0.93
Kateşin	$y=1.31 \times 10^1 x + 0.001$ $r = 0.999$	1.31×10^1	$3.74 \times 10^{-3} - 9.92 \times 10^{-2}$	0.0005
Ellagik asit	$y=1.57 \times 10^3 x - 0.006$ $r = 0.999$	1.57×10^3	$3.56 \times 10^{-5} - 8.31 \times 10^{-4}$	0.07
Apigenin	$y=1.97 \times 10^3 x - 0.012$ $r = 0.999$	1.97×10^3	$3.14 \times 10^{-5} - 6.67 \times 10^{-4}$	0.08
Luteolin	$y=1.01 \times 10^4 x + 0.142$ $r = 0.995$	1.01×10^4	$7.27 \times 10^{-7} - 1.12 \times 10^{-4}$	0.44
Mirisetin	$y=1.96 \times 10^4 x + 0.035$ $r = 0.998$	1.96×10^4	$7.46 \times 10^{-7} - 6.46 \times 10^{-5}$	0.85
Kaemferol	$y=1.18 \times 10^4 x - 0.0143$ $r = 0.999$	1.18×10^4	$5.43 \times 10^{-6} - 1.11 \times 10^{-4}$	0.51
Alizarin	$y=3.25 \times 10^3 x - 0.002$ $r = 0.999$	3.25×10^3	$1.59 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-4}$	0.14
Purpurin	$y=2.65 \times 10^3 x - 0.0141$ $r = 0.999$	2.65×10^3	$2.41 \times 10^{-5} - 4.95 \times 10^{-4}$	0.11
Karminik asit	$y=2.54 \times 10^3 x + 0.0118$ $r = 0.999$	2.54×10^3	$1.50 \times 10^{-5} - 5.07 \times 10^{-4}$	0.11
Kurkumin	$y=5.42 \times 10^4 x - 0.00706$ $r = 0.999$	5.42×10^4	$1.05 \times 10^{-6} - 2.41 \times 10^{-5}$	2.34

4.1.4. Dörtlü Sentetik Karışımların Elde Edilmesi ve AlCl₃/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi Uygulanarak Beklenen ve Ölçülen QREFC Değerlerinin Eldesi

Belirli konsantrasyonlarda hazırlanan fenolik bileşikler için farklı kombinasyonlarda dörtlü karışımlar oluşturulup AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre mM kuersetin(QR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasiteleri 4.2 ve 4.3. denklemleri kullanılarak hesaplandı ve değerler birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.16).

$$\text{Beklenen Kapasite} = \text{QREFC}_1 \cdot C_1 + \text{QREFC}_2 \cdot C_2 + \text{QREFC}_3 \cdot C_3 + \text{QREFC}_4 \cdot C_4 \quad (4.2)$$

Absorbans (toplam) \pm kayım

$$\text{Gözlenen Kapasite} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{\text{kuersetin}}} \times 10^3 \quad (4.3)$$

Tablo 4.16: Sentetik karışım çözeltilerinin AlCl₃/Potasyum asetat yöntemine göre mM Kuersetin(QR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması

Karışımın İçeriği	Beklenen Kapasite (mMQR)	Bulunan Kapasite (mMQR)
50µL 1mM Kuersetin 50µL 1mM Rutin 50µL 1mM Morin 0.5mL 10mM Kateşin	2.40x10 ⁻²	2.72x10 ⁻²
50µL 1mM Kuersetin 0.4mL 1mM Ellagik asit 0.3mL 1mM Apigenin 0.1mL 1mM Luteolin	2.93x10 ⁻²	3.8x10 ⁻²
50µL 1mM Kuersetin 50µL 1mM Mirisetin 50µL 1mM Kaemferol 0.1mL 1mM Naringenin	2.36x10 ⁻²	2.56x10 ⁻²
50µL 1mM Kuersetin 0.3mL 1mM Alizarin 0.4mL 1mM Karminik A. 20µL 1mM Kurkumin	3.66x10 ⁻²	3.9x10 ⁻²
0.5mL 0.5mM Purpurin 0.3mL 1mM Alizarin 0.4mL 1mM Karminik A. 20µL 1mM Kurkumin	3.36x10 ⁻²	3.34x10 ⁻²

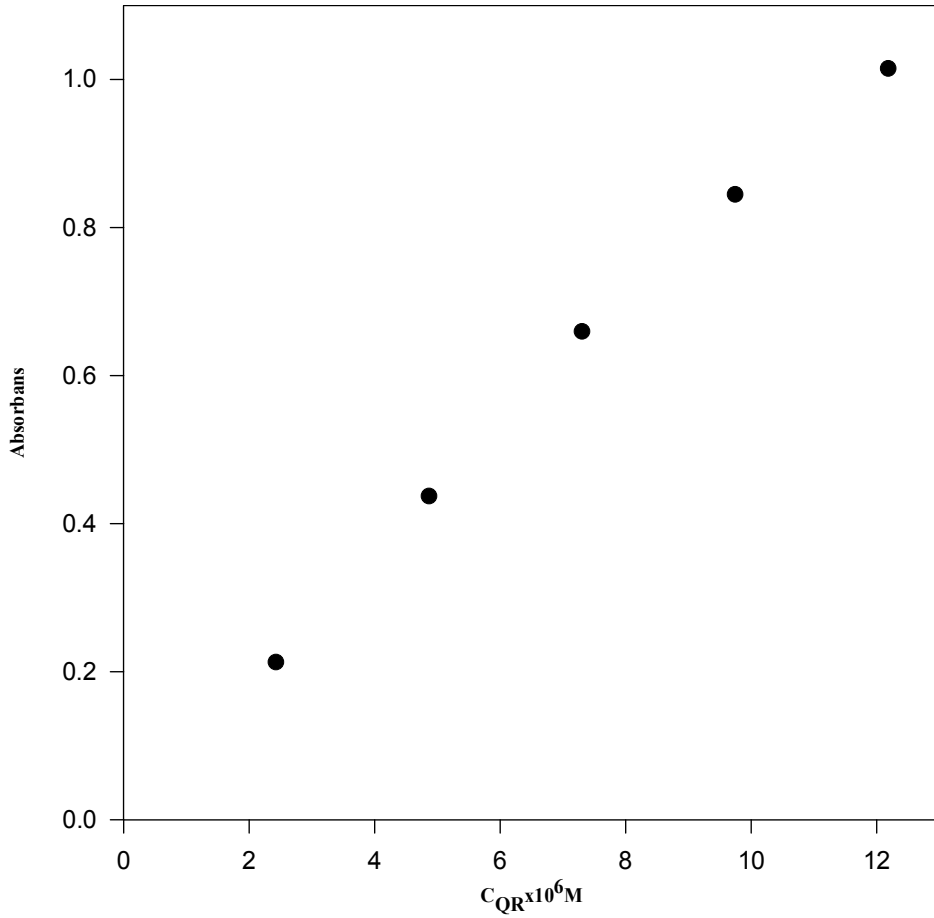
4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN SAF POLİFENOLİK BİLEŞİKLERE UYGULANABİLİRLİĞİ

4.2.1. Bazı Fenoliklerin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Doğru Denklemleri ve Kalibrasyon Grafikleri

4.2.1.1. Kuersetin

Tablo 4.17: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-6}	0.2116
4.88×10^{-6}	0.4358
7.32×10^{-6}	0.6584
9.76×10^{-6}	0.8434
1.22×10^{-5}	1.0138
Doğru Denklemi : $y = 82459 x + 0.029$ $r = 0.998$	

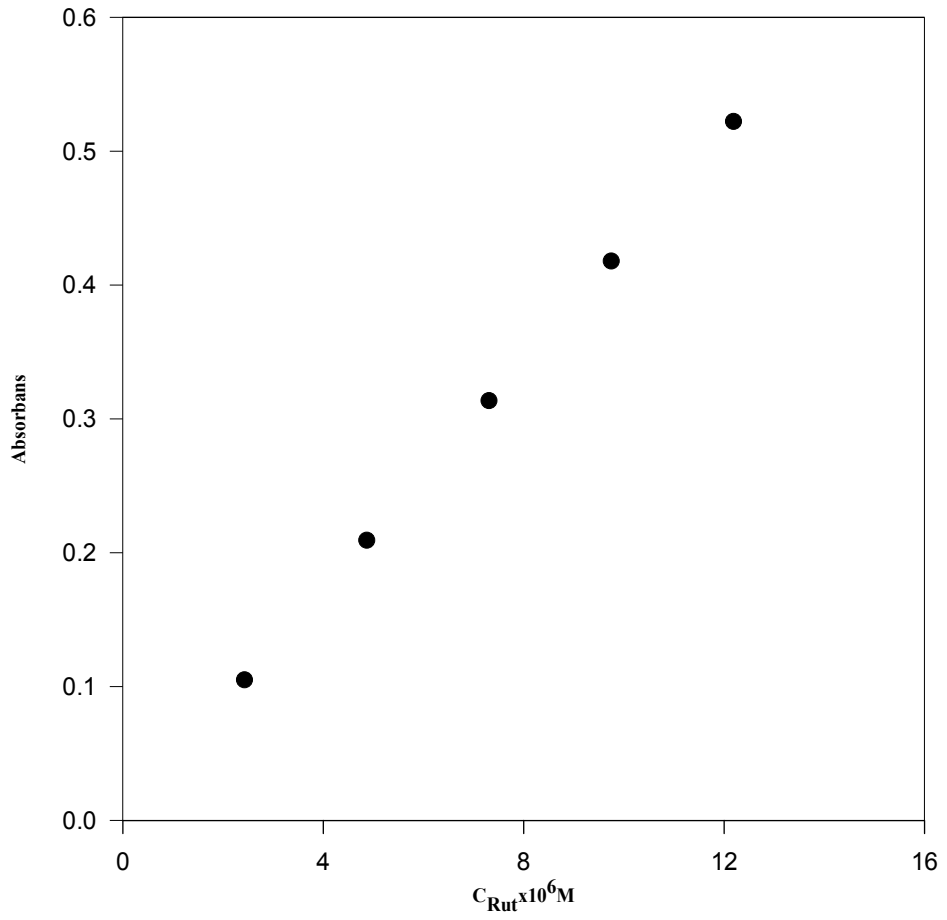


Şekil 4.20: Kuersetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.2. Rutin

Tablo 4.18: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-6}	0.1046
4.88×10^{-6}	0.2089
7.32×10^{-6}	0.3132
9.76×10^{-6}	0.4175
1.22×10^{-5}	0.5218
Doğru Denklemi : $y = 42746 x + 0.0003$ $r=1$	

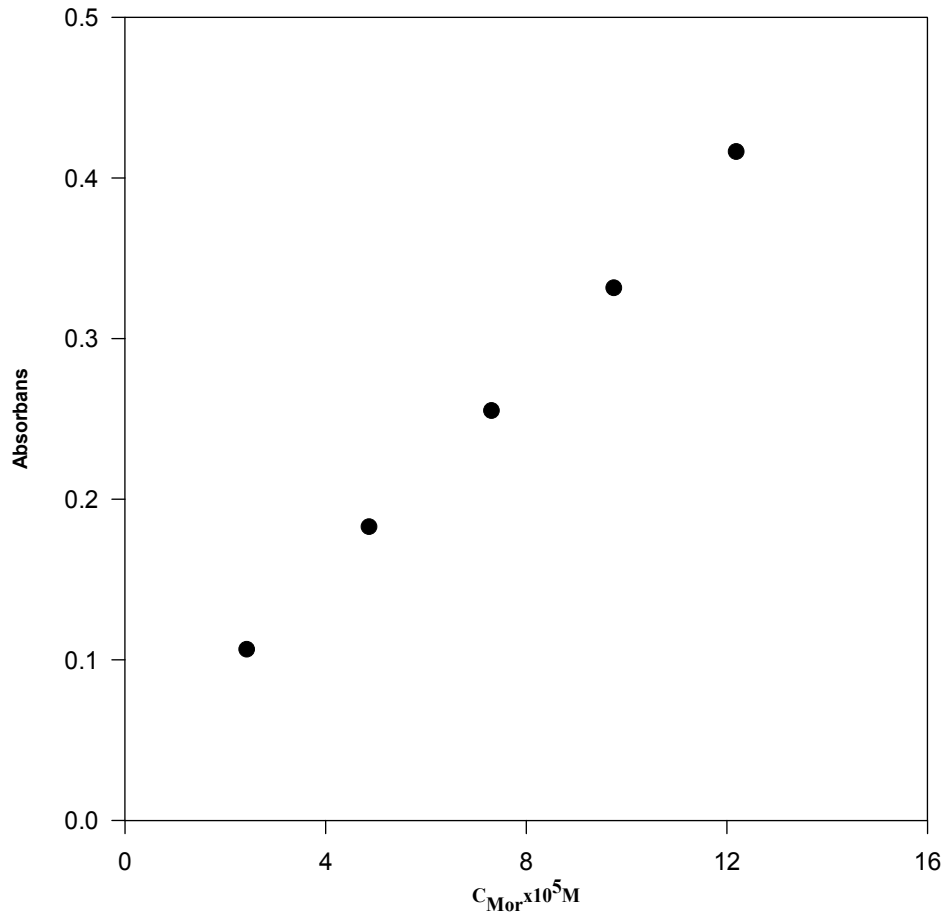


Şekil 4.21: Rutinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.3. Morin

Tablo 4.19: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-6}	0.1061
4.88×10^{-6}	0.1825
7.32×10^{-6}	0.2547
9.76×10^{-6}	0.3311
1.22×10^{-5}	0.4160
Doğru Denklemi : $y = 31492 x + 0.027$ $r = 0.9996$	

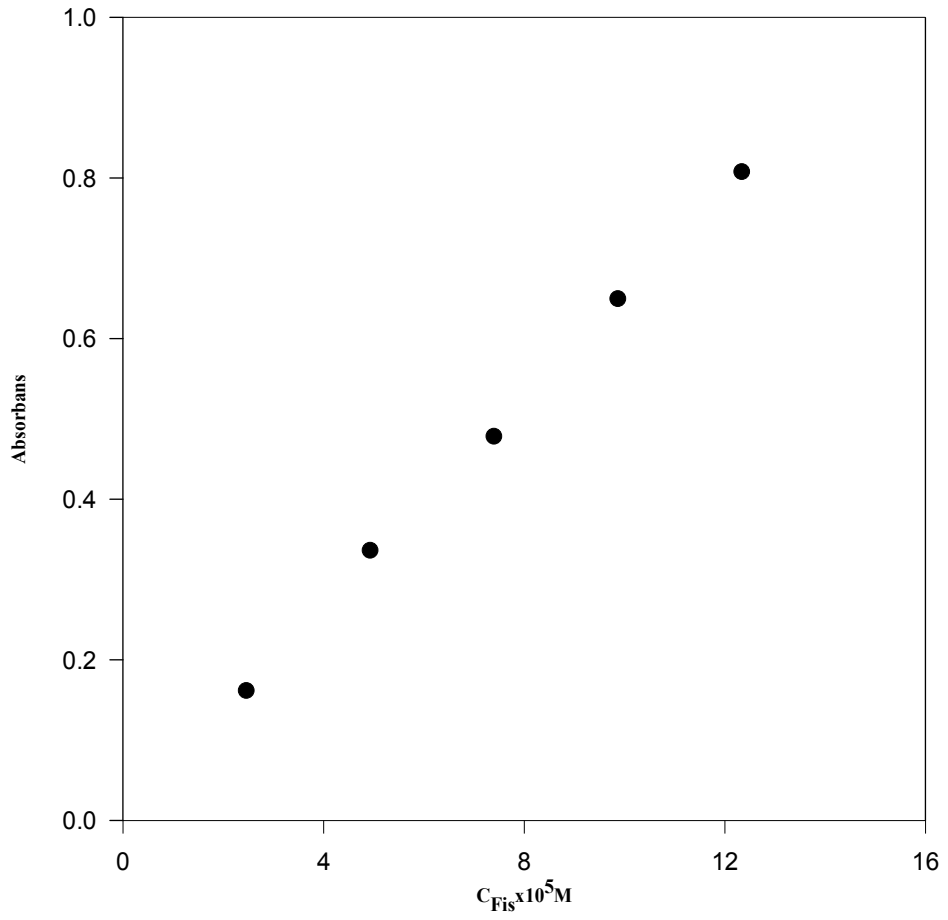


Şekil 4.22: Morinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.4. Fisetin

