

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

**BAZI BİTKİSEL ÜRÜNLERİN FERULİK
VE KAFEİK ASİT İÇERİKLERİNİN
VOLTAMETRİK TAYİNİ**

**SEVİNÇ GÜLYÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2016**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BİTKİSEL ÜRÜNLERİN FERULİK VE
KAFEİK ASİT İÇERİKLERİNİN
VOLTAMETRİK TAYİNİ

SEVİNÇ GÜLYÜZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
ÖĞR. GÖR. DR. NACİYE ÖZTÜRK

GEBZE
2016

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**DETERMINATION OF FERULIC AND
CAFFEIC ACID IN SOME HERBAL
PRODUCTS BY VOLTAMMETRIC
METHODS**

SEVİNÇ GÜLYÜZ

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

THESIS SUPERVISOR
DR. NACİYE ÖZTÜRK

GEBZE
2016



GEBZE TEKNİK
ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/01/2016 tarih ve 2016/05 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/02/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan SEVİNÇ GÜLYÜZ' ün tez çalışması Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Öğr. Grv. Dr. Naciye ÖZTÜRK

ÜYE

: Doç. Dr. Pınar ERGENEKON

ÜYE

: Prof. Dr. Faruk YILMAZ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Fenolik asitler antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Bitkisel kaynaklarda çoğunlukla diğer antioksidan özelliği olan bileşiklerle birlikte önemli miktarda bulunurlar. Antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklerin hastalıklardan korunma ve sağlıklı beslenmede önemli olmaları sebebiyle bitkisel besin kaynaklarında içeriklerinin belirlenmesi önemlidir.

Voltametik analiz yöntemleri, yüksek duyarlılıkları ve seçicilikleri yanında hızlı, kolay ve düşük maliyetli olmaları sebebiyle, organik ve inorganik türlerin kalitatif ve kantitatif analizlerde yaygın olarak kullanılırlar. Son yıllarda yeni malzemelerin geliştirilmesi ile araştırmalarda kullanılan elektrot çeşitleri seçicilik ve duyarlılığı artırma amaçlı geliştirilmektedir. Bu tez kapsamında antioksidan değeri olduğu bilinen ferulik ve kafeik asidin bazı bitkisel ürünlerde voltametik tayinleri amaçlanmıştır. Çalışmada, camsı karbon (glassy carbon, GC) ve kenar düzlem pirolize grafit (edge plane pyrolytic graphite, EPPG) elektrotları ile döngüsel voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemleri kullanılarak ferulik ve kafeik asidin elektrokimyasal oksidasyonu, pH, derişim ve tarama hızı parametrelerinin etkileri incelendi. Seçilen yöntem ve parametreler kullanılarak ferulik ve kafeik asidin standart çözeltileri ile kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Kafeik asit için DPV ve GC elektrot ile bulunan doğrusal aralık 2,86-36,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$, DPV ve EPPG elektrot ile bulunan doğrusal aralık 0,34-30,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dir. Ferulik asit için DPV yöntemi ve EPPG elektrot ile bulunan doğrusal aralık 0,34-13,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dir. Kafeik asidin GC elektrotta tayin sınırı ve gözlenebilme sınırı 1,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ve 4,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=8), EPPG elektrotta ise 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ve 0,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=10) olarak bulundu. Ferulik asidin EPPG elektrottaki LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ve 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=8) olarak belirlendi. DPV yöntemi ve EPPG elektrot ile bazı bitki çaylarında kafeik asidin tespiti için uygulandı ve geri kazanım 97,2-102,3 % arasında elde edildi.

Anahtar Kelimeler: Ferulik asit, kafeik asit, camsı karbon elektrot (GCE), kenar düzlem pirolize grafit elektrot (EPPGE), döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV).

SUMMARY

Phenolic compounds (such as ferulic and caffeic, coumaric, sinapic acid and flavonoids) having antioxidant properties are abundantly found in herbal products. These compounds have an important role in human health and nutrition.

Voltammetric analysis methods are widely used in both qualitative and quantitative analysis of organic or inorganic species because of their high sensitivity, selectivity ease of use, speed and low costs. In recent years, by use of new materials, electrodes have been developed to enhance the sensitivity and selectivity. In this thesis, the electrochemical oxidation of ferulic acid and caffeic acid which have antioxidant properties were investigated by using cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) methods in acetate buffer pH 4, on glassy carbon electrode (GCE) and edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE). The pH, concentration and scan rate parameters were investigated and then the calibration graphs were obtained. Linear ranges were attained 2,86-36,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for caffeic acid by GC electrode and 0,34-30,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for caffeic acid by EPPG electrode and 0,34-13,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for ferulic acid by EPPG electrode from calibration graphs by DPV method. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values were found to be 1,43 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 4,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=8) for of caffeic acid at the GC electrode and 0,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0,44 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=10) at the EPPG electrode. LOD and LOQ values for ferulic acid were determined as 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (N=8) at the EPPG electrode, respectively. This method has been applied to detect contents of caffeic acid in some herbal teas and the recovery was obtained from 97,2-102,3 %.

Key Words: Ferulic acid, caffeic acid, glassy carbon electrode (GCE), edge plane pyrolytic graphite electrode (EPPGE), cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, her konuda bana destek olan, bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, hoşgörüsünü esirgemeyen değerli danışman hocam Öğr. Grv. Dr. Naciye ÖZTÜRK'e sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında laboratuvarlarında çalışmamı sağlayan, ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Faruk YILMAZ'a, destek ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Munteha ŞAHİN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim, zor zamanlarımda yanımda olan ve beni her konuda cesaretlendiren sevgili Sevgi GÜLYÜZ ve Ümit GÜLYÜZ'e, bugüne kadar maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı	3
2. FENOLİK BİLEŞİKLER	4
2.1. Fenolik Asitler	4
2.2. Flavonoidler	5
3. ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER	6
3.1. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler	6
3.1.1. Doğrusal (Lineer) Taramalı Voltametri	9
3.1.2. Normal Puls Voltametri	9
3.1.3. Diferansiyel Puls Voltametri	10
3.1.4. Kare Dalga Voltametri	11
3.1.5. Döngüsel (Cyclic) Voltametri	11
3.2. Voltametrde Kullanılan Hücre Elemanları	14
3.2.1. Destek Elektrolit	14
3.2.2. Çalışma Elektrodu	15
3.2.3. Referans Elektrot	16
3.2.4. Yardımcı Elektrot	16
4. KAYNAK ARAŞTIRMASI	17
5. DENEYSEL BÖLÜM	20
5.1. Kullanılan Kimyasallar	20
5.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	20
5.3. Elektrot ve Cam Malzemelerin Temizlenmesi	20

5.4. Destek Elektrolit (Tampon) Çözeltilerin Hazırlanması	21
5.5. Standart Ferulik ve Kafeik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması	21
5.6. Bitki Çaylarının Hazırlanması	22
5.7. Oksijenin Uzaklaştırılması	22
5.8. Ferulik ve Kafeik Asidin Elektrokimyasal Davranışı	22
5.8.1. Tarama Hızının Etkisi	23
5.8.2. pH'ın Etkisi	29
5.8.3 Çalışma Elektodunun Seçilmesi	30
5.8.4. Voltametrik Yöntemin Seçilmesi	31
5.8.5. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması	34
5.9. Bitkisel Çaylarda Kafeik Asit Tayini	37
5.9.1. Nane Çayında Kafeik Asit Tayini	40
5.9.2. Civanperçemi Çayında Kafeik Asit Tayini	41
5.9.3. Ada Çayında Kafeik Asit Tayini	42
5.9.4. Biberiye Çayında Kafeik Asit Tayini	43
5.9.5. Pıtrak (<i>Arctium lappa</i>) Çayında Kafeik Asit Tayini	44
5.10. Bitkisel Çay Örneklerinin Kafeik Asit İçeriklerinin Karşılaştırılması ve Geri kazanım Hesabı	45
6. SONUÇLAR	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	53
EKLER	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
A	: Elektrodun yüzey alanı
Ag/AgCl	: Gümüş/ Gümüş klorür
C ₀	: Analit derişimi
°C	: Santigrad derece
D	: Difüzyon katsayısı
E	: Potansiyel
E _p	: Pik potansiyeli
E _{1/2}	: Yarı dalga potansiyeli
E _{pa}	: Anodik pik potansiyeli
E _{pc} , E _{pk}	: Katodik pil potansiyeli
ΔE	: Puls genişliđi
ΔE _p	: Pik potansiyelleri arasındaki fark
ΔE _s	: Kare dalganın basamak yüksekliği
F	: Faraday sabiti
g	: Gram
Hg/Hg ₂ Cl ₂	: Cıva/Cıva (I) klorür
I, i	: Akım
I _p	: Pik akımı
i _{pa}	: Anodik pik akımı
i _{pc} , i _{pk}	: Katodik pik akımı
i _s	: Sınır akım
Δi	: Akımlar arasındaki fark
k _s	: Elektrot reaksiyon hız sabiti
log I _p	: Pik akımının logaritması
log v	: Potansiyel tarama hızının logaritması
ml	: Mililitre
M	: Molar
mM	: Milimolar

mV	: Milivolt
Ms	: Milisaniye
mV/s	: Milivolt/saniye
mol L ⁻¹	: Mol litre ⁻¹
μA	: Mikroamper
μmol L ⁻¹	: Mikromol litre ⁻¹
<i>n</i>	: Aktarılan elektron sayısı
N	: Ölçüm sayısı
Pt	: Platin
<i>p</i> -	: Para
R	: İdeal gaz sabiti
R	: Korelasyon katsayısı
s	: Standart sapma
S/N	: Sinyal/ gürültü
T	: Sıcaklık (Kelvin)
<i>t</i>	: % 95 güven seviyesindeki <i>t</i> değeri
V	: Volt
X _{ort}	: Örneklerin ortalaması
<i>α</i>	: Elektrot reaksiyonunun transfer katsayısı
<i>v</i> ^{1/2}	: Potansiyel tarama hızının karekökü
<i>τ</i>	: Periyot
CV	: Dönüşümlü (Cyclic) Voltametri
CA	: Kafeik asit (Caffeic acid)
ÇE	: Çalışma elektrodu
DPV	: Diferansiyel puls voltametri
DTV	: Doğrusal taramalı voltametri
EPPGE	: Kenar düzlem pirolize grafit (Edge plane pyrolytic graphite electrode)
FA	: Ferulik asit
GCE	: Camsı karbon elektrot (Glassy carbon electrode)
LOD	: Tayin sınırı (Limit of detection)
LOQ	: Kantitatif ölçüm sınırı (Limit of quantification)
NPV	: Normal puls voltametri