Tablo 4.20: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.47×10^{-6}	0.1610
4.94×10^{-6}	0.3354
7.41×10^{-6}	0.4775
9.88×10^{-6}	0.6487
12.35×10^{-6}	0.8069
Doğru Denklemi : $y = 64983 x + 0.0043$ $r = 0.9996$	

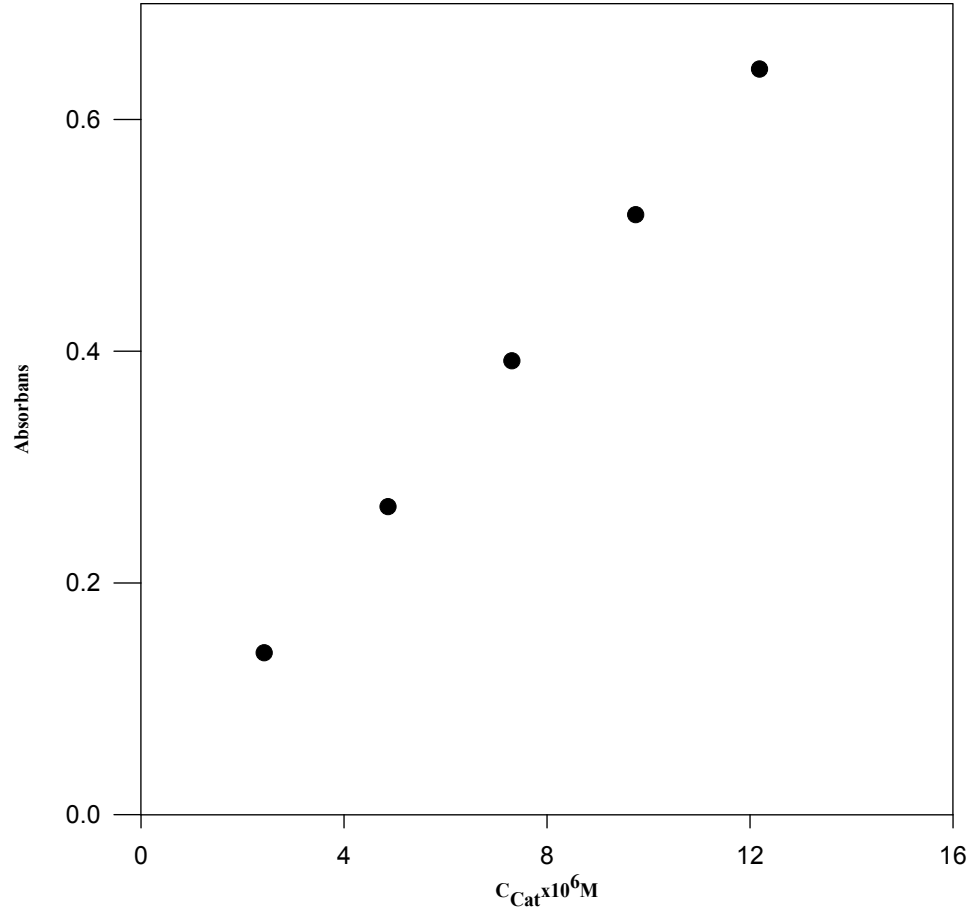


Şekil 4.23: Fisetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.5. Kateşin

Tablo 4.21: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemini

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-6}	0.1393
4.88×10^{-6}	0.2652
7.32×10^{-6}	0.3912
9.76×10^{-6}	0.5172
1.22×10^{-5}	0.6431
Doğru Denklemi : $y = 51623 x + 0.0133$ $r = 0.999$	

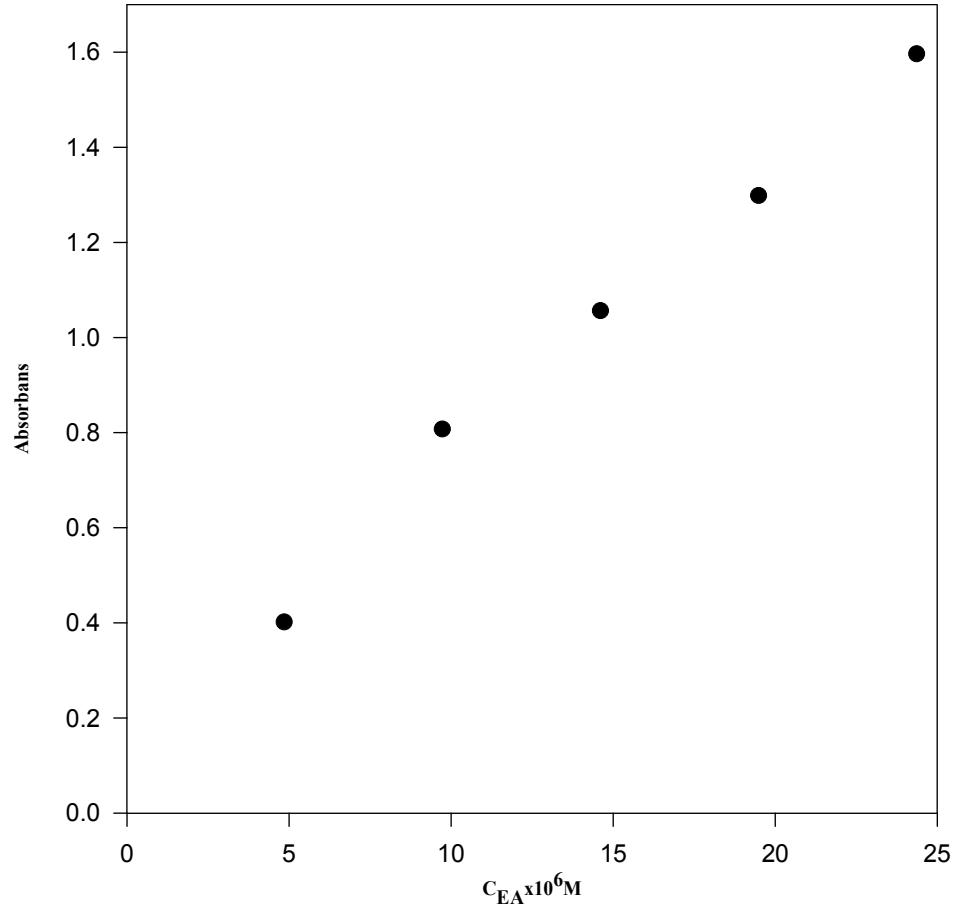


Şekil 4.24: Kateşinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.6. Ellagik asit

Tablo 4.22: Ellagik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.4004
9.75×10^{-6}	0.8060
14.63×10^{-6}	1.0551
19.51×10^{-6}	1.2971
24.39×10^{-6}	1.5952
Doğru Denklemi : $y = 59030 x + 0.167$ $r = 0.995$	

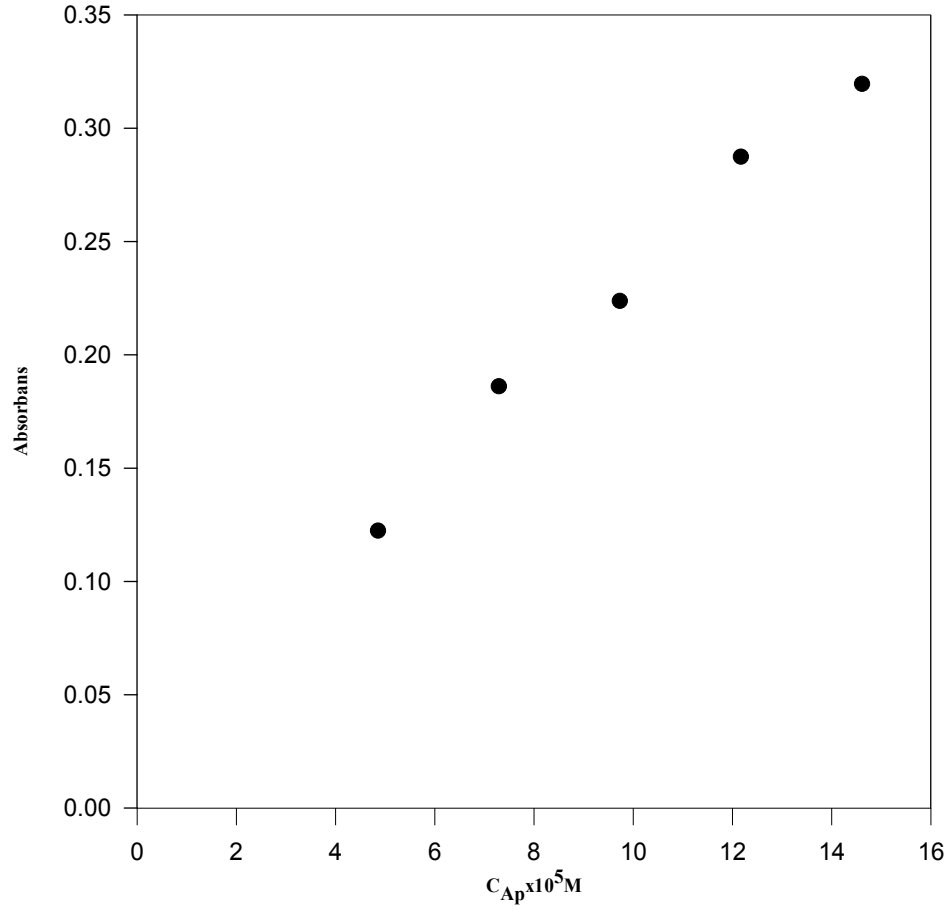


Şekil 4.25: Ellagik asitin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.7. Apigenin

Tablo 4.23: Apigeninin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-5}	0.1220
9.75×10^{-5}	0.1857
14.63×10^{-5}	0.2234
19.51×10^{-5}	0.2871
24.39×10^{-5}	0.3192
Doğru Denklemi : $y = 2031.9 x + 0.0293$ $r = 0.994$	

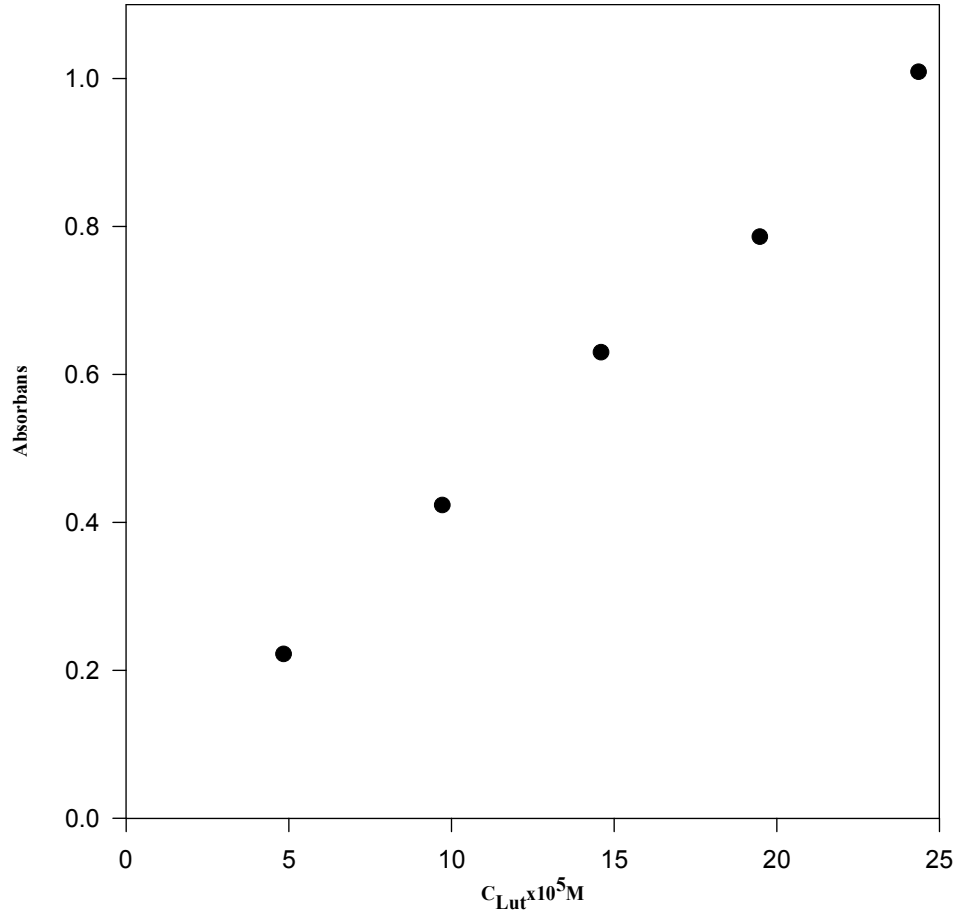


Şekil 4.26: Apigeninin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.8. Luteolin

Tablo 4.24: Luteolinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.2209
9.75×10^{-6}	0.4221
14.63×10^{-6}	0.6288
19.51×10^{-6}	0.7850
24.39×10^{-6}	1.0080
Doğru Denklemi : $y = 39694.6 x + 0.0322$ $r = 0.999$	

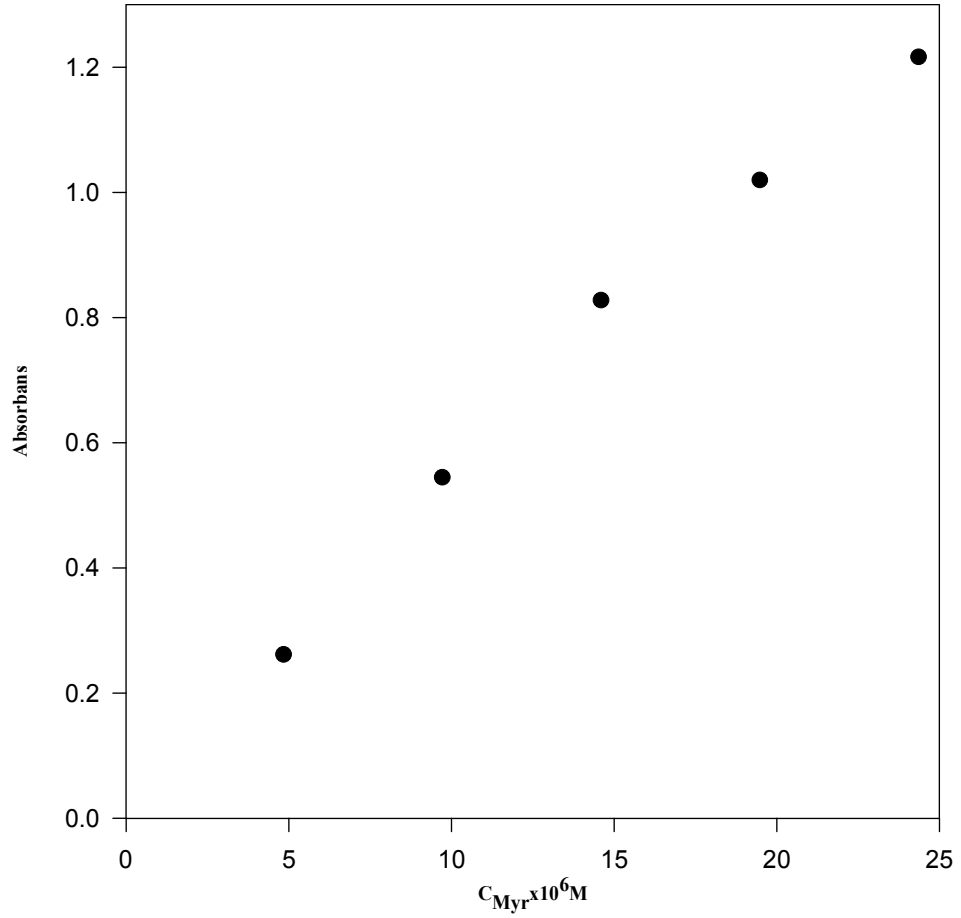


Şekil 4.27: Luteolinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.9. Mirisetin

Tablo 4.25: Mirisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.2602
9.75×10^{-6}	0.5434
14.63×10^{-6}	0.8263
19.51×10^{-6}	1.0182
24.39×10^{-6}	1.2151
Doğru Denklemi : $y = 48864.7 x + 0.0577$ $r = 0.995$	

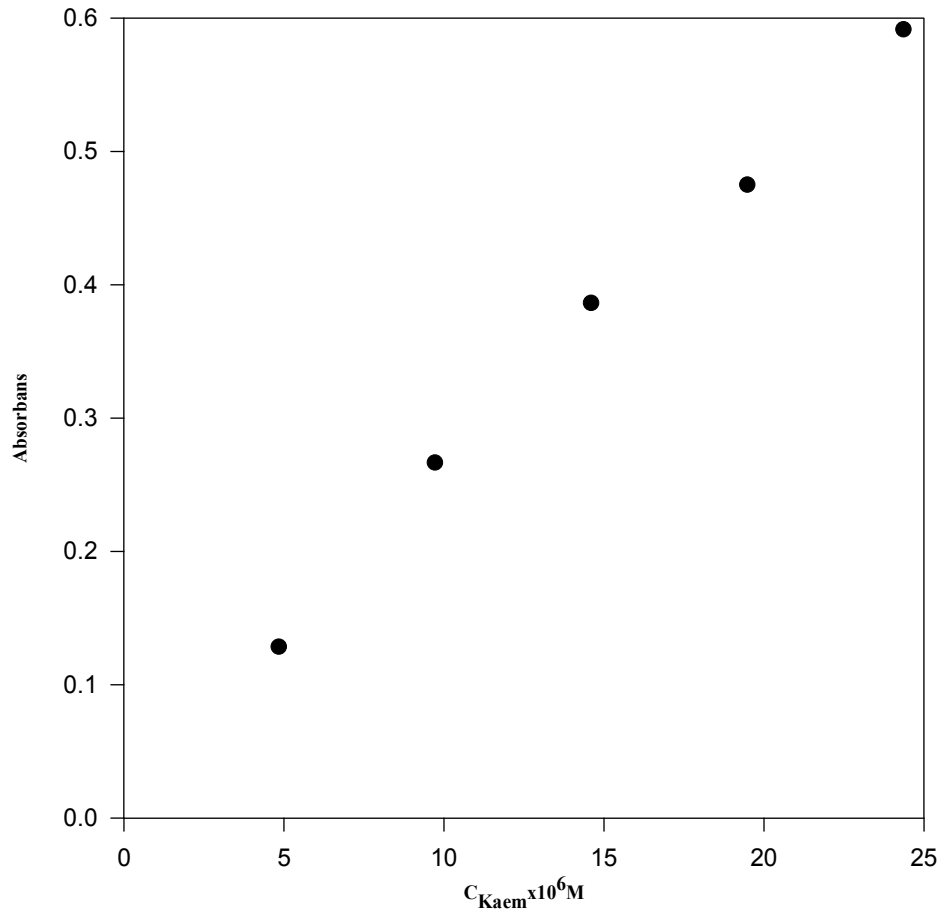


Şekil 4.28: Mirisetinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.10. Kaemferol

Tablo 4.26: Kaemferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.1279
9.75×10^{-6}	0.2660
14.63×10^{-6}	0.3858
19.51×10^{-6}	0.4745
24.39×10^{-6}	0.5910
Doğru Denklemi : $y = 23252.9 x + 0.0288$ $r = 0.997$	

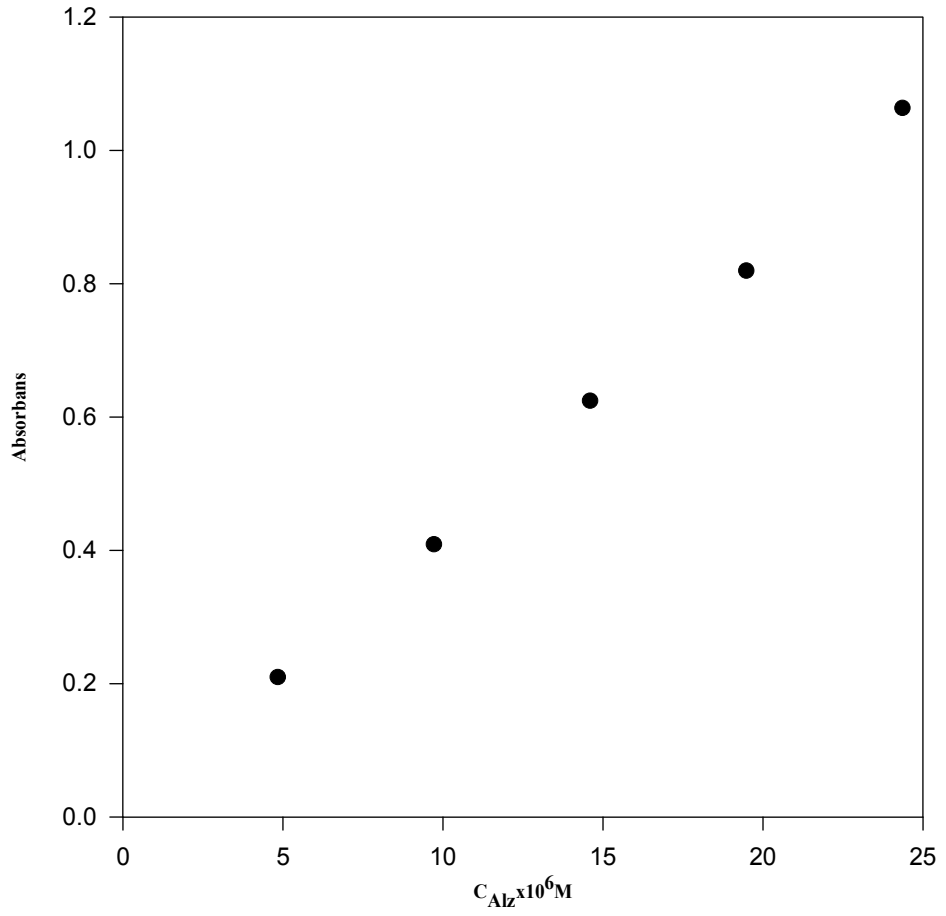


Şekil 4.29: Kaemferolün kalibrasyon eğrisi

4.2.1.11. Alizarin

Tablo 4.27: Alizarinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.2085
9.75×10^{-6}	0.4078
14.63×10^{-6}	0.6232
19.51×10^{-6}	0.8183
24.39×10^{-6}	1.0624
Doğru Denklemi : $y = 43407.7 x - 0.0110$ $r = 0.999$	

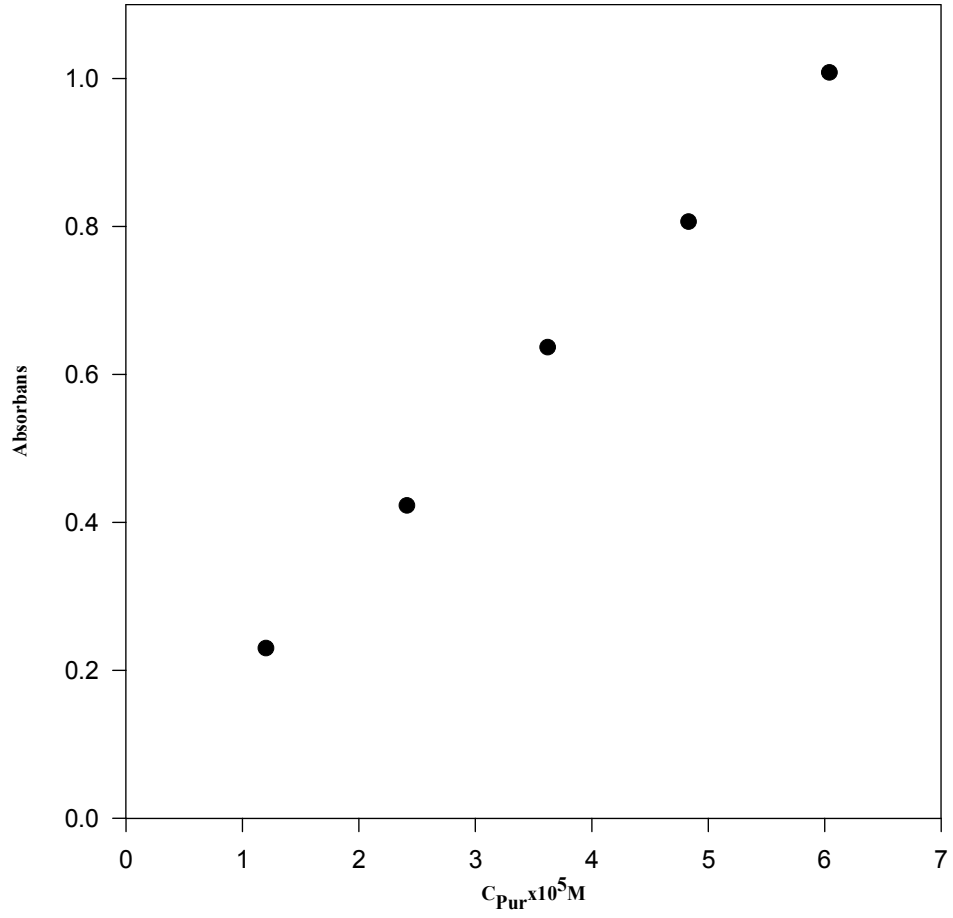


Şekil 4.30: Alizarinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.12. Purpurin

Tablo 4.28: Purpurinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.21×10^{-5}	0.2288
2.42×10^{-5}	0.4216
3.63×10^{-5}	0.6355
4.84×10^{-5}	0.8053
6.05×10^{-5}	1.0072
Doğru Denklemi : $y = 16037.1 x - 0.037$ $r = 0.999$	

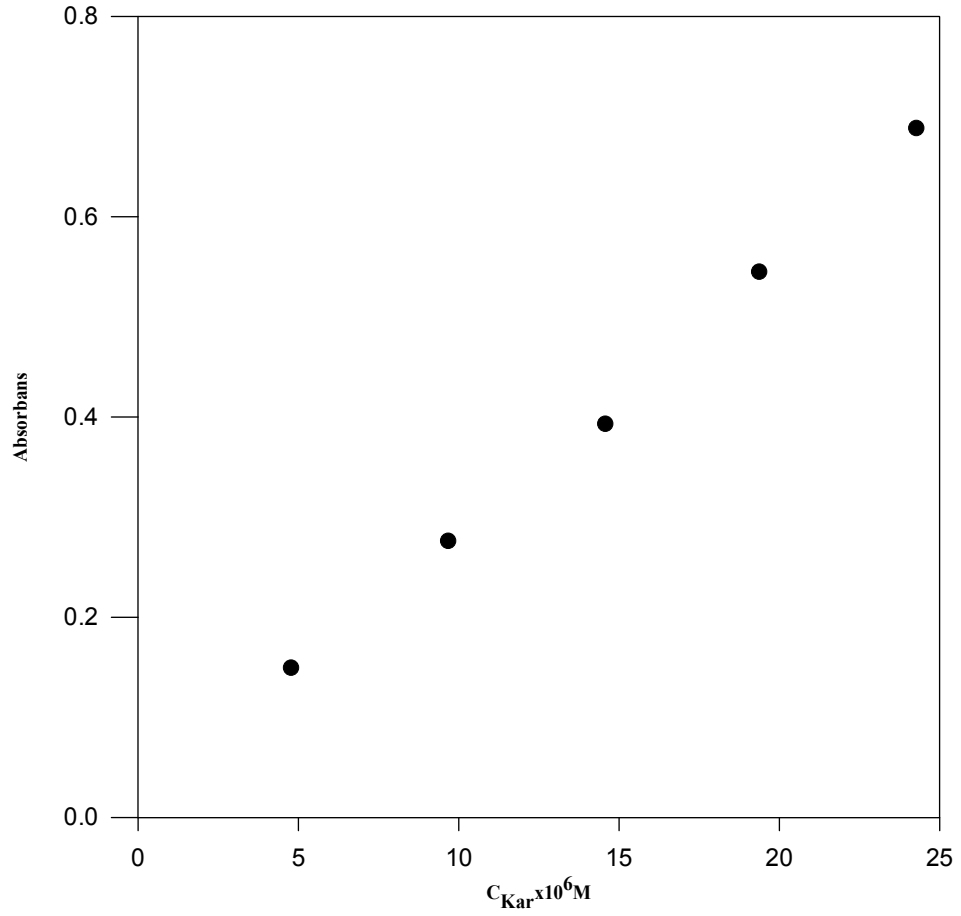


Şekil 4.31: Purpurinin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.13. Karminik asit

Tablo 4.29: Karminik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.1487
9.75×10^{-6}	0.2754
14.63×10^{-6}	0.3923
19.51×10^{-6}	0.5442
24.39×10^{-6}	0.6878
Doğru Denklemi : $y = 27659.1 x + 0.005$ $r = 0.998$	