RE : Referans elektrodu
SWV : Kare dalga voltametri (Square Wave Voltammetry)
UV : Ultraviyole
YE : Yardımcı elektrot



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
1.1: Antioksidan ve radikal molekülü arasındaki kimyasal reaksiyon mekanizması.	1
2.1: Hidroksibenzoik asit türevleri.	4
2.2: Hidroksisinamik asit türevleri.	5
2.3: Flavonoidlerin iskelet yapısı.	5
3.1: Voltametrde kullanılan zamana karşı potansiyel uyarım sinyalleri ve elde edilen voltamogramların şekilleri.	8
3.2: Doğrusal taramalı voltamogram.	9
3.3: Potansiyel uyarım sinyalleri ve elde edilen voltamogramların şekilleri.	10
3.4: Kare dalga voltamogramı.	11
3.5: Döngüsel voltametrde potansiyelin zamanla değişim grafiği.	12
3.6: CV voltamogramı.	12
3.7: Voltametrik ölçümlerde kullanılan bir hücrenin şeması.	14
3.8: Voltametrde kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırması.	15
5.1: GC elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin CV yönteminde pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi.	23
5.2: EPPG elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi.	24
5.3: Standart ferulik asit çözeltisinin GC ve EPPG elektrotlarının farklı tarama hızlarına göre performanslarının karşılaştırılması.	24
5.4: EPPG elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M kafeik asit çözeltisinin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi.	25
5.5: Ferulik asidin $\log I_{pk} - \log v$ grafiği.	27
5.6: Kafeik asidin $\log I_{pk} - \log v$ grafiği.	27
5.7: Ferulik asidin $I_{pk} - v^{1/2}$ grafiği.	28
5.8: Kafeik asidin $I_{pk} - v^{1/2}$ grafiği.	28
5.9: Farklı pH'da $1,67 \times 10^{-4}$ M ferulik asit çözeltisinin CV voltamogramları ((-0,4 V) - (+0,6 V) potansiyel aralığında; GCE tarama hızı: 0,1 V/s).	29

5.10:	Farklı pH'a sahip destek çözeltilerinde anodik pik akımlarının değişime karşı grafiği.	29
5.11:	$8,3 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltilerinin GC ve EPPG elektrotla ölçülen pik akımlarının CV voltamogramları ((-1,5 V) - (+1,5 V); tarama hızı: 0,1 V/s).	30
5.12:	$1,1 \times 10^{-4}$ M ferulik asit çözeltilerinin asetat tamponunda GC ve EPPG elektrotları ile ölçülen pik akımlarının DPV voltamogramları ((-1,0 V) - (+1,2 V); puls genliği: 0,05 V).	30
5.13:	Farklı derişimlerdeki ferulik asidin CV voltamogramları (EPPG elektrot, (-1,5 V) - (+1,5 V); pH: 4 asetat tamponu; tarama hızı: 0,1 V/s).	32
5.14:	Farklı derişimlerdeki ferulik asidin DPV voltamogramları (EPPG elektrot, (-1,0 V) - (+1,2 V); pH: 4 asetat tamponu; puls genliği: 0,05 V).	32
5.15:	Ferulik asidin EPPG elektrot ile elde edilen CV voltamogramlarının pik akımı - derişim grafiği.	33
5.16:	Ferulik asidin EPPG elektrotta elde edilen DPV voltamogramlarının pik akımı - derişim grafiği.	33
5.17:	Standart ferulik asidin farklı derişimlerdeki EPPG elektrot ile elde edilen DPV voltamogramları.	34
5.18:	Standart kafeik asidin farklı derişimlerdeki EPPG elektrot ile elde edilen DPV voltamogramları.	35
5.19:	Standart kafeik asidin farklı derişimlerdeki GC elektrotta DPV voltamogramları.	35
5.20:	DPV yöntemi ile ferulik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında EPPG elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi $I_p (A) = 0,1381 C_o (mol/L) + 9 \times 10^{-8}$ ($R^2 = 0,9977$) (N=11).	36
5.21:	DPV yöntemi ile kafeik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında EPPG elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi $I_p (A) = 0,1483 C_o (mol/L) + 2 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,9963$) (N=12).	36
5.22:	DPV yöntemi ile kafeik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında GC elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi $I_p (A) = 0,0092 C_o (mol/L) - 1 \times 10^{-9}$ ($R^2 = 0,9969$) (N=8).	37

5.23:	Nane örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğrisi ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliğı: 0.05 V, EPPG elektrot).	40
5.24:	Civanperçemi örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliğı: 0,05 V; EPPG elektrot).	41
5.25:	Ada çayı örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliğı: 0,05 V, EPPG elektrot).	42
5.26:	Biberiye örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliğı: 0,05 V, EPPG elektrot).	43
5.27:	Pıtrak çayı örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliğı: 0,05 V, EPPG elektrot).	44
5.28:	1 g bitki çayında bulunan kafeik asit miktarı.	45

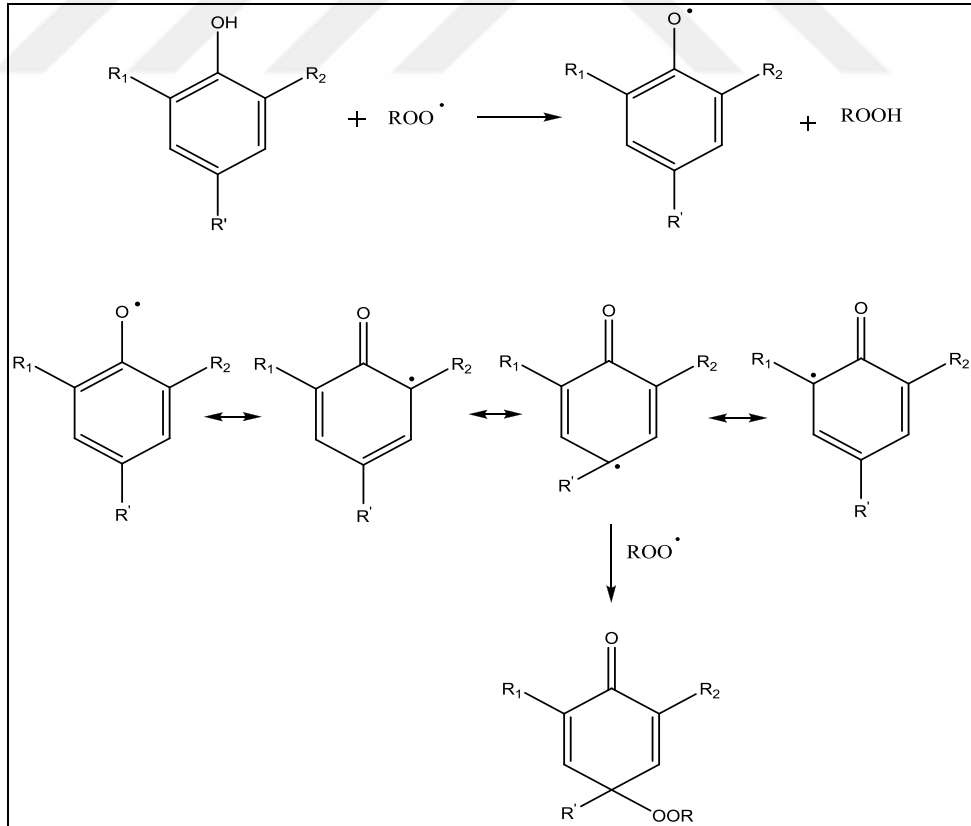
TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
5.1: 0,1 M asetat tamponunda (pH: 4), EPPG elektrot ile $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik ve kafeik asidin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyellerinin tarama hızına göre değişimi.	26
5.2: $8,3 \times 10^{-5}$ M standart ferulik asit için 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) farklı elektrotlarda CV yöntemleri ile elde edilen potansiyel ve pik akımı parametrelerinin karşılaştırılması.	30
5.3: $1,1 \times 10^{-4}$ M ferulik asit için 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) farklı elektrotlarda DPV yöntemleri ile elde edilen potansiyel ve pik akımı parametrelerinin karşılaştırılması.	31
5.4: Farklı standart ferulik asidin çözeltilerinin 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) EPPG elektrotta CV ve DPV yöntemleri ile elde edilen analitik parametrelerinin karşılaştırılması (N=5).	33
5.5: Standart ferulik ve kafeik asitlerinin tayininde 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) DPV yöntemleri ile elde edilen analitik parametrelerinin karşılaştırılması.	37
5.6: Bitki çaylarında kafeik ve ferulik asit içerikleri.	39
5.7: Bitki çaylarının kafeik asit tayininde EPPG çalışma elektrodu ve DPV yöntemi ile elde edilen % geri kazanım değerleri.	46

1. GİRİŞ

Vücutta, stres, sigara, alkol, çevre kirliliği, radyasyon, UV ışınları gibi çevresel faktörlerin etkisi ve hücrelerde meydana gelen çeşitli oksidasyon ve lipid peroksidasyon reaksiyonları sonucu, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), peroksil radikali (ROO^{\cdot}), nitrik oksit radikali (NO^{\cdot}), organik peroksit radikal ($RCOO^{\cdot}$) gibi serbest radikal molekülleri oluşur. Bu radikal moleküllerinin elektronları, hücrede bulunan diğer moleküllerle reaksiyona girerek hücredeki antioksidanlar ile serbest oksijen türleri arasındaki dengeyi bozar ve oksidatif stres oluşturur. Oksidatif stres, vücudun bağışıklık sistemini zayıflatarak, kanser başta olmak üzere kalp ve damar hastalıkları, diyabet, nörolojik rahatsızlıklar gibi birçok hastalığın oluşmasına ve ilerlemesine neden olur [1].