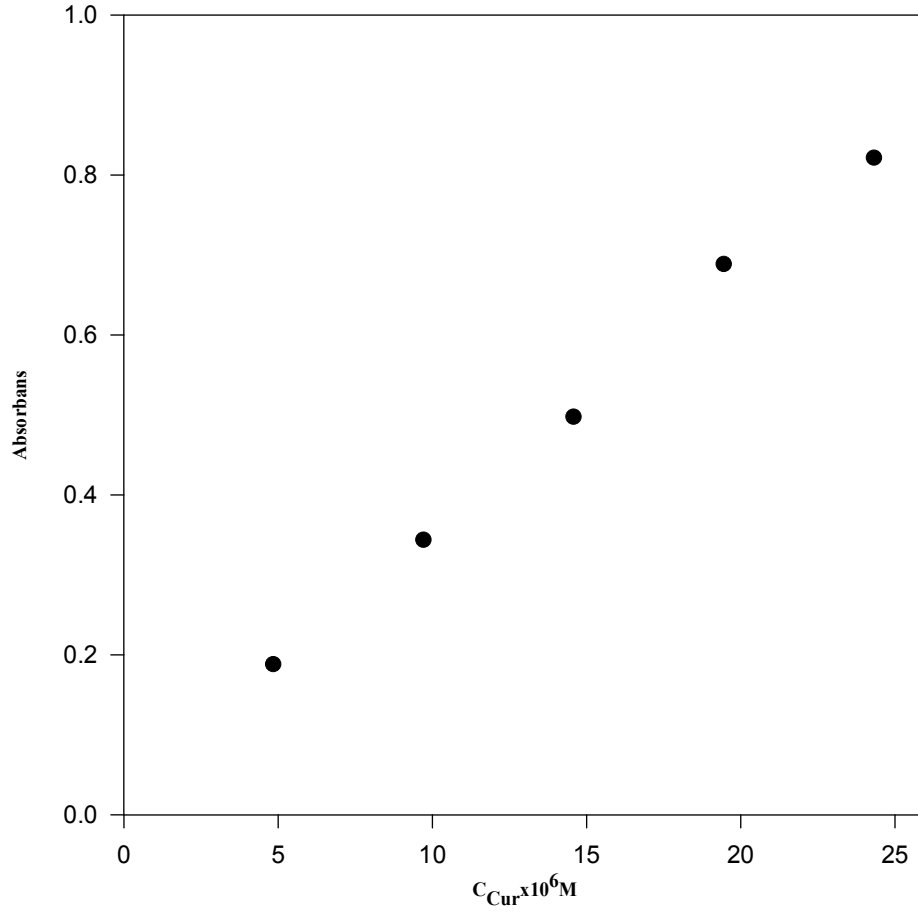


Şekil 4.32: Karminik asitin kalibrasyon eğrisi

4.2.1.14. Kurkumin

Tablo 4.30: Kurkumin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Konsantrasyon (M)	Absorbans
4.87×10^{-6}	0.1872
9.74×10^{-6}	0.3428
14.61×10^{-6}	0.4966
19.48×10^{-6}	0.6876
24.35×10^{-6}	0.8207
Doğru Denklemi : $y = 33096.5 x + 0.02344$ $r = 0.998$	



Şekil 4.33: Kurkuminin kalibrasyon eğrisi

4.2.2. Fenolik Bileşiklerin CUPRAC Yöntemi ile Elde Edilen Molar Absorblama Katsayıları, Lineer Aralıkları ve QREFC (Kuersetin Eşdeğeri Flavonoid Konsantrasyonu) Değerlerinin Belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) CUPRAC yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.31).

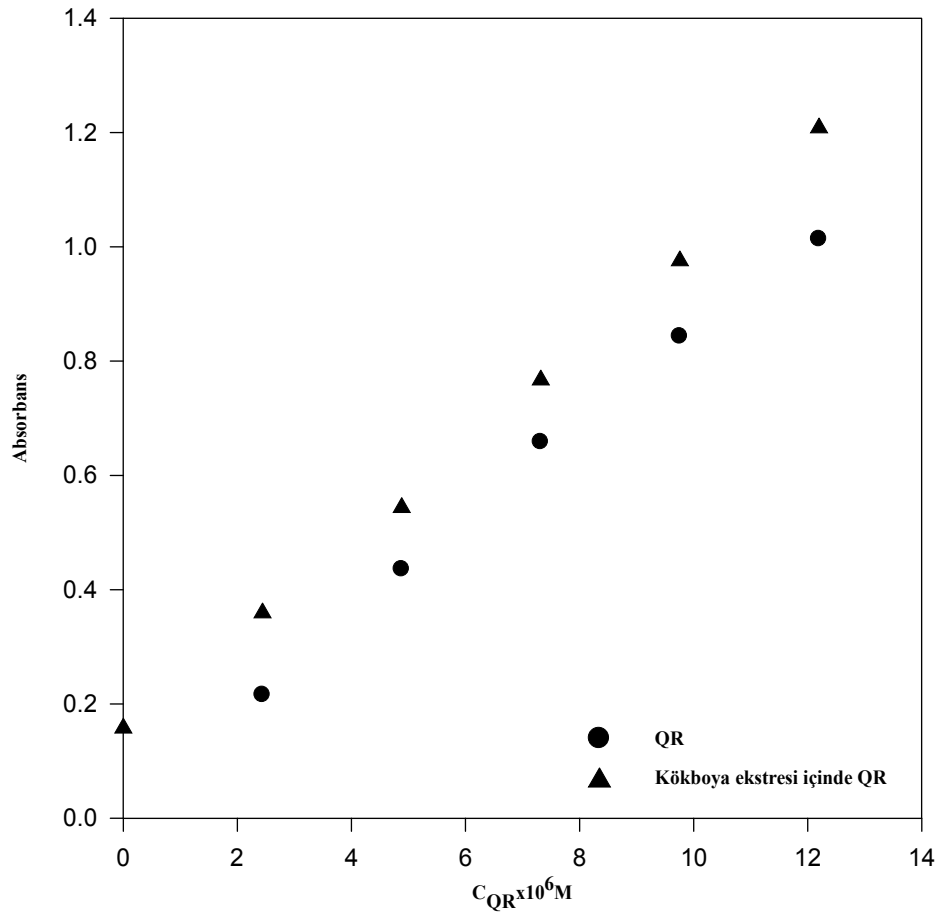
Tablo 4.31: Çeşitli flavonoidlerin CUPRAC yöntemine göre doğru denklemleri, molar absorbtivite ve QREFC (kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu) değerleri

Flavonoid	Doğru Denklemi	ϵ (Lmol ⁻¹ cm ⁻¹)	Lineer Aralık (M)	QREFC
Kuersetin	$y=8.24 \times 10^4 x + 0.029$ $r = 0.998$	8.24×10^4	$2.54 \times 10^{-7} - 1.54 \times 10^{-5}$	1.00
Rutin	$y=4.27 \times 10^4 x + 0.0003$ $r = 1$	4.27×10^4	$1.16 \times 10^{-6} - 3.04 \times 10^{-5}$	0.52
Morin	$y=3.15 \times 10^4 x + 0.027$ $r = 0.999$	3.15×10^4	$7.3 \times 10^{-7} - 4.04 \times 10^{-5}$	0.38
Fisetin	$y=6.50 \times 10^4 x + 0.0043$ $r = 0.999$	6.50×10^4	$7.03 \times 10^{-7} - 1.99 \times 10^{-5}$	0.79
Kateşin	$y=5.16 \times 10^4 x + 0.0133$ $r = 0.999$	5.16×10^4	$7.1 \times 10^{-7} - 2.49 \times 10^{-5}$	0.63
Ellagik asit	$y=5.9 \times 10^4 x + 0.167$ $r = 0.995$	5.9×10^4	$5.08 \times 10^{-8} - 1.91 \times 10^{-5}$	0.71
Apigenin	$y=2.03 \times 10^3 x + 0.0293$ $r = 0.994$	2.03×10^3	$1.01 \times 10^{-5} - 6.25 \times 10^{-4}$	0.02
Luteolin	$y=3.96 \times 10^4 x + 0.0322$ $r = 0.999$	3.96×10^4	$4.48 \times 10^{-7} - 3.19 \times 10^{-5}$	0.48
Mirisetin	$y=4.88 \times 10^4 x + 0.0577$ $r = 0.995$	4.88×10^4	$4.7 \times 10^{-8} - 2.54 \times 10^{-5}$	0.59
Kaemferol	$y=2.32 \times 10^4 x + 0.0288$ $r = 0.997$	2.32×10^4	$9.11 \times 10^{-7} - 5.46 \times 10^{-5}$	0.28
Alizarin	$y=4.34 \times 10^4 x - 0.011$ $r = 0.999$	4.34×10^4	$1.4 \times 10^{-6} - 3.02 \times 10^{-5}$	0.53
Purpurin	$y=1.60 \times 10^4 x + 0.037$ $r = 0.999$	1.60×10^4	$8.1 \times 10^{-7} - 7.87 \times 10^{-5}$	0.19
Karminik asit	$y=2.77 \times 10^4 x + 0.005$ $r = 0.998$	2.77×10^4	$1.62 \times 10^{-6} - 4.68 \times 10^{-5}$	0.34
Kurkumin	$y=3.31 \times 10^4 x + 0.0234$ $r = 0.998$	3.31×10^4	$8.03 \times 10^{-7} - 3.85 \times 10^{-5}$	0.40

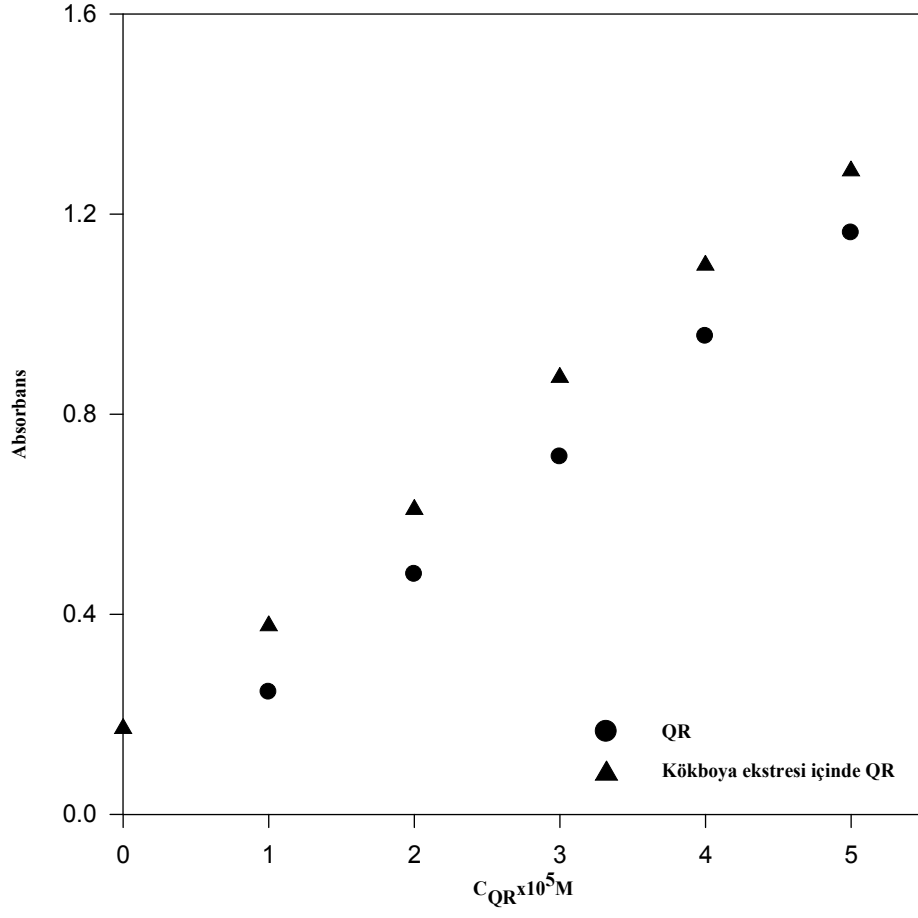
4.3. DOĞAL BOYA ÖZÜTLERİNE STANDART KATKI YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

4.3.1. Rubia Tinctorum L. (Kökboya) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması

Elde ettiğimiz doğal boya özütüne kuersetin standart katkısı uygulandı. CUPRAC Yöntemi için alınan 0.4 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1620 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. $AlCl_3$ /Potasyum asetat Yöntemi için alınan 1 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1031 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. Çalışma doğrularının paralelliklerinden analit ile boya özütü bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.34 ve 4.35).



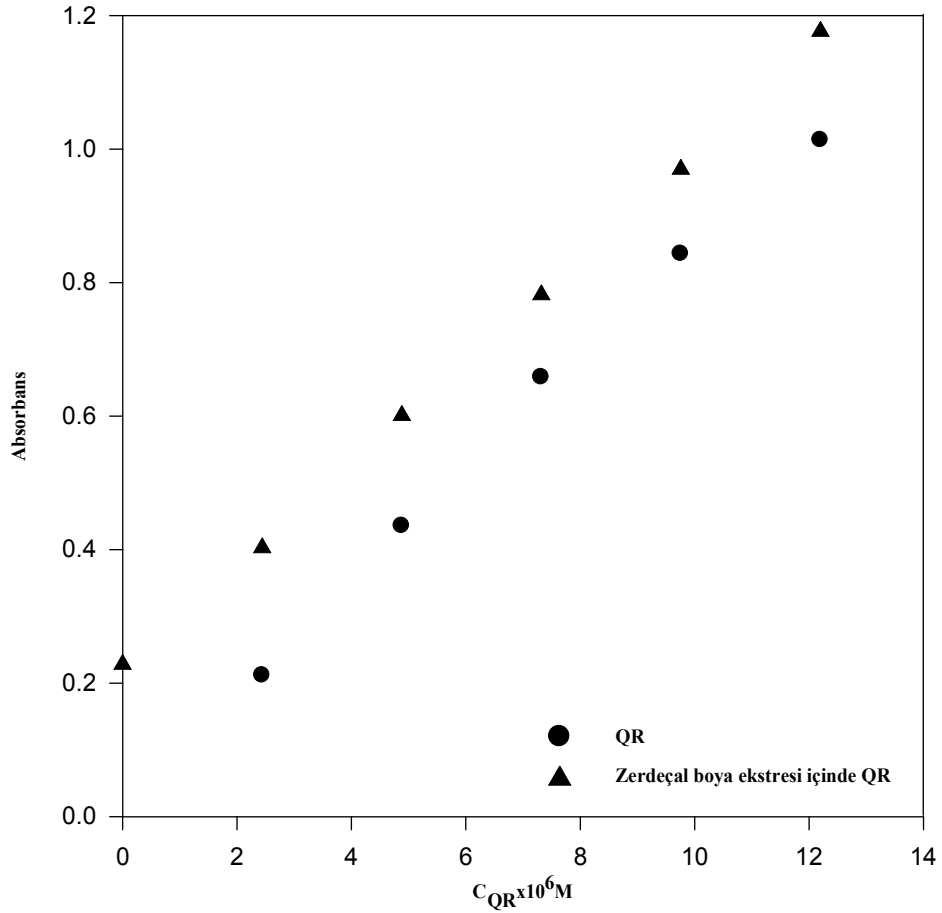
Şekil 4.34: CUPRAC yöntemi ile Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