Serbest radikal molekülleri ile reaksiyona girerek onların zararlı etkilerini azaltan veya ortadan kaldıran kimyasal maddelere antioksidan denir [1]. Antioksidan molekülü ve radikal molekülü arasındaki reaksiyon Şekil 1.1’de gösterilmiştir [2].



Şekil 1.1: Antioksidan ve radikal molekülü arasındaki kimyasal reaksiyon mekanizması.

Antioksidanlar doku hücrelerinde oksidasyon reaksiyonlarının oluşumunu azaltarak ve yavaşlatarak vücutta meydana gelen kanser, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıkların oluşma riskini azaltır. Bu maddeler vücutta sentezlendiği gibi gıdalardan da alınabilir [3]. Antioksidanlar sentetik ve doğal olmak üzere ikiye ayrılır.

Sentetik antioksidanlar çoğu zaman gıdalarda raf ömrünü uzatmak ve gıdanın kalitesini arttırmak için katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bunlar başlıca bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer-bütillhidrokinon (TBHQ)'dir. Yirminci yüzyılın başından beri sentetik antioksidanlar, ucuz oldukları için gıdalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bugüne kadar yapılan araştırmalarda sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür.

Doğal antioksidanlar ise bitkilerin yapısında doğal olarak bulunan ve fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkisel kaynaklı besinlerin rengi, tadı ve kokusu üzerinde etkileyici bir role sahiptir. Sebze, meyve, tahıl, çay, bitkisel yağlar gibi gıdalar doğal antioksidan açısından oldukça zengindir [4].

Fenolik bileşiklerin serbest radikal moleküllerini söndürmesi ve lipid peroksidasyonunu önlemesi nedeniyle insan sağlığı için polifenol içeriği zengin gıdaların tüketimi tavsiye edilir. Birçok epidemiyolojik çalışmada polifenoller bakımından zengin sebze ve meyvelerin düzenli tüketilmesi ile kanser ve kardiyovasküler hastalıkların oluşma riskinin azaldığı öne sürülmüştür. Kateşin, epikateşin, p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit gibi fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin yapısında bol miktarda bulunur [5].

Antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler, sebze ve meyvelerin yanı sıra bitki çaylarının yapısında da bol miktarda bulunur. Doğal antioksidanca zengin olan bitki çayları tüketildiğinde insan sağlığının korunmasında ve hastalıkların tedavisinde iyileştirici bir etkiye sahiptir [4]. Bugüne kadar yapılan araştırmalarda bitki çaylarının kronik ve akut, kalp ve damar hastalıkları, karaciğer rahatsızlıkları ve kanser gibi hastalıkların oluşumunu önlediği veya azalttığı bildirilmiştir [6]. Bilimsel araştırmalar sonucunda çayların biyolojik içeriğinin ve faydalarının ortaya konulması, günümüzde bitki çaylarının tüketimini arttırmıştır.

Gıdalarda antioksidan özelliği gösteren fenolik bileşiklerin güvenilir ve pratik metotlarla tayin edilmesi çok önemlidir. Polifenollerin belirlenmesinde spektroskopik, kromatografik ve enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu

yöntemler pahalı ve zaman alıcıdır. Bu nedenle son yıllarda düşük maliyetli, güvenilir, hassas, duyarlı ve numunenin hızlı analizini sağlayan elektrokimyasal yöntemler, fenolik bileşiklerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır [5], [7]-[12]. Bu yöntemler, numunede herhangi bir değişikliğin yapılmasına gerek kalmadan numunenin analizini ve oldukça kompleks biyolojik matrislerde fenolik bileşiklerin belirlenmesi ve ölçülmesine olanak sağlar. Voltametri ve amperometri teknikleri fenolik bileşiklerin elektrokimyasal analizi için kullanılan en yaygın elektrokimyasal yöntemlerdir [5].

1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı

Bu tez kapsamında standart ferulik asit ve kafeik asidin voltametrik yöntemler ile elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve bu yöntemler ile bitki çayların fenolik asit içeriklerinin kantitatif analizi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle pH, derişim, tarama hızı gibi parametreler incelenerek en uygun çalışma koşullarının belirlenmesi ve bu koşullarda miktar tayini çalışmalarının yapılması planlanmıştır.

Deneysel çalışmalar için döngüsel voltametri (CV) ve diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemleri kullanılmıştır. Voltametrik ölçümler için camsı karbon (glassy carbon, GC) ve kenar düzlem pirolize grafit (edge plane pyrolytic graphite, EPPG) elektrotları kullanılmıştır. Uygun çalışma koşullarının belirlenmesinin ardından nane (*Mentha spicata*), civanperçemi (*Achillea millefolium*), ada çayı (*Salvia officinalis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve pıtrak (*Arctium lappa*) çaylarının kafeik asit içeriğinin voltametrik tayini gerçekleştirilmiştir.

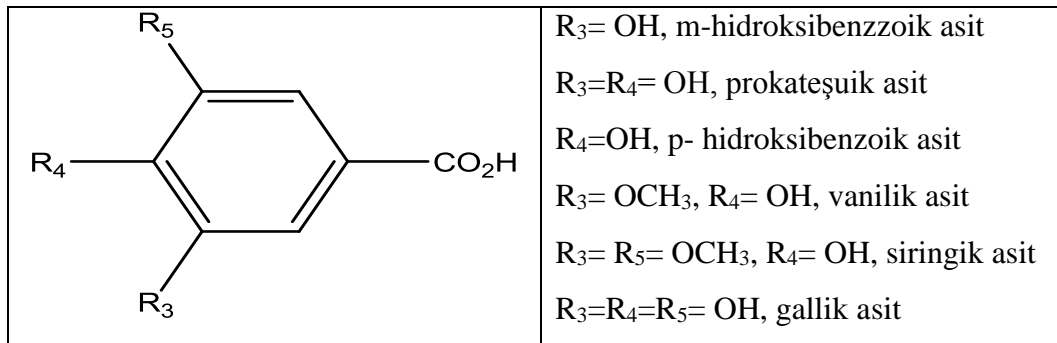
Bu tez çalışmasında fenolik bileşiklerin tayinine yönelik düşük maliyetli, pratik, hızlı, seçici ve güvenilirliği yüksek yeni bir yöntem geliştirmek ve bu yöntemin ticari olarak gıda, ilaç gibi endüstriyel amaçlarda kullanımı ve bilimsel araştırmalara ışık tutması hedeflenmiştir.

2. FENOLİK BİLEŞİKLER

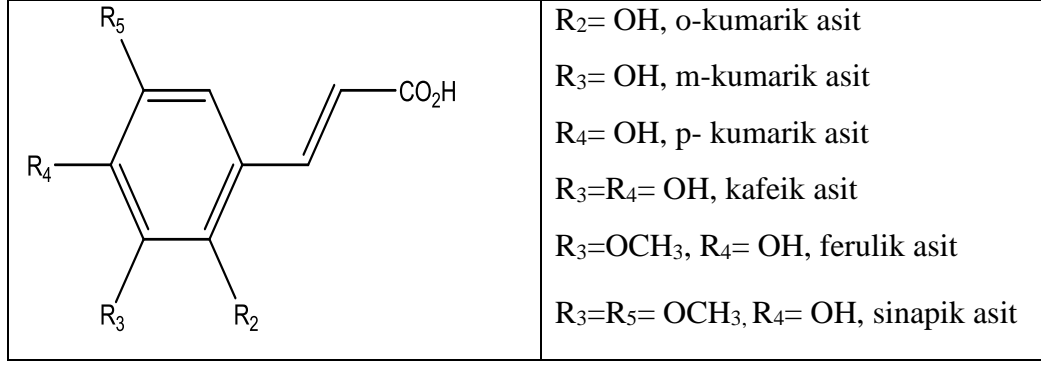
Fenolik bileşikler, yapısında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik bileşiklerdir [5]. Polifenoller ise bir veya daha fazla benzen halkasına bağlı birden fazla fenolik hidroksil grup içeren bileşik gruplarıdır. Sebze ve meyvelerde, tahıl ve çayların tohum, çiçek, yaprak, dal ve gövdelerinde bol miktarda bulunan fenolik bileşikler, genel olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki ana gruba ayrılır [13], [14].

2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler bitkilerde genellikle serbest halde bulunmazlar. Yapısında bulunan karboksil ve hidroksil grupları oldukça aktif olup, karbonhidrat, aminoasit veya protein gibi hücrel metabolitler ile reaksiyona girebilirler. Fenolik asitler yapısal olarak hidrosibenzoik ve hidrosisinamik asitler olmak üzere iki grupta incelenir. Hidrosibenzoik asitler bitkisel gıdalarda çok az miktarlarda bulunmaktadır. Hidrosisinamik asitlerin ise özellikle kumarik, kafeik ve ferulik asit türevleri bitkisel gıdalarda çok az miktarda serbest halde, genellikle hidrosisinamik asitlerin glikozitleri, esterleri ve amitleri şeklinde bolca bulunur. Fenolik asitlerin genel yapısı Şekil 2.1 ve 2.2'de gösterilmiştir [14].



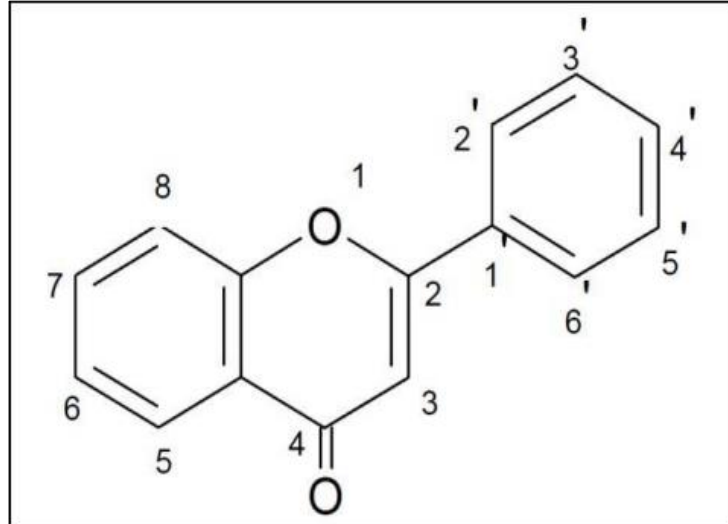
Şekil 2.1: Hidrosibenzoik asit türevleri.