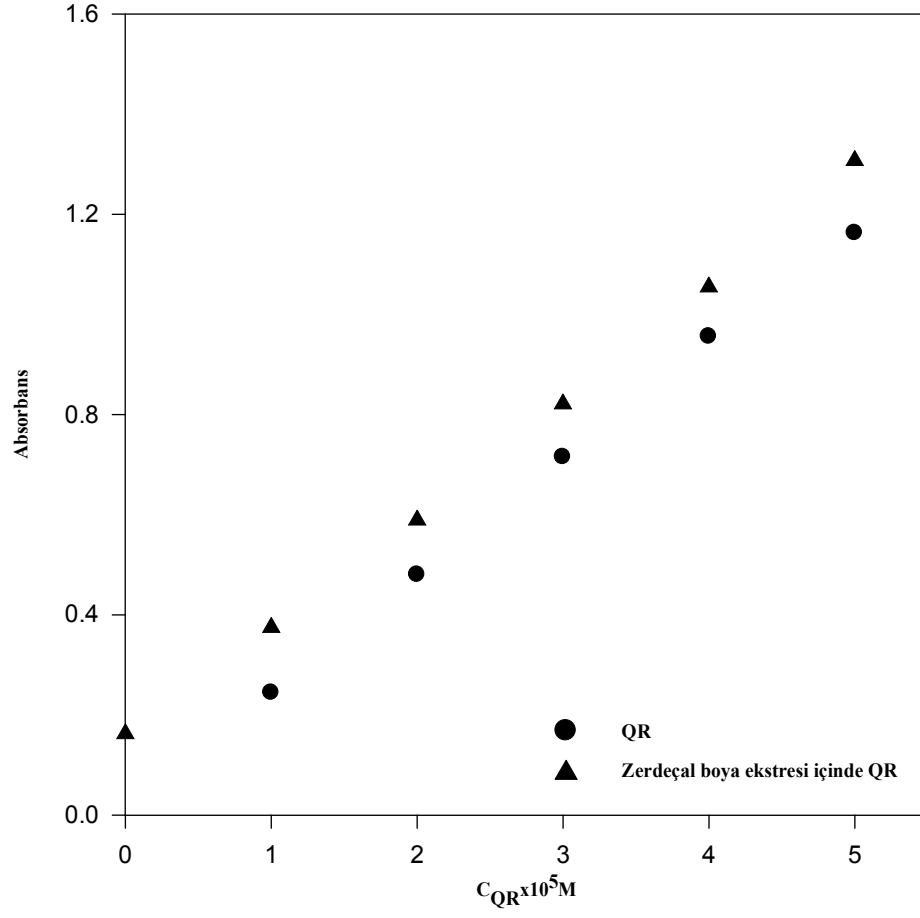
Şekil 4.35: AlCl₃/potasyum asetat yöntemi ile Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.3.2. Curcuma Longa L. (Zerdeçal) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması

Elde ettiğimiz doğal boya özütüne kuersetin standart katkısı uygulandı. CUPRAC Yöntemi için alınan 0.3 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.2318 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. $AlCl_3$ /Potasyum asetat Yöntemi için alınan 0.2 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1677 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. Çalışma doğrularının paralelliğinden analit ile boya özütü bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.36 ve 4.37).



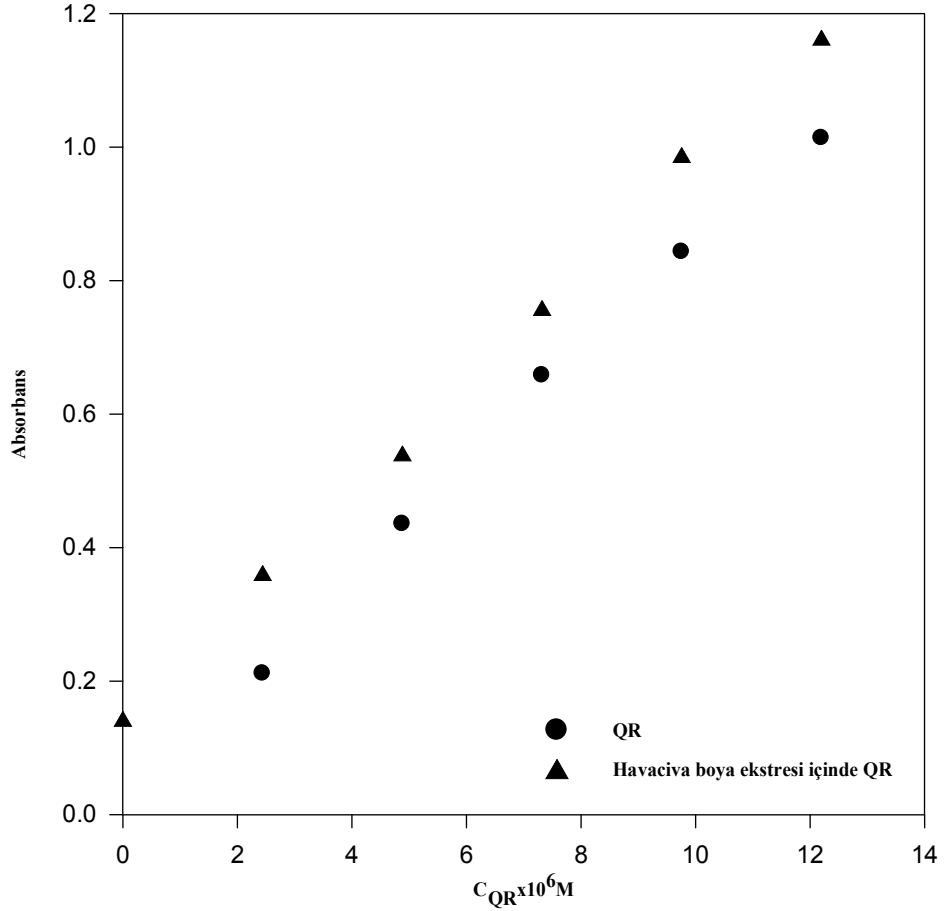
Şekil 4.36: CUPRAC yöntemi ile Curcuma Longa L. (Zerdeçal) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



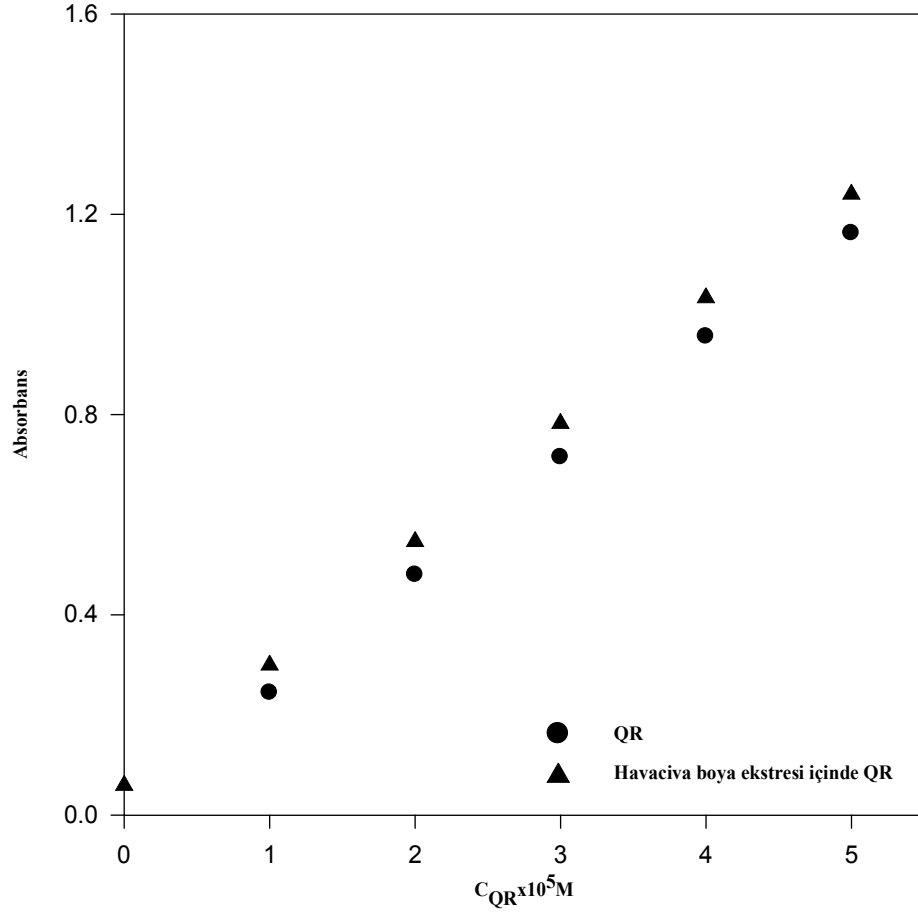
Şekil 4.37: AlCl₃/potasyum asetat yöntemi ile Curcuma Longa L. (Zerdeçal) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.3.3. Alkanna Tinctoria (Havaciva) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması

Elde ettiğimiz doğal boya özütüne kuersetin standart katkısı uygulandı. CUPRAC Yöntemi için alınan 0.6 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1436 olan) farklı hacimlerde $10^{-3}M$ kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. $AlCl_3$ /Potasyum asetat Yöntemi için alınan 1.5 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.0645 olan) farklı hacimlerde $10^{-3}M$ kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. Çalışma doğrularının paralelliğinden analit ile boya özütü bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.38 ve 4.39).



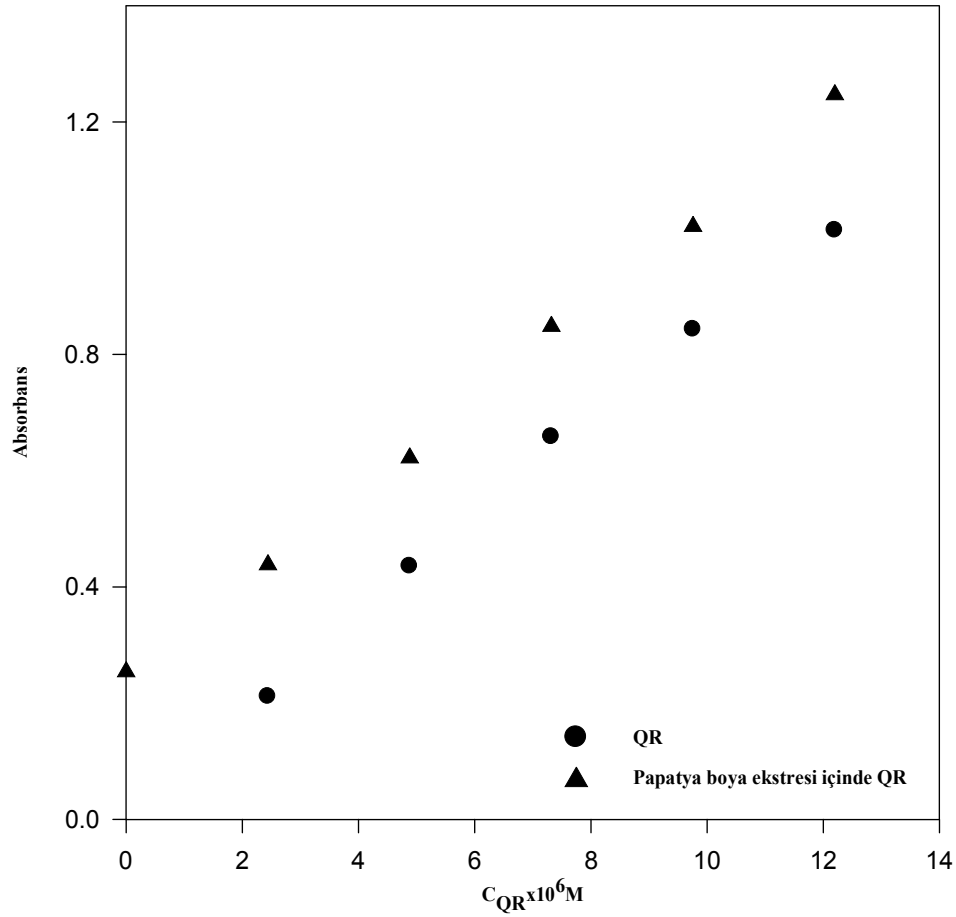
Şekil 4.38: CUPRAC yöntemi ile Alkanna Tinctoria (Havaciva) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



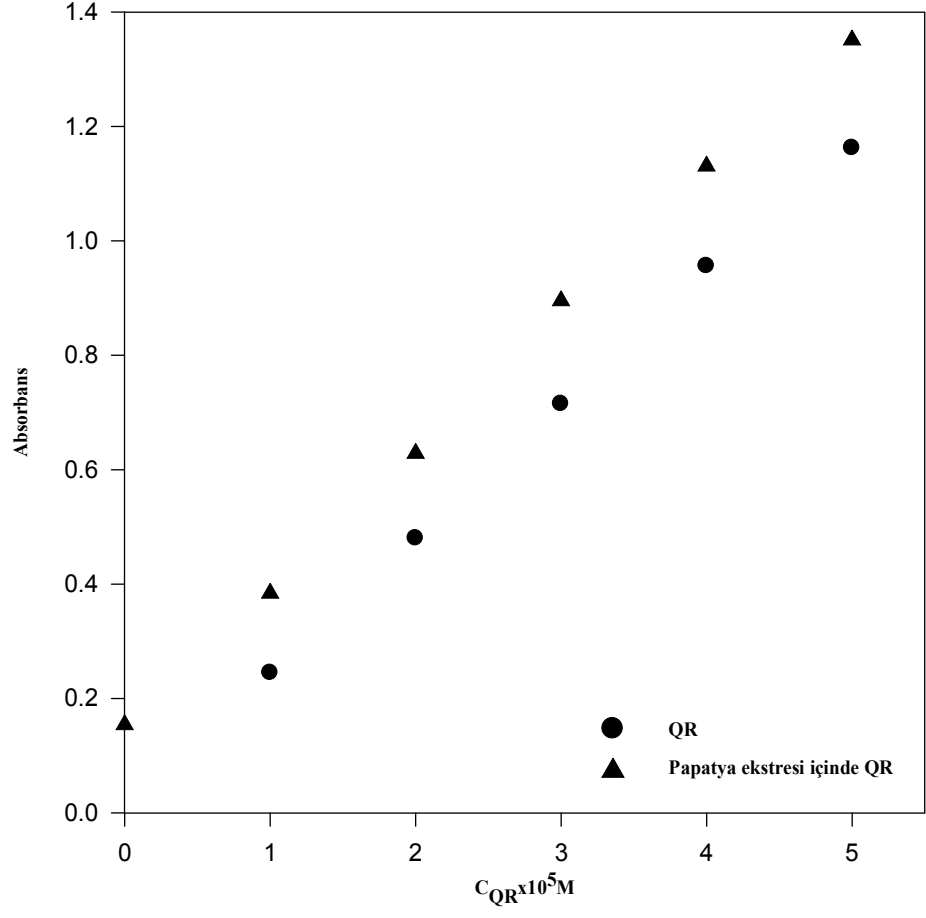
Şekil 4.39: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile *Alkanna tinctoria* (Havaciva) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.3.4. Matricaria Chamonilla (Papatya) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması

Elde ettiğimiz doğal boya özütüne kuersetin standart katkısı uygulandı. CUPRAC Yöntemi için alınan 0.3 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.2584 olan) farklı hacimlerde $10^{-3}M$ kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. $AlCl_3$ /Potasyum asetat Yöntemi için alınan 1.5 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1586 olan) farklı hacimlerde $10^{-3}M$ kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. Çalışma doğrularının paralelliğinden analit ile boya özütü bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40 ve 4.41).



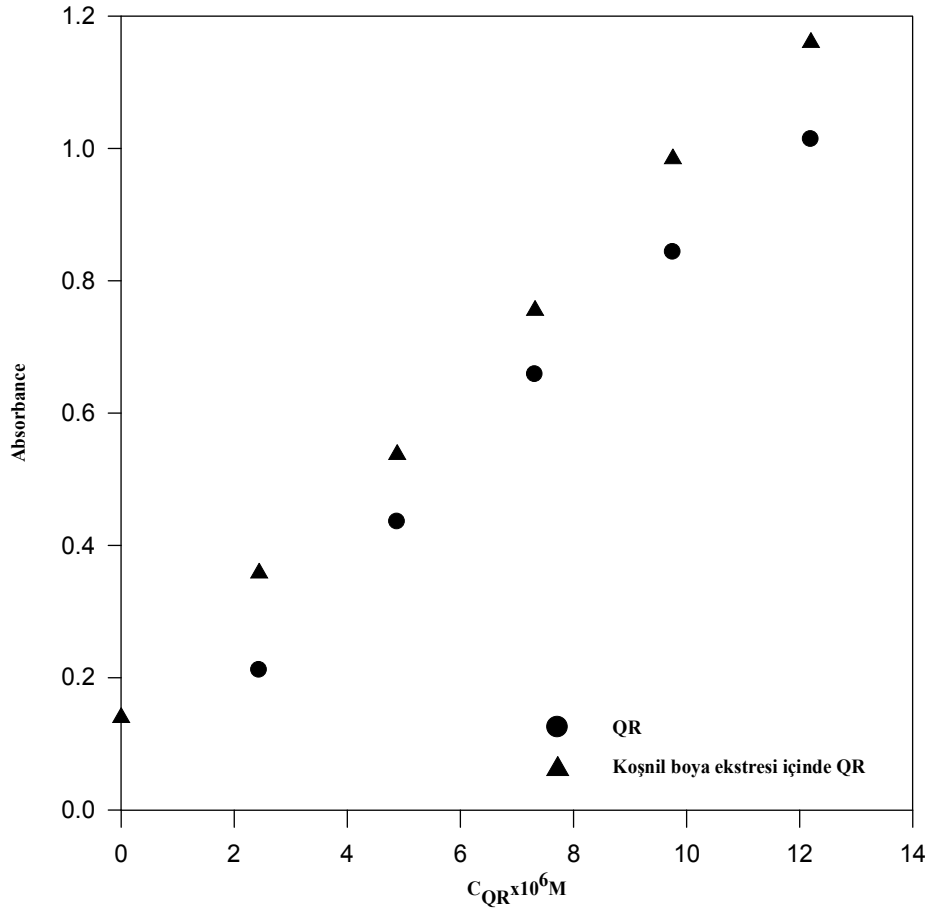
Şekil 4.40: CUPRAC yöntemi ile Matricaria Chamonilla (Papatya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



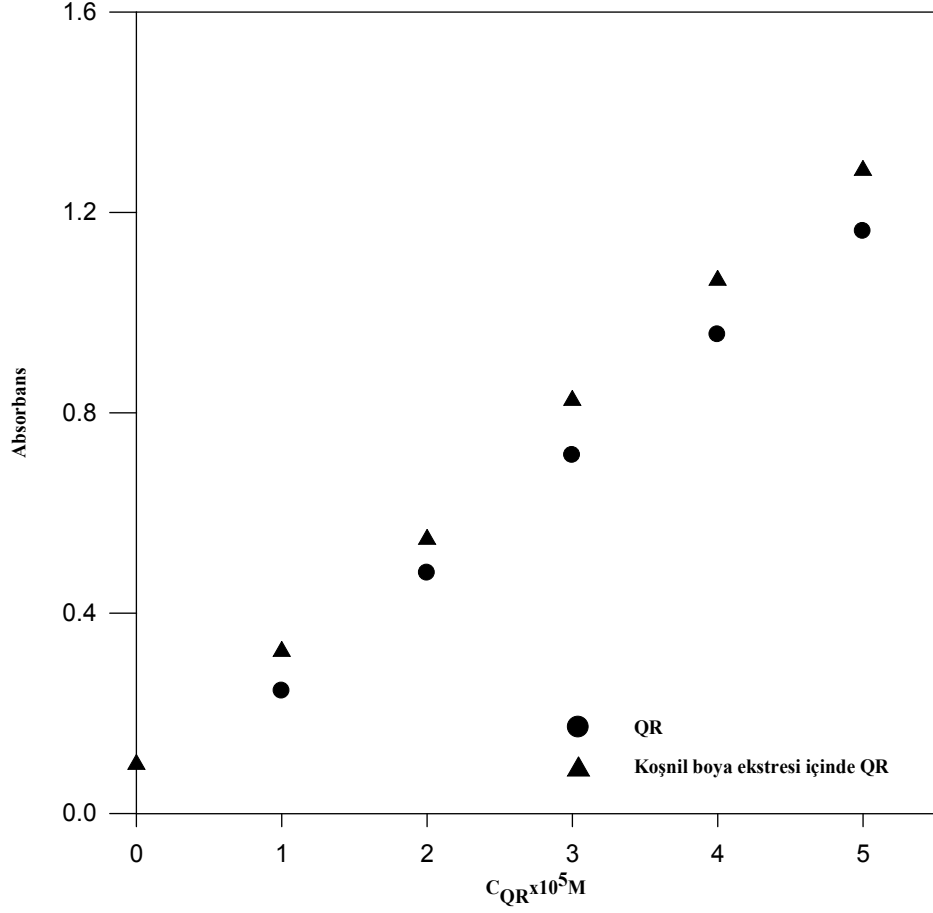
Şekil 4.41: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile Matricaria Chamomilla (Papatya) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

4.3.5. *Coccus ilicis* (Koşnil) Doğal Boyası Özütüne CUPRAC ve AlCl_3 /Potasyum Asetat Yöntemleri ile Kuersetin Standart Katkı Uygulaması

Elde ettiğimiz doğal boya özütüne kuersetin standart katkısı uygulandı. CUPRAC Yöntemi için alınan 0.2 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.4136 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. AlCl_3 /Potasyum asetat Yöntemi için alınan 1 mL doğal boya özütü üzerine (başlangıç absorbansı 0.1768 olan) farklı hacimlerde 10^{-3} M kuersetin (QR) ilave edilerek uygulandı. Çalışma doğrularının paralelliğinden analit ile boya özütü bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.42 ve 4.43).



Şekil 4.42: CUPRAC yöntemi ile *Coccus ilicis* (Koşnil) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.43: $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemi ile *Coccus Ilicis* (Koşnil) doğal boyası özütü içinde kuersetinin (QR) kalibrasyon eğrisi

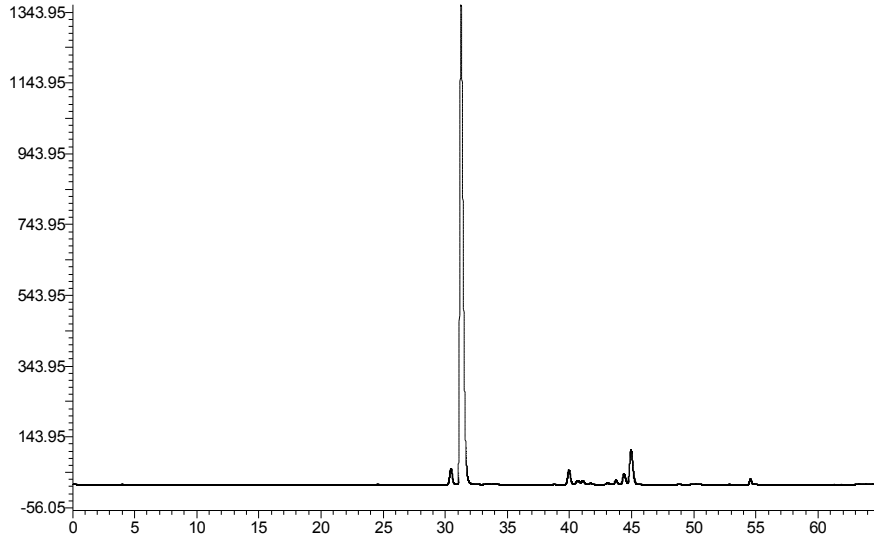
4.4. HPLC İLE FENOLİKLERİN KALİBRASYON DOĞRULARININ OLUŞTURULMASI

Tablo 4.32’de belirlenen fenolik bileşiklerin HPLC’de uygulanan yöntemle elde edilen alıkonma zamanları ve pik alanları ile molar konsantrasyon arasında çizilen doğru denklemleri görülmektedir.

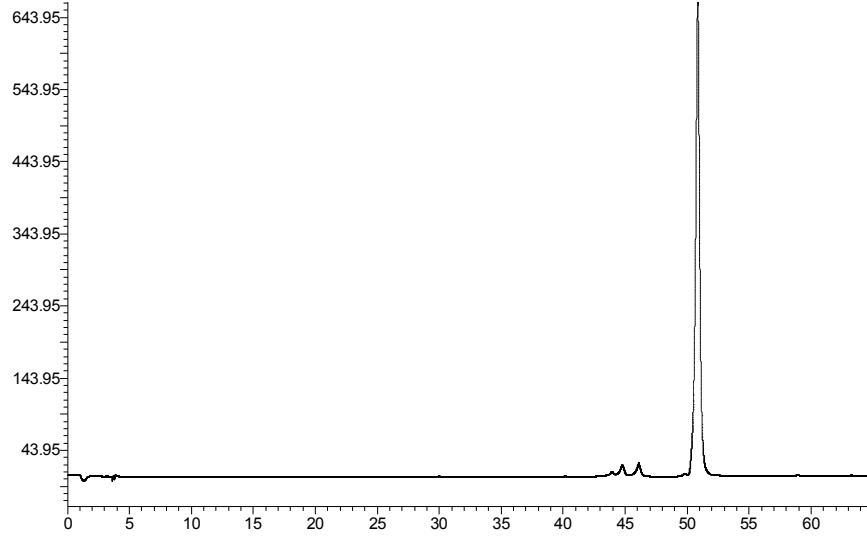
Tabloda verilen t_R :Alıkonma Zamanı, y: Pik Alanı, c: Molar konsantrasyon ve r: Korelasyon katsayısını ifade etmektedir. Ayrıca Şekil 4.44, 4.45 ve 4.46’da sırasıyla karminik asit alizarin ve kurkumin için standart çözeltilerin HPLC pikleri verilmiştir.

Tablo 4.32: Çeşitli fenoliklerin HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve alıkonma zamanları (y: pik alanı, c: molar konsantrasyon)

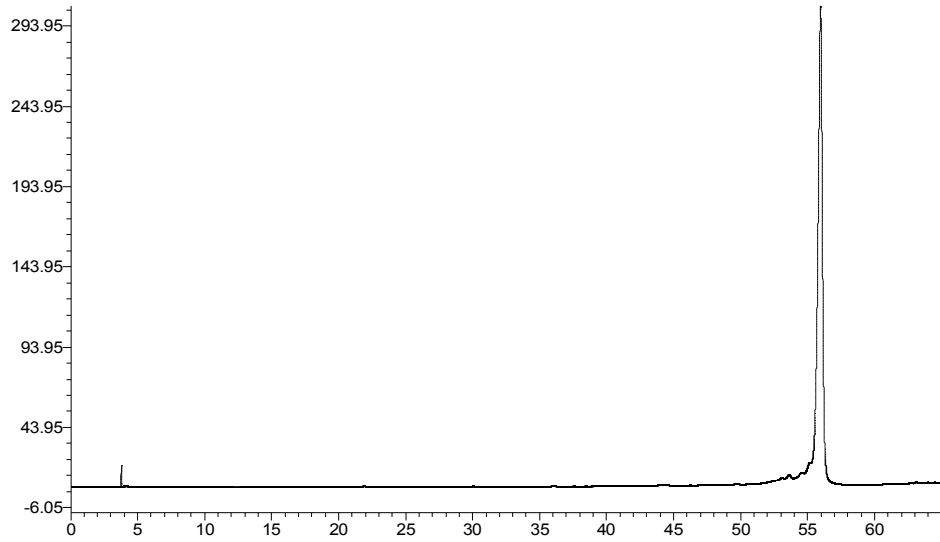
Polifenolik Bileşik	t_R (Dakika)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)	Doğru Denklemi	(r)
Kateşin[38]	18.11	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 3.79 \times 10^9 c + 73233$	0.9997
Karminik Asit	30	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 2.50 \times 10^{10} c - 84862$	0.9998
Rutin[38]	34.99	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 8.79 \times 10^9 c + 3687$	0.9999
Mirisetin[38]	38.67	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 5.93 \times 10^9 c - 42007$	0.9996
Kuersetin[38]	44.41	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 9.12 \times 10^9 c + 88516$	0.9989
Luteolin[38]	45.97	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 9.02 \times 10^9 c - 79509$	0.9990
Kamferol[38]	48.90	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 7.23 \times 10^9 c - 36137$	0.9996
Alizarin	50	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 1.60 \times 10^{10} c - 283097$	0.9998
Apigenin[38]	50.17	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 1.04 \times 10^{10} c - 1727$	0.9999
Kurkumin	55	$4 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-4}$	$y = 6.61 \times 10^9 c - 44103$	0.9999



Şekil 4.44: Karminik asit standardının kromatogramı



Şekil 4.45: Alizarin standardının kromatogramı



Şekil 4.46: Kurkumin standardının kromatogramı

4.5. DOĞAL BOYA VE BOYANMIŞ TEKSTİL ÖRNEKLERİ

4.5.1. Doğal Boya Özütlerine CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemlerinin Uygulanması

Hazırlanan doğal boya özütlerindeki toplam flavonoid içerikleri, CUPRAC ve $AlCl_3$ /Potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri kullanılarak kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.33).

Tablo 4.33: Doğal boya örneklerinin belirlenen kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek)

Doğal Boya	QREFC _(CUPRAC) $\mu\text{molQRxg}^{-1}$	QREFC _(AlCl₃) $\mu\text{molQRxg}^{-1}$
Rubia Tinctorum L.	21.49	24.58
Curcuma Longa L.	38.91	165.89
Alkanna Tinctoria	19.04	6.53
Matricaria Chamomilla	48.60	15.02
Coccus İlicis	143.49	33.02

4.5.2. Rubia Tinctorum L. (Kökboya) Doğal Boyası ile Boyanmış Tekstil Örneğine CUPRAC ve AlCl₃/Potasyum Asetat Yöntemlerinin Uygulanması

Boyanmış tekstile asitle hidroliz işlemi uygulanarak örnek üzerinden ele geçirilen flavonoid boya özütüne CUPRAC ve AlCl₃/potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri uygulandı. Asit ile hidroliz işlemi şu şekilde uygulandı: numuneden alınan 0.1023 gramlık kısım üzerine 20 mL 3 M HCl (%50 Metanol-Su karışımında hazırlanmış) eklendikten sonra 30 dakika süre ile geri soğutucu eşliğinde 80 °C sıcaklıkta hidroliz uygulandı. Ele geçen çözelti 2 kez süzgeç kağıdından geçirildi ve buradan alınan 5 mL'lik kısım 5.4 mL baz ilavesi ile nötralleştirildi. Asit ile hidroliz işlemi sonucunda ele geçen doğal boya özütüne CUPRAC ve AlCl₃/potasyum asetat yöntemleri uygulanarak toplam antioksidan kapasiteleri $\mu\text{mol QR/g}$ eşdeğeri cinsinden elde edilmiştir (Tablo 4.34).