Şekil 2.2: Hidroksisinasamik asit türevleri.

2.2. Flavonoidler

Flavonoidler de gıdalarda en yaygın bulunan fenolik bileşiklerdendir. Serbest radikallerle reaksiyona girerek güçlü antioksidan özelliği gösterirler. 4000'in üzerinde türevi olduğu tahmin edilen flavonoidler elma, baklagiller, çay, soğan ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Bu bileşikler karbonhidratlar ve aminoasitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Flavonoidler farklı moleküler yapılarına göre Flavanonlar, Flavonlar, Flavonoller, Flavan-3-oller, İzoflavonlar şeklinde sınıflandırılabilir. Flavonoidlerin genel iskelet yapısı Şekil 2.3'de verilmiştir [15].



Şekil 2.3. Flavonoidlerin iskelet yapısı.

3. ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLER

Elektrokimya iletken bir maddenin iyonik çözeltisi içerisinde elektrokimyasal bir hücrede gerçekleşen kimyasal reaksiyonların ve maddenin elektriksel özelliklerinin incelenmesine dayanır [16].

Elektrokimyasal veya elektroanalitik yöntemler ölçülen elektriksel sinyalin türüne göre farklılık gösterir. Yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal yöntemlerden Potansiyometri, Voltametri, Amperometri, Kulometri ve Kondüktometri yöntemleri sırasıyla derişim-potansiyel, akım-potansiyel, derişim-akım, akım miktarı ve iletkenlik sinyallerinin ölçülmesi ilkelerine dayanır. Bu yöntemler çok sayıda inorganik ve organik maddenin kalitatif ve kantitatif analizini sağlar. Ayrıca elektrokimyasal ve kimyasal reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasına, kinetik ve adsorpsiyon olaylarının incelenmesine, standart indirgenme potansiyellerinin belirlenmesine, denge sabitlerinin ve difüzyon katsayısının bulunmasına olanak verirler [17], [18].

Elektrokimyasal yöntemler pratik, hızlı, hassas, seçiciliği yüksek ve maliyeti düşük yöntemlerdir. Bu yöntemler son yıllarda spektroskopi ve kromatografi gibi tekniklere alternatif olarak kullanılmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin uygulamalarına sensörler, bataryalar, elektrokimyasal polimerizasyon, iletken polimerler, çevre analizleri örnek verilebilir. Ayrıca bu yöntemler, gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve gıda örneklerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi için uygun yöntemlerdir. Analizler için güvenilir bir teknik olan elektrokimyasal yöntemler fenolik bileşiklerin çok düşük konsantrasyonlarının kantitatif analizini sağlar [5].

3.1. Voltametri ve Voltametrik Yöntemler

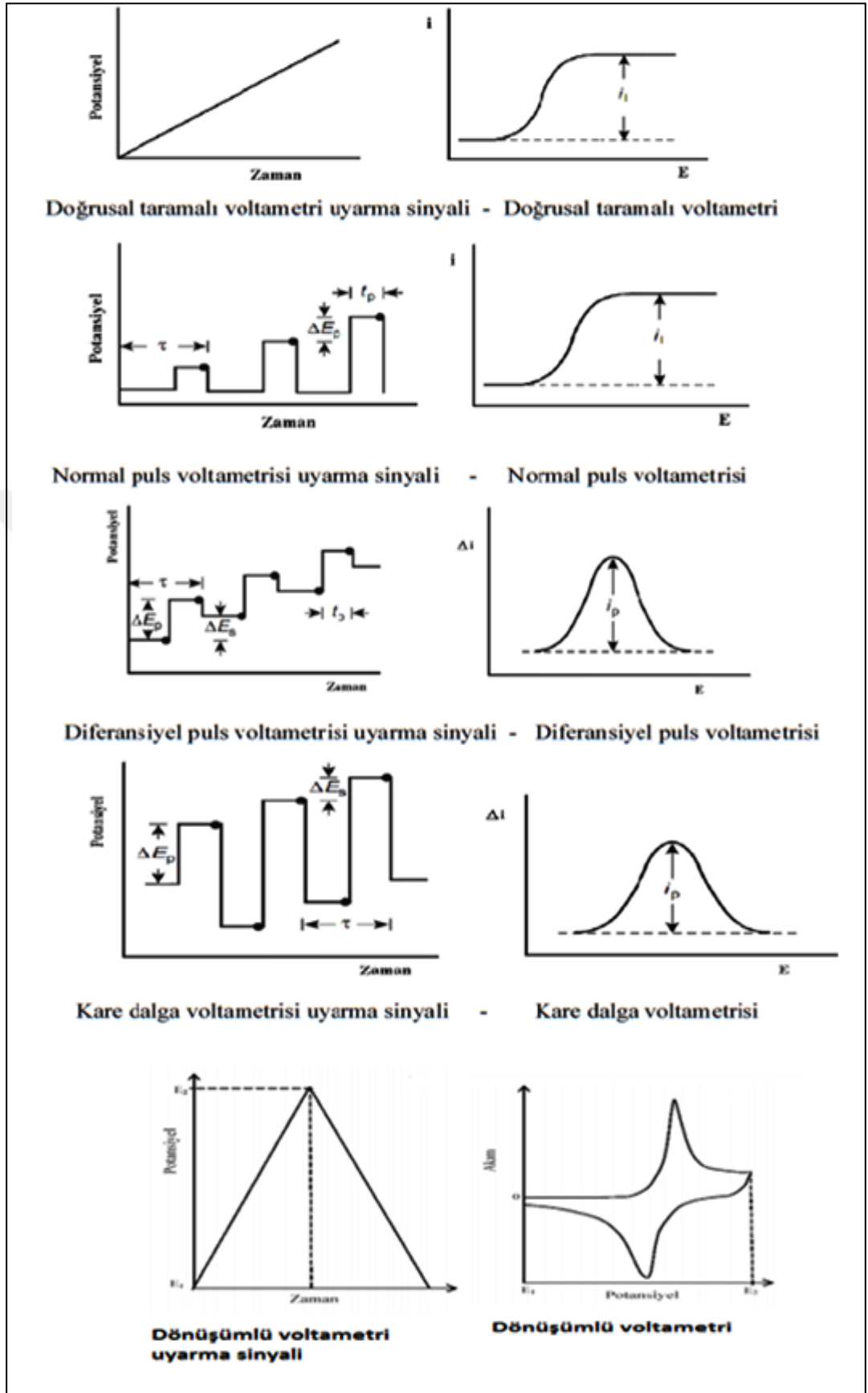
Voltametri bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyele karşılık gelen akımın ölçülmesi ilkesine dayanan elektrokimyasal bir yöntemdir.

Voltametrizde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonları sonucunda oluşur. İndirgenme reaksiyonu sonucu katodik akım, yükseltgenme reaksiyonu sonucu ise anodik akım oluşur. Belirli

potansiyel aralığında ölçülen akım miktarı elektroaktif madde miktarı ile orantılıdır. Voltametrik yöntemlerde akım, potansiyel ve derişim arasındaki ilişki incelenir. Bu ilişkileri gösteren akım-potansiyel eğrilerine voltamogram denir. Çalışma elektrodu olarak cıva damla elektrodunun kullanıldığı voltametrik yöntemlere polarografi, bu yöntem ile elde edilen akım-potansiyel eğrilerine ise polarogram denir [19], [20].

Voltametri ve polarografi yöntemleri elektrot reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, reaksiyonların stokiyometrik ve kinetik özelliklerinin incelemelerinde, element analiz yöntemlerinde, hidroliz, çözünürlük, adsorbsiyon, kompleks oluşumu ve ilaç etken maddeleriyle ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılan elektrokimyasal yöntemlerdir. Voltametrik yöntemler, düşük derişimlerde numune analizlerinin yapılabilmesi, numunelerin kolayca ve çok kısa bir sürede hazırlanabilmesi, analiz sırasında çok az miktarda numuneye ihtiyaç duyulması, analiz süresinin kısa olması, herhangi bir ayırma işlemine gerek olmadan analizlerin yapılabilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca bu yöntemlerin diğer bir avantajı da ekonomik olmasıdır [21].

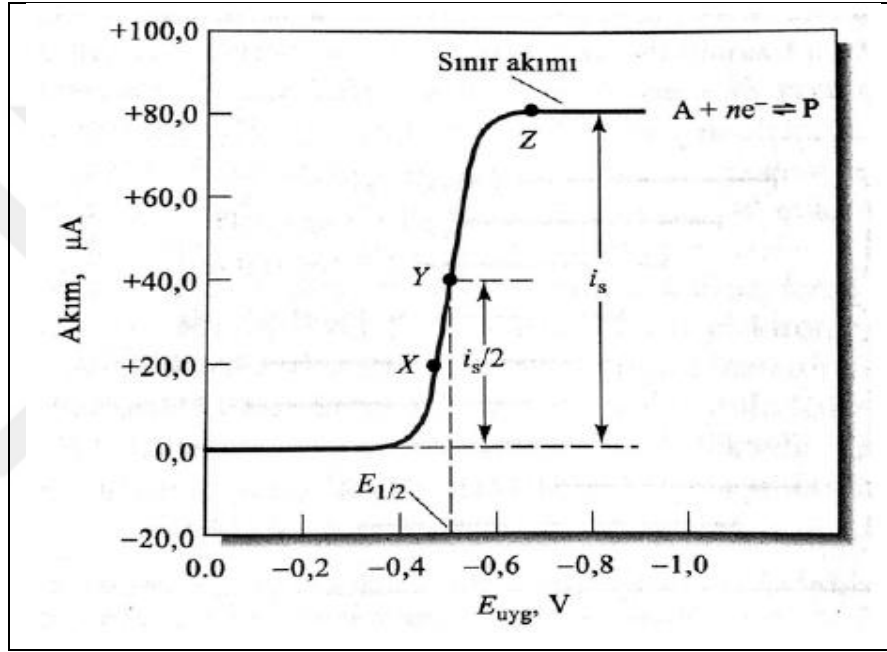
Voltametrik yöntemler, uygulanan potansiyel uyarma sinyalinin türüne göre farklı akım sinyalleri verir. Voltametrizde yaygın olarak kullanılan uyarma sinyallerine göre sırası ile Doğrusal Taramalı, Normal ve Diferansiyel Puls, Kare Dalga ve Döngüsel (Üçgen, Cyclic) Voltametri yöntemleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir [17].