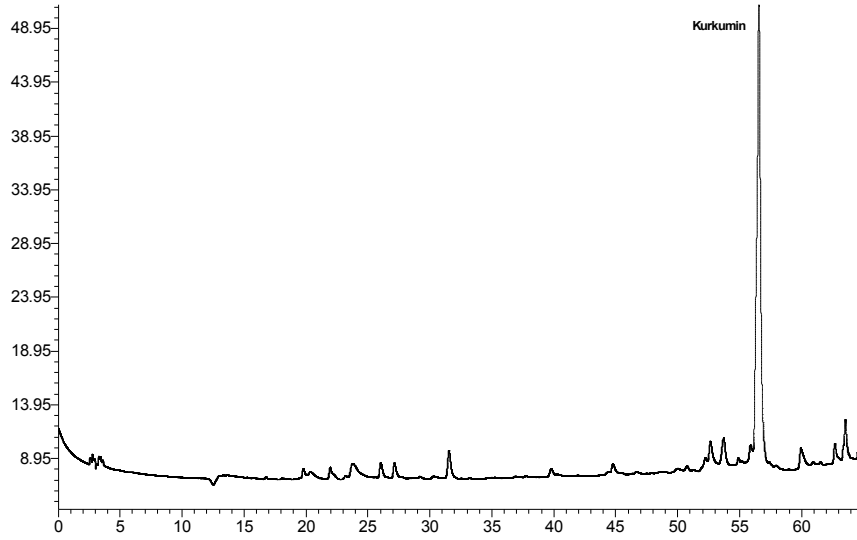
Tablo 4.34: Rubia Tinctorum L. (Kökboya) doğal boyası ile boyanmış iplik örneğinin belirlenen kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değeri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek)

Boyanmış Tekstil	QREFC _(CUPRAC) $\mu\text{molQRxg}^{-1}$	QREFC _(AlCl₃) $\mu\text{molQRxg}^{-1}$
Rubia Tinctorum L. ile boyanmış tekstil	12.3	2.06

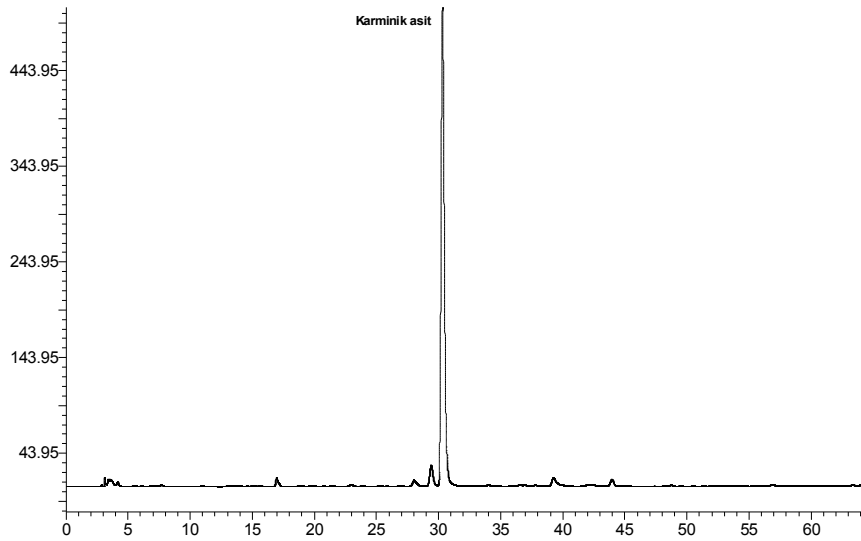
4.5.3. Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) Doğal Boyalarının HPLC Analizi

Doğal boya örneklerinden alınan 1 gramlık tartımlar, 100 mL %50 metanol-su karışımı ile geri soğutucu eşliğinde 80 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dakika süre ile ekstrakte edildi. Ele geçen özütler yapılan gerekli seyreltme işlemlerinin ardından HPLC enjeksiyonu yapıldı.

Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) doğal boya özütlerinin HPLC kromatogramları Şekil 4.47 ve 4.48’de görülmektedir.



Şekil 4.47: Curcuma Longa L. (Zerdeçal) özütü kromatogramı



Şekil 4.48: Coccus İlicis (Koşnil) özütü kromatogramı

Curcuma Longa L. (Zerdeçal) özütünün HPLC analizinde standart madde katkısı yapılarak; kurkumin belirlenmiştir (Şekil 4.47).

Coccus İlicis (Koşnil) özütünün HPLC analizinde standart madde katkısı yapılarak; karminik asit belirlenmiştir (Şekil 4.48).

Tablo 4.35'te Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) doğal boya özütlerine ait toplam flavonoid kapasite değerleri görülmektedir.

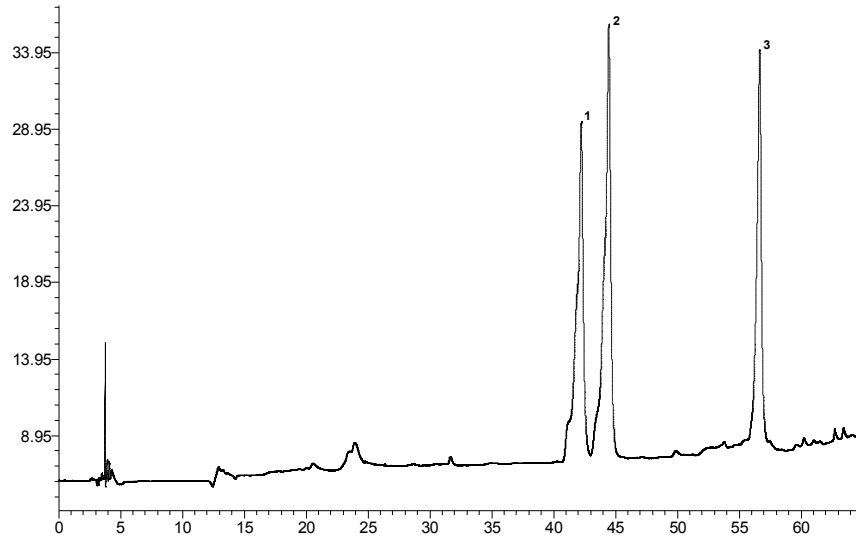
Tablo 4.35: Curcuma Longa L. (Zerdeçal) ve Coccus İlicis (Koşnil) doğal boya örneklerinde belirlenen kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri ($\mu\text{mol QR/g}$ örnek)

Doğal Boya	CUPRAC	AlCl_3	HPLC (CUPRAC)	HPLC (AlCl_3)
Curcuma Longa L.	41	182	31.2	167
Coccus İlicis	131.4	33.5	115.4	38.2

4.6. SENTETİK KARIŞIMLARIN ANALİZ SONUÇLARI

4.6.1. Sentetik Karışım-1

Şekil 4.49'da Sentetik Karışım-1'e ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 4.49: Sentetik Karışım-1'in kromatogramı

1.pik: Kuersetin, 2.pik: Luteolin, 3.pik: Kurkumin

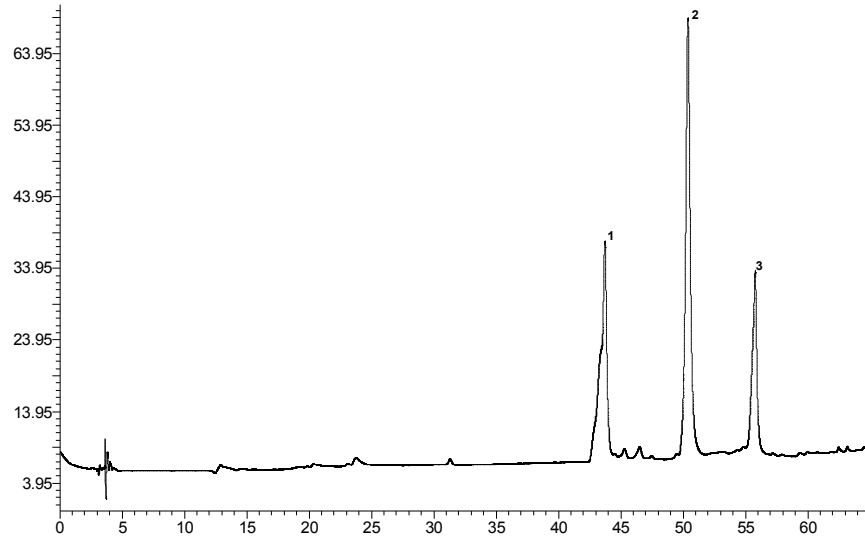
Tablo 4.36'da Sentetik Karışım-1 için hesaplanan toplam flavonoid içerik değerleri (mM QR-eşdeğeri) görülmektedir.

Tablo 4.36: Sentetik Karışım-1'in kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri (mM QR-eşdeğeri)

ÖRNEK	CUPRAC	AlCl ₃	HPLC (CUPRAC)	HPLC (AlCl ₃)
Sentetik Karışım-1	0.196	0.417	0.181	0.388

4.6.2. Sentetik Karışım-2

Şekil 4.50'de Sentetik Karışım-2'ye ait kromatogram görülmektedir.



Şekil 4.50: Sentetik Karışım-2'nin kromatogramı

1.pik: Luteolin, 2.pik: Alizarin, 3.pik: Kurkumin

Tablo 4.37'de Sentetik Karışım-2 için hesaplanan toplam flavonoid içerik değerleri (mM QR-eşdeğeri) görülmektedir.

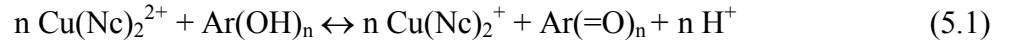
Tablo 4.37: Sentetik Karışım-2'nin kuersetin eşdeğeri flavonoid konsantrasyon değerleri (mM QR-eşdeğeri)

ÖRNEK	CUPRAC	AlCl ₃	HPLC (CUPRAC)	HPLC (AlCl ₃)
Sentetik Karışım-2	0.145	0.302	0.153	0.316

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda daha önce 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi' olarak adlandırılmış ve kısaca CUPRAC Yöntemi [4] olarak dünya literatürüne kazandırılmış olan, spektrofotometrik yolla antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılan yöntem, bu tez çalışmasında doğal boyalarda bulunan fenolik bileşiklere (flavonoid, curcuminoid, antrakınon vb.) ve gerçek doğal boya örneklerine uygulanarak toplam flavonoid kapasite tayininde kullanılmıştır. CUPRAC yöntemi ile bulunan toplam flavonoid kapasite referans yöntem olarak kullanılan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemiyle [5] karşılaştırılmıştır.

CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan $Cu(II)-Nc$ reaktifi, polifenollerle ($Ar(OH)_n$) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:



Bu reaksiyonda, polifenollerin uygun konumlanmış reaktif $Ar-OH$ grupları karşılık olan kinon bileşiklerine dönüşürken, $Cu(II)-Nc$ ise 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren $Cu(I)-Nc$ kelatına dönüşmektedir. $Cu(I)-Nc$, yüksek molar absorbtiviteli bir yük-transfer kompleksidir.

Referans yöntem olarak kullanılan $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin esası, $AlCl_3$ 'ün flavonoidler ile reaksiyonu sonucunda renkli kompleks formlarının oluşmasıdır [32]. Flavonoidlerin, flavon (krisin, apigenin, luteolin, vb.) ve flavonol (kuersetin, mirisetin, morin, rutin, vb.) gruplarının C-5 hidroksil ve C-4 keto gruplarıyla $Al(III)$ 'ün reaksiyonu sonucunda oluşan stabil kelat formu referans bileşik olarak seçilen kuersetinin maksimum absorpsiyon gösterdiği 427 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Flavonoidlerin flavanon ve flavanonol grupları bu reaksiyonu vermemektedir [33].

$AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminin optimum çalışma şartlarını belirlemek amacıyla bir dizi uygulama yapılmıştır. Bunlar sırasıyla inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi, inkübasyon süresinin belirlenmesi, pH çalışması ve değişik seyrelme oranlarındaki sonuçların lineerliğinin incelenmesidir. Yapılan çalışmalar sonucunda inkübasyonun oda sıcaklığında yarım saat süre ile yapılması ve yöntemin nötral pH'da uygulanması uygun görülmüştür (Şekil 4.2, 4.3, 4.4). Yapılan seyrelme çalışması sonucunda ise lineer bir doğru elde edilmiştir (Şekil 4.5).

Doğal boyalarda bulunduğu bilinen fenolik bileşiklerden, ellagik asit (basit fenolik asit); kateşin, rutin, mirisetin, luteolin, kaemferol, apigenin, morin ve fisetin (flavonidler); kurkumin (kurkuminoid), karminik asit, purpurin ve alizarin (antrakinonlar) bileşiklerinin standart çözeltileri hazırlanmış ve $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi kullanılarak fenolik bileşiklerin molar absorblama katsayıları belirlenmiştir (Tablo 4.15). Molar absorblama katsayısı, analizlenen fenolik bileşiğin lineer kalibrasyon denkleminde bulunan eğime karşılık gelmektedir. Fenolik bileşiklerin molar absorblama katsayıları incelendiğinde kateşinin çok düşük olan ϵ değeri görülmektedir. Bunun nedeni $Al(III)$ 'ün kateşinin 3',4'-kateşol kısmı ile oluşturduğu kelat formudur. Çünkü oluşan bu kelat formu konjugasyon eksikliğinden dolayı renksiz olmaktadır. Buna karşın diğer polihidroksi ketonlardan kuersetin, rutin, fisetin, morin, mirisetin, kaemferol, luteolin ve apigenin açıkça yüksek ϵ değerlerine sahiptirler. Kateşin, 4-okso grubuyla birlikte konjugasyonu sağlayan 2,3-çifte bağından yoksundur ve bu yüzden kateşinin A ve B halkaları, C-halkası üzerinden konjugasyon ile birbirine bağlanamamaktadır. Renk ve bileşimle ilgili temel bilgiler ışığında, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri yanında bütünüyle konjuge molekül içindeki yük transfer etkileşimleri, HOMO (en yüksek işgal edilmiş molekül orbital) ile LUMO (en düşük işgal edilmemiş molekül orbital) enerji düzeylerini birbirine yaklaştırarak görünür alandaki elektromanyetik spektrumda şiddetli absorpsiyon bantlarına yol açmaktadır. Bu nedenle olası Al -kateşin kelatının konjugasyonundaki eksiklik çok düşük ϵ değerinin elde edilmesine sebep olmaktadır.

Aynı fenolik bileşiklerin tayini CUPRAC yöntemi ile de gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.31). Cu(II) iyonu indirgeme denemesi temelde flavonoid bileşiğin indirgeme yeteneğine bağlıdır [4,34,35]. Sonuçlar incelendiğinde apigeninin, uygulanan bileşikler arasında en düşük molar absorblama katsayısına sahip olduğu görülmektedir. Apigenin ve luteolin çok benzer yapılarda olmasına rağmen, ikincisi daha yüksek ϵ değeri göstermektedir. Apigeninden farklı olarak luteolinin 3',4'-kateşol kısmı daha düşük potansiyelde oksidasyona uğrar. Apigenin ve luteolinin çevrimsel voltametri (CV) ile ölçülen ilk anodik pik potansiyelleri pH=7.2'de sırasıyla 0.721 ve 0.253 V'tur [36]. CUPRAC reaktifini oluşturan bis(neokuproin)bakır(II) kelatı için ölçülen redoks potansiyeli 0.6 V'tur ve bu potansiyel değerine neokuproinin Cu(II) ve Cu(I) kelatlarının bağlı stabilite sabitleri dikkate alınarak ulaşılmıştır [37]. Bu yüzden apigeninin bakır(II)-neokuproin oksidasyonu, CUPRAC protokol süresinde (30 dakika) tamamlanamaz. Bunun nedeni de apigeninin yüksek oksidasyon potansiyelidir ve böylece apigenin için düşük ϵ değeri elde edilmektedir.

Analizlenen fenolik bileşikler için hem CUPRAC hem de $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri ile elde edilen molar absorblama katsayıları referans bileşik olarak seçilen kuersetinin molar absorblama katsayısına bölünerek ($\epsilon_{\text{fenolik}} / \epsilon_{\text{QR}}$) aynı şartlarda karşılaştırma yapılabilecek kuersetin (QR) eşdeğeri flavonoid konsantrasyonu (QREFC) katsayıları elde edilmiştir (Tablo 4.15 ve 4.31).

Fenoliklerin dörtlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımları hazırlanmış ve uygun çözeltiler ile seyrelmelerinin ardından flavonoid kapasiteleri, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.16). Sentetik karışımlar için teorik olarak beklenen kapasite ile deneysel olarak gözlenen kapasitelerin (mM QR-eşdeğeri) birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Elde edilen doğal boya özütlerine (Rubia Tinctorum L., Curcuma Longa L., Alkanna Tinctoria, Matricaria Chamomilla, Coccus İlicis) kuersetin standart katkısı yapılmış ve hem CUPRAC hem de $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri için standart katkı grafikleri oluşturulmuştur. Standart katkı grafiklerinde oluşturulan lineer eğrilerin oldukça iyi paralellik gösterdiği görülmektedir (Şekiller 4.34-4.43). Buradan

çıkan sonuca göre, gerçek karışım çözelti bileşenleri ile saf fenolik bileşik arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin (Beer Kanunu'ndan kimyasal sapma) olmadığı ve absorbansların toplamsal olduğu her iki yöntem için de ortaya konulmuştur.

Tablo 4.33'te doğal boya özütlerinin CUPRAC ve $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri sonuçları QR eşdeğeri ($\mu\text{mol QR g}^{-1}$ katı madde) olarak özetlenmiştir. Boya özütlerinin CUPRAC yöntemine göre bulunan toplam flavonoid konsantrasyonları büyükten küçüğe şöyle sıralanmaktadır: *Coccus İlicis* > *Matricaria Chamonilla* > *Curcuma Longa L.* > *Rubia Tinctorum L.* > *Alkanna Tinctoria*. $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre bulunan toplam flavonoid konsantrasyonları ise büyükten küçüğe şöyle sıralanmaktadır: *Curcuma Longa L.* > *Coccus İlicis* > *Rubia Tinctorum L.* > *Matricaria Chamonilla* > *Alkanna Tinctoria*. *Rubia Tinctorum L.* doğal boyasının asli komponenti olan alizarin, CUPRAC yöntemi ile 0.53 QREFC değeri verirken, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ile 0.14 QREFC değerini vermiştir. *Curcuma Longa L.* doğal boyasının asli komponenti olan kurkumin, CUPRAC yöntemi ile 0.40 QREFC değeri verirken, $AlCl_3$ /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemi ile 2.53 QREFC değerini vermiştir. Ölçülen fenoliklerin bireysel QREFC katsayılarındaki farklılıklara koşut olarak ölçülen boya özütlerinin toplam flavonoid konsantrasyonları sıralamasında her iki yöntemin analiz bulgularında da farklar görülmektedir.

Tablo 4.32'ye bakıldığında HPLC analizi yapılan polifenoliklerin kromatografik pik alanları ile konsantrasyonlarından elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri gösterilmiştir. Tablo 4.32'de verilen kalibrasyon denklemlerindeki kullanılan parametreler, y pik alanı için, c fenolik molar konsantrasyonu ve r lineer korelasyon katsayısıdır. *Curcuma Longa L.* ve *Coccus İlicis* doğal boyalarında bulunan fenoliklerin HPLC tanımlaması yapıldıktan sonra fenoliklerin HPLC kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak toplam flavonoid konsantrasyonları analizi yapılmıştır (Tablo 4.35). Doğal boya örneklerinin teorik toplam flavonoid konsantrasyonları (5.2) denklemi kullanılarak bulunmuştur. İlgili denklemden elde edilen teorik toplam flavonoid kapasiteler ile spektrofotometrik olarak CUPRAC ve $AlCl_3$ /potasyum asetat yöntemleri ile bulunan değerler Tablo 4.35'te karşılaştırılmıştır.

$$\text{TFC}_{\text{theoretical}} = \sum_{i=1}^n c_i (\text{QREFC})_i \quad (5.2)$$

Doğal boyalarda bulunduğu bilinen fenolik bileşenlerin çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanan sentetik karışımların analizi spektrofotometrik olarak hem CUPRAC hem de AlCl_3 /potasyum asetat yöntemleri ile yapılmış ve toplam flavonoid kapasiteleri belirlenmiştir. Tablo 4.36 ve 4.37 incelendiğinde sentetik karışımlar için deneysel olarak spektrofotometrik yöntemlerle bulunan toplam flavonoid konsantrasyon değerleri ile HPLC analizi ile elde edilen toplam flavonoid konsantrasyon değerleri görülmektedir. Sentetik karışımlar için CUPRAC yöntemi ile elde edilen değerler ile hesaplanan teorik HPLC-CUPRAC sonuçları büyük yakınlık göstermektedir. Aynı sonuçlar referans yöntem olarak uygulanan AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntem bulgularında da görülmektedir. Buradan çıkan sonuca göre kompleks boya karışımı içinde bulunan tüm fenoliklerin HPLC tekniği ile tanımlanması, ölçülmesi ve sonuçların doğrulaması yapılmıştır. Böylece uygulanan spektrofotometrik yöntemlerle (CUPRAC ve AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemleri) HPLC analizinin sonuçlarının uyumu gözlenmiştir. Bir diğer deyişle karmaşık bir boya özütünün HPLC tekniğiyle tanımlanan ve miktarlandırılan flavonoid bileşenlerinin konsantrasyonları, bunların verilen bir spektrofotometrik yöntemle göre kuersetin eşdeğeri kapasite katsayılarıyla çarpılır ve bu çarpımlar (karışımı oluşturan) tüm bileşenler için toplanırsa, elde edilen sonuç o spektrofotometrik yöntemle göre bulunan (kuersetin eşdeğeri) kapasiteye yaklaşık eşit bulunur. HPLC referans yöntemine karşı valide edilen her iki spektrofotometrik yöntem, doğal boya örneklerinin flavonoid kapasitelerinin bulunması için önerilmektedir. Önerilen bu yöntemlerle tarihsel tekstillerin içerdikleri boyalar yoluyla karakterizasyonunda belirli kolaylıklar sağlanacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın bulgularının zaman içinde tekstil ve boya analitik kimyası ile arkeometriye katkı getireceği varsayılabilir.

KAYNAKLAR

1. P.C. CREWS, 1987, "The fading rates of some natural dyes", *Studies in Conservation*, 32, 65-72.
2. I. SUROWIEC, J. ORSKA-GAWRYS, M. BIESAGA, M. TROJANOWICZ, M. HUTTA, R. HALKO, K. URBANIAK-WALCZAK, 2003, "Identification of natural dyestuff in archeological coptic textiles by HPLC with fluorescence detection", *Analytical Letters*, 36, 1211-1229.
3. X. ZHANG, R.A. LAURSEN, 2005, "Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS", *Anal. Chem.*, 77, 2022-2025.
4. R. APAK, K. GÜÇLÜ, M. ÖZYÜREK, S. E. KARADEMİR, 2004, "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method", *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7970-7981.
5. R. WOISKY and A. SALATINO, 1998, "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control", *J. Apicultural Res.*, 37, 99-105.
6. K. G. GILBERT & D. T. COOKE, 2001, "Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential", *Plant Growth Regulation*, 34, 57-69.
7. E. DÖLEN, 1992, "Tekstil Tarihi", *Marmara Üniv. Tek. Eği. Fak. Yayınları*, Yayın no 6.
8. F. DELGADO-VARGAS, O. PAREDES-LÓPEZ, 2003, "Natural colorants for food and nutraceutical uses", *CRC Press*.
9. Ö. SEÇMEN, Y. GEMİCİ, E. LEBLEBİCİ, G. GÖRK, L. BEKAT, 1989, "Tohumlu Bitkiler Sistematiği", *Ege Üniv. Fen Fak. Kitaplar Serisi*, No 116.
10. N. ENES, 1987, "Doğal boyamacılık, Anadolu'da yün boyamacılığında kullanılmış olan bitkiler ve doğal boyalarla yün boyamacılığı", *Marmara Üniv. Yayınları*, Yayın no 449.
11. K. E. HEIM, R. TAGLIAFERRO, D. J. BOBILYA, 2002, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

12. C. A. RICE-EVANS, N. J. MILLER, G. PAGANGA, 1997, "Antioxidant properties of phenolic compounds", *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
13. C. A. RICE-EVANS, N. J. MILLER, G. PAGANGA, 1996, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
14. C. A. RICE-EVANS, N. J. MILLER, P. G. BOLWELL, P. M. BRAMLEY, J. B. PRIDHAM, 1995, "The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids", *Free Radical Research*, 22, 375-383.
15. H. KESKİN, G. ERKMEN, 1987, "Besin Kimyası", Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
16. E. CADENAS, L. PACKER, 2002, "Handbook of Antioxidants", *Marcel Dekker*, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5.
17. G. CAO, E. SOFIC, R.L. PRIOR, 1997, "Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships", *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 749-760.
18. S. BURDA, W. OLESZEK, 2001, "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
19. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P., K., J., 1992, "Phenolic antioxidants", *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.
20. A. MORA, M. PAYA, J. L. RIOS, M. J. ALCARAZ, 1990, "Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation", *Biochemistry and Pharmacology*, 40, 793-797.
21. A. S. PANNALA, T. S. CHAN, P. J. O'BRIEN, C. A. RICE-EVANS, 2001, "Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, Biochemistry", *Biophysics Research Communication*, 282, 1161-1168.
22. S. BURDA, W. OLESZEK, 2001, "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.
23. R. J. WILLIAMS, J. P. E. SPENCER, C. RICE-EVANS, 2004, "Flavonoids: Antioxidants or Signaling Molecules", *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
24. M. J. CASAS-CATALAN, M. T. DOMENECH-CARBO, 2005, "Identification of natural dyes used in works of art by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry combined with in situ trimethylsilylation", *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 259-268.

25. S. M. HALPINE, 1996, "An improved dye and lake pigment analysis method for high-performance liquid chromatography and diode-array detector", *Studies in Conservation*, 41, 76-94.
26. I. KARAPANAGIOTIS, A. TSAKALOF, Y. CHRYSSOULAKIS, 2005, "Identification of red natural dyes in post-Byzantine icons by HPLC", *Jour. of Liq. Chroma. & Related Tech.*, 28, 739-749.
27. I. SUROWIEC, J. ORSKA-GAWRYS, M. BIESAGA, M. TROJANOWICZ, M. HUTTA, R. HALKO, K. URBANIĄK-WALCZAK, 2003, "Identification of natural dyestuff in archeological coptic textiles by HPLC with fluorescence detection", *Analytical Letters*, 36, 1211-1229.
28. R. D. GILLARD, S. M. HARDMAN, R. G. THOMAS, D. E. WATKINSON, 1994, "The detection of dyes by FTIR microscopy", *Study in Conservation*, 39, 187-192.
29. P. GUINOT, A. ROGE, A. GARGADENNEC, M. GARCIA, D. DUPONT, E. LECOEUR, L. CANDELIER, C. ANDARY, 2006, "Dyeing plants screening: an approach to combine past heritage and present development", *Society of Dyers and Colourists, Color. Technol.*, 122, 93-101.
30. I. JOOSTEN, M. R. VAN BOMMEL, R. HOFMANN-DE KEIJZER, H. RESCHREITER, 2006, "Micro analysis on Hallstatt textiles: colour and condition", *Microchim. Acta*, 155, 169-174.
31. A. DOMENECH-CARBO, T. DOMENECH-CARBO, C. SAURI-PERIS, J. V. GIMENO-ADELANTADO, F. BOSCH-REIG, 2005, "Identification of curcuma and safflower dyes by voltammetry of microparticles using parafin-impregnated graphite electrodes", *Microchim Acta*, 152, 75-84.
32. T. J. MABRY, K. R. MARKHAM, M. B. THOMAS, 1970, "The systematic identification of flavonoids", *Springer-Verlag*, New York, USA.
33. C. C. CHANG, M. H. YANG, H. M. WEN, J. C. CHERN, 2002, "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods", *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
34. R. APAK, K. GÜÇLÜ, M. ÖZYÜREK, S. E. ÇELİK, 2008, "Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay", *Microchim. Acta*, 160, 413-419.
35. R. APAK, K. GÜÇLÜ, B. DEMİRATA, M. ÖZYÜREK, S. E. ÇELİK, B. BEKTAŞOĞLU, K. I. BERKER, D. ÖZYURT, 2007, "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay", *Molecules*, 12, 1496-1547.

36. J. KOYAMA, I. MORITA, N. KOBAYASHI, T. KONOSHIMA, M. TAKASAKI, T. OSAKAI, H. TOKUDA, 2008, "Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein–Barr virus activation of flavonoids", *Cancer Letters*, 263, 61-66.
37. E. TÜTEM, R. APAK, F. BAYKUT, 1991, "Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II)", *Analyst*, 116, 89-94.
38. L. YILDIZ, K. SÖZGEN BAŞKAN, E. TÜTEM, R. APAK, 2008, "Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves and nettle", *Talanta*, 77, 304-313.
39. M. ÖZYÜREK, K. GÜÇLÜ, B. BEKTAŞOĞLU, R. APAK, 2007, "Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La(III) complexes", *Analytica Chimica Acta*, 588, 88-95.

ÖZGEÇMİŞ

25.09.1983 yılında İstanbul'da doğdum. 1989 yılında başladığım ilköğrenimimi Mahmut Erseven İlköğretim ve Nilüfer Hatun İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra 1997 yılında Beşiktaş Lisesi'nde öğrenim gördüm. Lise öğrenimim ardından 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Bölümünü kazandım. 2005 yılında Kimya Bölümü'nden mezun oldum. 19.10.2005 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.