Şekil 3.1: Voltamtride kullanılan zamana karşı potansiyel uyarım sinyalleri ve elde edilen voltamogramların şekilleri.

3.1.1. Doğrusal (Linear) Taramalı Voltametri

Doğrusal Taramalı Voltametri (DTV) en temel ve en basit voltametri yöntemidir. Bu voltametrik yöntemde genellikle 2-5 mV/s potansiyel aralığında doğrusal olarak artan veya azalan potansiyel taraması uygulanır. Hücrede oluşan akım, zamanın ve dolayısıyla potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülür (Şekil 3.2). Bu yöntem yaklaşık 10^{-6} M duyarlılığa sahiptir. Doğrusal taramalı voltametri, polarografi ve hidrodinamik voltametri olmak üzere iki tiptir [17].



Şekil 3.2: Doğrusal taramalı voltamogram.

Şekil 3.2'e göre sınır akımının (i_s) büyüklüğü elektroaktif maddenin derişimi ile doğru orantılıdır. Yarı dalga potansiyelinin ($E_{1/2}$) değeri yarı reaksiyonun standart potansiyeli ile ilişkilendirilebilir. Bu değerler elektroaktif maddenin kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılabilir [17].

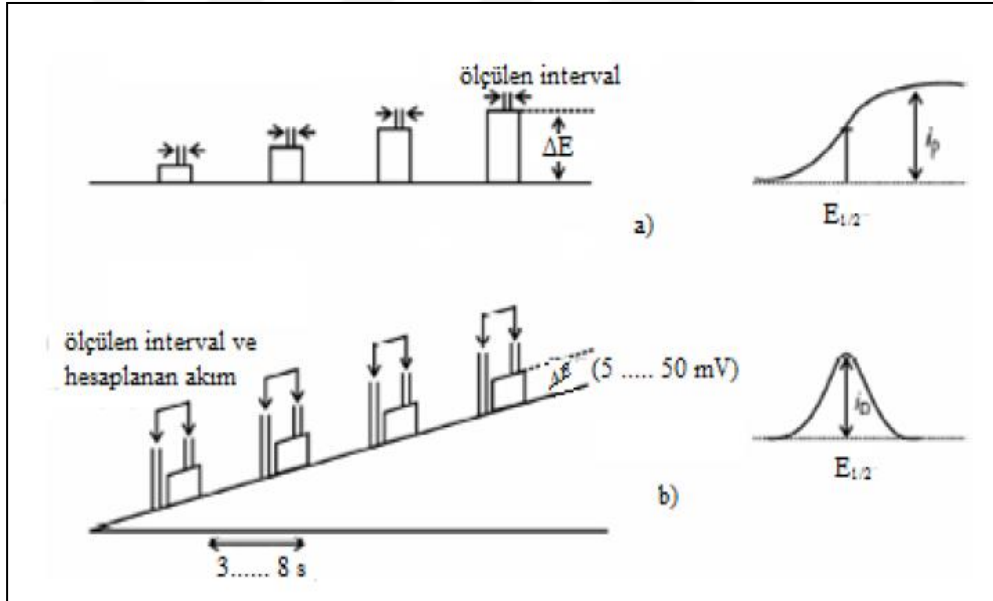
3.1.2. Normal Puls Voltametri

Voltametrde ölçüm esnasında eser miktardaki safsızlıkların indirgenmesi (az miktardaki çözünmüş oksijen, distile sudaki ağır metal iyonları ve destek elektroliti olarak kullanılan tampon çözeltisindeki safsızlıklar) ile ortaya çıkan artık akım

duyarlılığı azaltır. Bu nedenle duyarlılığın artırılması için artık akımı giderici çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden birisi puls şeklindeki gerilimlerin uygulandığı Normal Puls Voltametri (NPV) yöntemidir (Şekil 3.3a) [17].

3.1.3. Diferansiyel Puls Voltametri

NPV’de pulsun sonunda ölçülen akım az da olsa kapasitif akım içerir. Bu durum sinyal/gürültü oranının ve seçiciliğin azalmasına neden olur. Bu sorunları azaltmak veya ortadan kaldırmak için pulsun başında ve sonundaki akımlar ölçülür ve bunların arasındaki akım farkı doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu şeklinde kaydedilir. Böylece bir akım pikinin bulunduğu diferansiyel bir eğri elde edilir (Şekil 3.3b). Pikin yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır. Bu teknikle çalışan yöntem Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) denir [17].



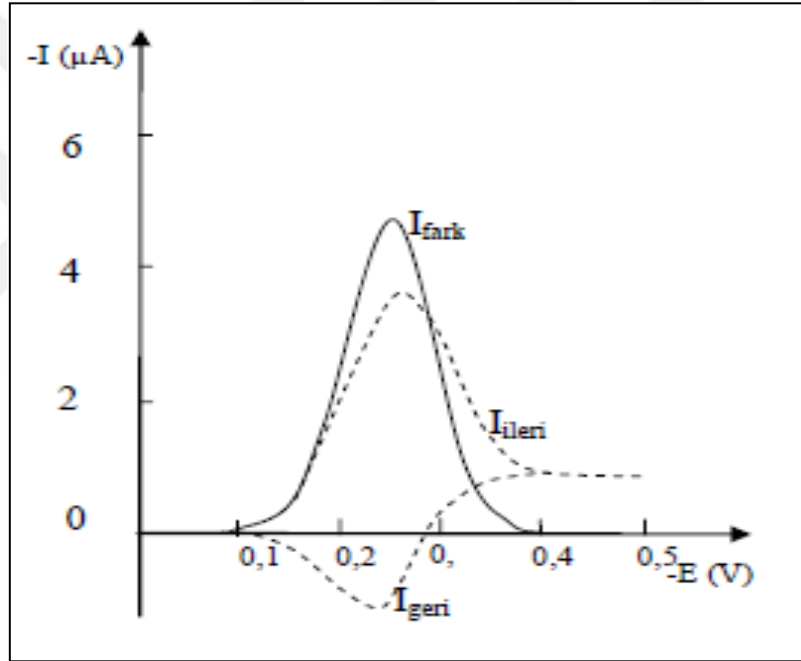
Şekil 3.3: Potansiyel uyarım sinyalleri ve elde edilen voltamogramların şekilleri.
a) NPV, b) DPV

Bu teknik 10^{-7} - 10^{-8} M arasında bir duyarlılığa sahiptir. Bu teknik Normal Puls Voltametri tekniğinden daha duyarlı ve daha seçicidir. $E_p = E_{1/2} - \Delta E/2$ eşitliğinden yarı dalga potansiyeli hesaplanabilir. Burada; ΔE , puls genliğidir. Puls genliğinin ve potansiyelin iyi seçilmesiyle duyarlılık artırılabilir. 50 mV’luk bir potansiyel farkı ile pikler birbirinden ayırt edilebilir. DPV yöntemi birçok elektroaktif maddelerin çok küçük miktarlarının tayininde kullanılmaktadır [17].

3.1.4. Kare Dalga Voltametrisi

Kare Dalga Voltametri (SWV) son derece hızlı ve duyarlı bir tekniktir. Kare dalga voltamogramları 10 ms'den daha az sürede elde edilir. DPV'ye göre SWV'nin analiz süresi oldukça kısadır. Tayin sınırı ise 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

Bu tekniğin potansiyel-zaman dalga grafiği simetrik kare dalgalardan oluşur. Her bir kare dalga döngüsü boyunca akım iki kez ölçülür. Birincisi, ileri yöndeki pulsun sonunda, ikincisi ise geri yöndeki pulsun sonundadır. Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Şekil 3.4) [17].



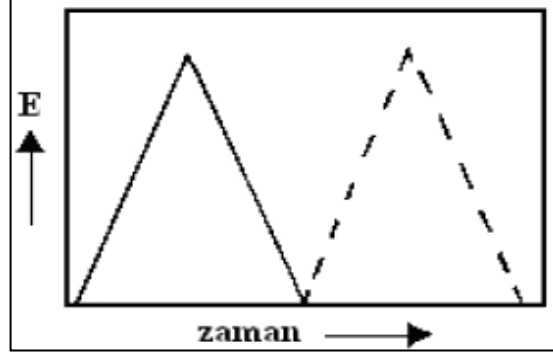
Şekil 3.4: Kare dalga voltamogramı.

SWV, hızlı ve tayin sınırının düşük olması gibi avantajlar sağlar. Bu nedenle madde analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [17].

3.1.5. Döngüsel (Cyclic) Voltametri

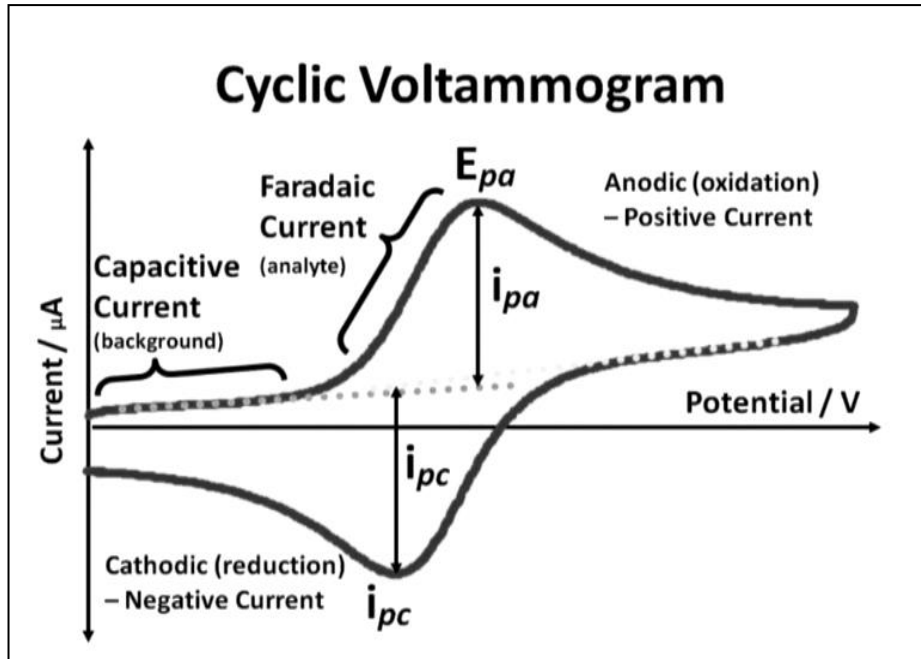
Döngüsel Voltametri (CV) en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerden biridir. Bu yöntemde üçgen dalga potansiyel taraması uygulanır ve potansiyel-zaman grafiği üçgen dalgalardan oluşur. Potansiyel önce doğrusal olarak artar ve en yüksek

değerine ulaşır. Daha sonra başlangıç noktasına geri döner. Bu yöntemin duyarlılığı 10^{-5} ile sınırlıdır. Uygulanan potansiyelin zamanla değişim grafiği Şekil 3.5’de verilmiştir [17].



Şekil 3.5: Döngüsel voltametri potansiyelin zamanla değişim grafiği.

CV yönteminde çalışma elektroduna potansiyel uygulandığında oluşan akımın ölçülmesi sonucu döngüsel voltamogramlar oluşur. CV’de ileri yönde tarama yapılırken madde yükseltgeniyor ise anodik akım (I_{pa}) ve potansiyel (E_{pa}) oluşur. Daha sonra geri yöndeki potansiyel taramasında bu yükseltgenmiş maddenin elektrotta tekrar indirgenmesinden dolayı katodik akım (I_{pk}) ve potansiyel (E_{pk}) oluşur (Şekil 3.6) [17].



Şekil 3.6: CV voltamogramı.

CV yöntemi bir bileşiğin, bir biyolojik materyalin veya bir elektrot yüzeyinin redoks tepkime mekanizmalarının incelenmesinde, kinetik çalışmalarda ve adsorpsiyon olayının araştırılmasında kullanılır [22]. Bu yöntem ile elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını ve yükseltgenme ve indirgenme potansiyellerini tespit etmek mümkündür [17].

CV'de tarama hızı ile akım piklerinin arasındaki elektrokimyasal ilişki incelenerek difüzyon, adsorpsiyon veya elektron aktarımına eşlik eden kimyasal reaksiyonlar belirlenebilir. Bunun için pik akımı ile tarama hızı arasındaki ilişkiyi veren Randles-Sevcik eşitlikleri (3.1 ve 3.2) [23];

$$I_p = 0,4463 n F (nFRT)^{1/2} C_0 D^{1/2} v^{1/2} \quad (3.1)$$

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (3.2)$$

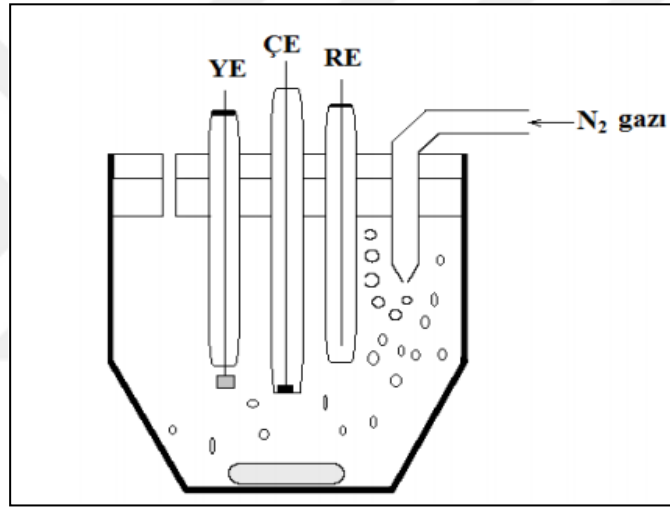
kullanılır. Bu eşitliklerde, I_p : akım şiddeti, n : elektron sayısı, F : faraday sabiti, C : derişim, R : ideal gaz sabiti, D : difüzyon katsayısı, v : tarama hızı, A : elektrot yüzey alanıdır. CV voltamogramların pik akımı aktarılan elektron sayısına, sıcaklığa, elektroaktif maddenin derişimine, difüzyon katsayısına, tarama hızına ve elektrot yüzey alanına bağlıdır. Randles-Sevcik eşitliklerine göre pik akımı, elektroaktif maddenin derişimi ve tarama hızının karekökü ile doğru orantılıdır.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonlar sırasında elektroaktif moleküllerin elektrot yüzeyine adsorblanması elektrot reaksiyon mekanizmasını ve elektron aktarım hızını değiştirerek farklı ürün oluşumuna neden olabilir. Bu nedenle adsorbsiyon voltametik sonuçları etkileyen önemli bir faktördür. Kuvvetli ve zayıf adsorbsiyon varlığında CV voltamogramlarında ön veya arka pik oluşur. Adsorbsiyon pikinin akımı tarama hızıyla doğru orantılı olarak artarken difüzyon pikinin akımı ise Randles-Sevcik eşitliğine göre tarama hızının karekökü ile artar. Adsorbsiyon varlığında ise difüzyon pik akımı tarama hızının karekökü ile doğrusal olarak değişmez. Adsorbsiyonun varlığı $\log I_p$ - $\log v$ grafiğinden yararlanılarak belirlenebilir [24]. Bu grafiğin eğimi 0,5'den büyük ise elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonlarda adsorbsiyonun varlığından söz edilebilir [25].

CV başlıca elektrokimyasal reaksiyonlarda kantitatif analizlerde, redoks reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında ve reaksiyonların kinetiğinin incelenmesinde en yaygın kullanılan voltametrik yöntemlerdir.

3.2. Voltametricde Kullanılan Hücre Elemanları

Voltametric deneylerin çalışma sistemleri destek elektrolit, çalışma (indikatör) elektrotu, referans elektrot ve yardımcı (karşıt) elektrot olmak üzere dört bileşenden oluşur. Şekil 3.7’de voltametric ölçümlerde kullanılan bir hücrenin şeması gösterilmiştir [25].



Şekil 3.7: Voltametric ölçümlerde kullanılan bir hücrenin şeması. ÇE: Çalışma elektrotu; RE: referans elektrotu, YE: yardımcı elektrot.

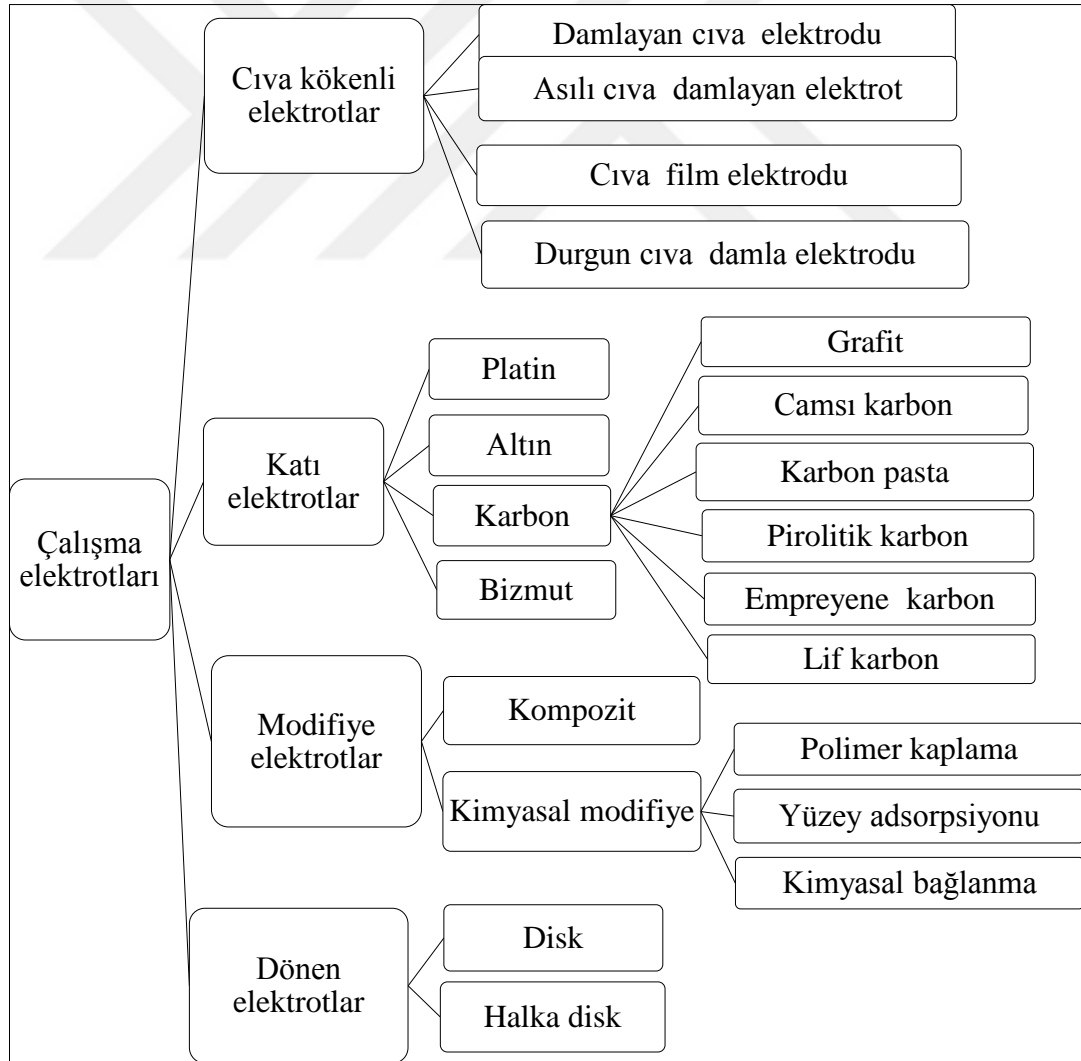
3.2.1. Destek Elektrolit

Voltametric deneyler destek elektrolit çözeltisi içerisinde gerçekleştirilir. Elektroaktif madde, seçilen destek elektrolit çözeltisinde iyi çözünmelidir. Ayrıca seçilen destek elektrolit çözeltisi elektroaktif madde ile reaksiyona girmemeli ve çalışılan potansiyel aralığında herhangi bir pik meydana getirmemelidir. Elektrolit çözeltisi için kullanılan reaktifler saf olmalı veya içerdiği safsızlık elektroaktif madde derişiminin %1’inden daha az olmalıdır. Çözeltide elektrot ve analit arasında itme ve çekme kuvvetlerinin azaltılması için destek elektrolitin derişimi elektroaktif maddenin 50-100 kat daha fazla olması gerekir. Bu nedenle voltametric deneylerde

0,1-1,0 M aralığında destek elektrolit çözeltileri hazırlanmaktadır [17]. Voltametrik deneylerde organik moleküllerin çoğu elektrottaki tepkimeleri sırasında H^+ üretimi veya tüketiminden dolayı akım-potansiyel ilişkisi pH'a bağlıdır. pH kontrolü yapılan bu deneylerde fosfat, asetat ya da sitrat tampon çözeltileri ile hazırlanmış tampon sistemler kullanılır [18].

3.2.2. Çalışma Elektrotu

Voltametrik ölçümlerde potansiyeli zamanla değiştiren elektrot çalışma (indikatör) elektrotudur. Elektroaktif madde bu elektrot üzerinde yükseltgenir veya indirgenir. Voltametri de kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırılması Şekil 3.8'de gösterilmiştir [25].



Şekil 3.8: Voltammetride kullanılan çalışma elektrotlarının sınıflandırılması.

Voltametrinde çalışma elektrotu olarak, karbon elektrot (grafit, karbon pasta, camsı karbon elektrot), platin, cıva, altın, paladyum gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır [25].

3.2.3. Referans Elektrot

Voltametrik sistemde, referans elektrotun potansiyeli, elektroaktif maddenin özelliklerinden bağımsız olup deney süresince sabit kalır. Elektrot potansiyeli tam olarak bilinen bir yarı hücredir. Ag/Ag^+ , standart hidrojen elektrot (SHE) ve standart kalomel elektrot (SCE) kullanılan en yaygın referans elektrotlardır [25].

3.2.4. Yardımcı Elektrot

Yardımcı (karşıt) elektrot, elektriğin çözelti içinden geçerek elektroda aktarılmasını sağlar. Voltametrik sistemlerde yardımcı elektrot olarak genellikle platin (Pt) tel kullanılır. Yardımcı elektrotun çalışma elektrotundaki tepkimeye hiçbir etkisi olmaz. Sadece onu elektronlarla besler.

Voltametrinde üçlü elektrot sistemleri arasındaki ilişki kısaca akımın çalışma ve yardımcı elektrotlar arasında akarak çalışma ve referans elektrotları arasında oluşturduğu voltajın kaydedilmesi olarak tanımlanabilir [25].

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bianchini ve arkadaşları tarafından galvanostatik yöntemle sulu ortam içinde Pt elektrot, poly (3,4-ethylenedioxy) thiophene (PEDOT) ile kaplanarak modifiye edilmiş ve bu modifiye elektrot ile CV yöntemi kullanılarak şarap örneklerinde kafeik asit içeriği incelenmiştir. Polimerin varlığı Pt elektroda yüksek iletkenlik özelliği kazandırmış ve kafeik asidin oksidatif reaksiyonunu kolaylaştırdığı gözlenmiştir. CV yöntemi, 10,0 nM-6,5 mM derişim aralığında analitin belirlenmesine izin vermiş ve duyarlılığı yüksek bir yöntem geliştirilmiştir [7].

Abdel-Hamid ve arkadaşları mısır örneklerinde ferulik asit tayini için polipirol-çok duvarlı karbon nanotüp modifiye camısı karbon elektrot geliştirerek, CV ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanarak karakterize etmiştir. Modifiye elektrot, ferulik asit oksidasyonuna karşı mükemmel bir elektrokimyasal katalitik aktivite gösterdiği ve optimum koşullar altında ferulik asidin konsantrasyonunun doğrusal tayin aralığı $3,32 \times 10^{-6}$ - $2,59 \times 10^{-5}$ M ve tayin sınırı $1,17 \times 10^{-6}$ M (S/N = 3) olarak rapor edilmiştir [26].

Liu ve arkadaşları Çin'de yetişen A. Sinensis şifalı ot ve biyolojik örneklerde ferulik asit tayini için, elektrokimyasal indirgenmiş grafen oksit (EDGO) ile kaplanmış GCE kullanarak yeni bir voltametrik sensör geliştirmiştir. Örnekler CV ve DPV yöntemleri ile incelenmiş ve optimum koşullar altında, ferulik asidin konsantrasyonunun doğrusal tayin aralığı $8,49 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹- $3,89 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ ve tayin sınırı $2,06 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ olarak bulunmuştur. Bu çalışmada üretilen yeni sensör ile yöntemin tekrarlanabilirlik, uzun süre kararlılık ve yüksek seçicilik özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada CV ve DPV yöntemleri ile 99,91%-101,91% aralığında geri kazanım elde edilerek A. Sinensis ve biyolojik numunelerinde ferulik asit tayininin başarılı bir şekilde uygulanabileceği gösterilmiştir [27].

Sousa ve arkadaşları tarafından pH 5,6 asetat tampon ortamında kafeik, klorojenik, sinapik, ferulik ve p-kumarik asitlerin CV yöntemi ile GCE ve modifiye edilmiş GCE kullanılarak elektrokimyasal oksidasyonu incelenmiştir. Fenolik asitlerin voltametrik davranışlarına göre, antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş ve sonuçlar sırasıyla kafeik asit ($E_a = +0,31$ V) < klorojenik asit (+0,38 V) < sinapik asit (+0,45 V) < ferulik asit (+0,53 V) < p-kumarik asit (+0,73 V) olarak bulunmuştur. Fenolik asitlerin belirlenmesinde lineer kalibrasyon grafikleri 10^{-4} - 10^{-3}

mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında elde edilmiş ve bu metot meyve suyu örneklerinde uygulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada GC elektrodu kafeik ve klorojenik asit ile kaplanarak hazırlanmış modifiye GCE ile askorbik asid tayini yapılmış ve seçiciliği incelenmiştir [28].

Tyszczyk ve arkadaşları tarafından kafeik asidin kurşun film elektrot (PbFE) kullanılarak adsorbtif sıyırma voltametri yöntemi ile elektrokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, kafeik asidin PbFE üzerine adsorbsiyonla birikmesine ve daha sonra sıyırma adımı esnasında kafeik asidin oksidasyonuna dayanmaktadır. Asetat tamponu içerisinde kafeik asidin doğrusal tayin aralığı 1×10^{-8} - 5×10^{-7} mol/L, tayin sınırı ise 4×10^{-9} mol/L olarak rapor edilmiştir. Bu metot, kare dalga voltametri metodu ile *Plantago lanceolata* bitki örneğinde kafeik asit içeriğinin belirlenmesinde uygulanabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada ek olarak kafeik asidin yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile tayini yapılmış ve elde edilen sonuçların voltametrik çalışmalar ile uyum içinde olduğu gösterilmiştir. Böylece karmaşık bir matris içindeki organik bileşiklerin tespiti için voltametrik yöntemlerin uygulanabileceği öne sürülmüştür [10].

Wang ve arkadaşları tarafından GCE yüzeyine D-glutamik asidin elektropolimerizasyon yöntemi ile kaplanarak poliglutamik asit modifiye elektrot elde edilmiş ve pH 4,2 asetat tampon çözeltisi içerisinde ferulik asidin elektrokimyasal tepkimeleri incelenmiştir. Oksidasyon pik akımı 2×10^{-7} mol L⁻¹- 3×10^{-4} mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusal bir ilişki elde edilmiş ve tayin sınırı 7×10^{-8} mol L⁻¹ olarak tahmin edilmiştir. Bu yöntem, Çin'de yetişen şifalı ot örneklerinde ferulik asit içeriğinin tespitinde kullanılmış ve 97,8-102,4% geri kazanımlı sonuçlar elde edilmiştir [11].

M. Brčanović ve arkadaşları kakao tozu, bitter çikolata ve sütlü çikolata örneklerinde fenolik antioksidan içeriklerinin GCE ile 0-800 mV potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızında CV yöntemi ile elektrokimyasal reaksiyonlarını incelemişlerdir. pH 4 asetat tamponunda yapılan CV ölçümleri sonucu 370 ve 460 mV potansiyel aralığında oluşan birinci oksidasyon piki, orto-difenol gruplarını, 670 mV potansiyeline yakın meydana gelen birinci ve üçüncü anodik pikleri flavonoidleri ve 560 mV civarında oluşan ikinci anodik piki ise fenolik asitlerin varlığını göstermiştir [29].

Romani ve arkadaşları doğal kompleks matrislerde polifenolik bileşiklerin tespiti için DPV, HPLC/DAD ve tirozinaz biyosensörü kullanmıştır. Bu teknikler

birbirinden bağımsız olarak kullanılmış ve üzüm, zeytin ve yeşil çayın doğal ekstraktlarında fenolik asit içerikleri analitik olarak belirlenmiştir. DPV çalışmalarında screen-printed elektrotlar kullanılmış ve bu yöntemin diğer yöntemlere göre daha hızlı sonuç verdiği öne sürülmüştür [30].

Magarelli ve arkadaşları tarafından kafeik asit oksidasyonuna dayalı GCE kullanarak son derece hassas ve seçici DPV yöntemi ile toplam fenolik asitlerin (TPAS) tayini gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında (0,2 M fosfat tamponu, pH 3,50 mV puls genlik, 50 mV s⁻¹ tarama hızı) kafeik asit konsantrasyonunun lineer tayin aralığı 10⁻⁷-10⁻⁶ M ve korelasyon katsayısı (R) 0,9985 olarak rapor edilmiştir. Tayin ve ölçüm sınırı sırasıyla 6,8 ×10⁻⁸ M ve 1,0 ×10⁻⁷ M elde edilmiş ve DPV yöntemiyle TPAS belirlenmesi sırasında matrisin hiçbir etkisinin olmadığı F-testi ve t-testleri (% 95 güven düzeyi) uygulanarak ortaya konulmuştur [31].

5. DENEYSEL BÖLÜM

5.1. Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada, standart çözeltiler için trans-ferulik asit ($C_{10}H_{10}O$; Sigma-Aldrich) ve kafeik asit ($C_9H_8O_4$; Alfa Aesar) kullanıldı. Destek elektrolit çözeltilerinin hazırlanmasında fosforik asit (H_3PO_4 ; Sigma-Aldrich), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; Sigma-Aldrich), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit ($NaOH$; Sigma-Aldrich), hidroklorik asit (HCl ; Sigma-Aldrich), asetik asit (CH_3COOH ; Sigma-Aldrich), sodyum asetat ($NaCH_3COO$; Sigma-Aldrich), aseton (C_3H_6O ; Merck) ultra saf su kullanıldı. Bitkisel ürün denemelerinde ise bitki çayları (nane, civanperçemi, ada çayı, biberiye ve pıtrak) kullanıldı. Voltametik ölçümler sırasında oksijenin uzaklaştırılması için argon gazı kullanıldı.

5.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler için CH Instruments, Inc, Model 842B Electrochemical Detector, USA Voltametri cihazı ile elektrokimyasal cam hücre kabı, üçlü elektrot sistemi (referans elektrot olarak Pt tel, yardımcı elektrot olarak kalomel (Hg/Hg_2Cl_2) elektrot ve çalışma elektrotları olarak GCE (3 mm çaplı) ve EPPGE (6 x 3 mm) elektrotlar kullanıldı. Elektrotların temizlenmesi ise parlatma kiti (temizleme kâğıdı) ve 0,05 mikron'luk alümina tozu (MicroPolish Powder, CHI) ile yapıldı. pH metre (PHM210, Meterlab), ultrasonik banyo, hassas tartı, mikro pipet, ısıtıcı, etüv, süzgeç kâğıdı, huni, cam beher ve balon joje kullanıldı.

5.3. Elektrot ve Cam Malzemelerinin Temizlenmesi

Elektrotlar temizleme kâğıdı üzerine alümina tozu ve saf su konularak elektrotlar dairesel hareketlerle temizlendi. Bu işlem üç kez tekrarlandı. Elektrot üzerinde kalan alümina tozları uzaklaştırmak için sırası ile ultra saf su ve asetonla

yıkandı. Aynı şekilde cam malzemelerde kullanılmadan önce ultra saf su ve aseton ile yıkandı. Temizleme işlemi her voltametrik ölçüm öncesinde tekrar edildi.

5.4. Destek Elektrolit (Tampon) Çözeltilerin Hazırlanması

Destek elektrolit çözeltilerinde kullanmak amacıyla 0,1M KH_2PO_4 , H_3PO_4 , K_2HPO_4 , NaCH_3COO , CH_3COOH , HCl ve 0,02 M K_2HPO_4 , 0,2 M KH_2PO_4 , 0,04 M NaOH çözeltileri hazırlandı.

10 ml 0,1 M pH 2 fosfat tamponu: 4,3 ml 0,1 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 5,7 ml 0,1 M H_3PO_4 çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli ilaveler yapılarak yaklaşık 25 °C de pH 2'e ayarlandı.

10 ml 0,1 M pH 3 fosfat tamponu: 8,8 ml 0,1 M KH_2PO_4 çözeltisi ile 1,2 ml 0,1 M H_3PO_4 çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli ilaveler yapılarak yaklaşık 25 °C de pH 3'e ayarlandı.

10 ml 0,1 M pH 4 asetat tamponu: 1,5 ml 0,1 M NaCH_3COO çözeltisi ile 8,5 ml 0,1 M CH_3COOH çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli ilaveler yapılarak yaklaşık 25 °C de pH 4'e ayarlandı.

10 ml 0,1 M pH 5 asetat tamponu: 6,35 ml 0,1 M NaCH_3COO çözeltisi ile 3,65 ml 0,1 M CH_3COOH çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli miktarda ilave edilerek yaklaşık 25 °C de pH 5'e ayarlandı.

10 ml 0,1 M pH 6 fosfat tamponu: 2,9 ml 0,02 M K_2HPO_4 çözeltisi ile 4,71 ml 0,2 M KH_2PO_4 çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli ilaveler yapılarak yaklaşık 25 °C de pH 6'e ayarlandı ve ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlandı.

10 ml 0,1 M pH 7 fosfat tamponu: 3,8 ml 0,1 M K_2HPO_4 çözeltisi ile 6,2 ml 0,1 M KH_2PO_4 çözeltisi kullanıldı. pH metre yardımı ile NaOH veya HCl çözeltisinden gerekli ilaveler yapılarak yaklaşık 25 °C de pH 7'e ayarlandı.

5.5. Standart Ferulik ve Kafeik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması

10 ml 1×10^{-3} M standart ferulik asit çözeltisinin hazırlanması için hassas tartı ile 1,942 mg ferulik asit tartıldı ve üzerine 10 ml ultra saf su ilave edildi. Daha sonra

ultrasonik banyoda 5 dakika boyunca bekletilerek çözünmesi sağlandı. Standart ferulik çözeltileri günlük hazırlandı.

10 ml 1×10^{-3} M standart kafeik asit çözeltisinin hazırlanması için hassas tartı ile 1,802 mg kafeik asit tartıldı ve üzerine 10 ml ultra saf su ilave edildi. Daha sonra ultrasonik banyoda 5 dakika boyunca 90 °C sıcaklıkta bekletilerek çözünmesi sağlandı. Standart kafeik asit çözeltileri günlük hazırlandı.

5.6. Bitki Çaylarının Hazırlanması

Bitki çaylarının hazırlanmasında haşlayarak demleme yöntemi kullanılmıştır. Bu tez kapsamında aktarlardan satın alınan nane, civanperçemi, biberiye, ada çayı ve pıtrak olmak üzere beş farklı kuru bitki örnekleri kullanıldı. 2 g kuru bitki örneklerinden tartıldı ve 50 ml ultra saf su içerisinde 15 dakika boyunca 100 °C sıcaklıkta bekletildi. Daha sonra çay örnekleri ısıtıcı üzerinden alınarak oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Çay örnekleri huni ve süzgeç kâğıdı yardımı ile süzüldü ve homojen çay örnekleri hazırlandı. Bütün çay örnekleri günlük hazırlandı.

5.7. Oksijenin Uzaklaştırılması

Çözeltilerin içinde çözünmüş olarak bulunan oksijen molekülleri, elektrot yüzeyinde indirgenir. Oksijen molekülünün indirgenme pikleri çok büyük olduğu için, ortamda bulunan diğer türlerin indirgenme piklerini kapatır. Bu yüzden oksijenin indirgenme piki, diğer türlerin indirgenme piklerinin ölçümlerinde hatalara neden olur. Bunu önlemek ve daha hassas ölçümler alabilmek için, voltametrik deneylere başlamadan önce mutlaka çözeltiden en az 3 dakika boyunca azot ve argon gibi inert bir gaz geçirilmelidir. Bu tez kapsamında yapılan deneylerde voltametrik ölçümler alınmadan önce tüm çözeltiler 3 dakika boyunca argon gazından geçiriler oksijenin girişim etkisi engellendi.

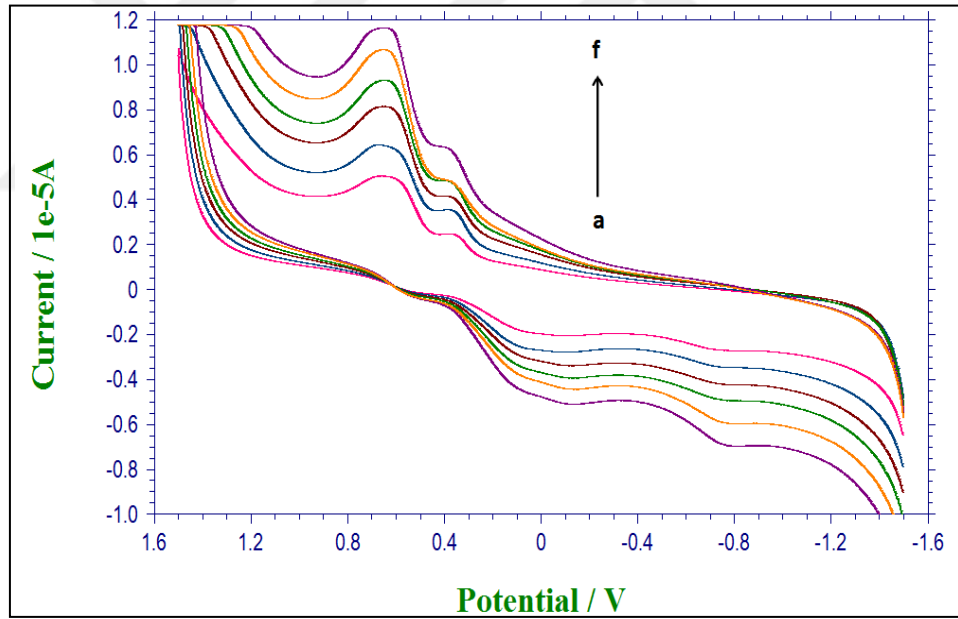
5.8. Ferulik ve Kafeik Asidin Elektrokimyasal Davranışı

DeneySEL çalışmalarda ilk olarak ferulik ve kafeik asit çözeltilerinin voltametrik tayini yapıldı ve optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için en

uygun sınır potansiyel aralığı, tarama hızı, çalışma elektrodu, pH ve voltametrik yöntem belirlendi. Daha sonra standart ferulik ve kafeik asit çözeltilerinin kalibrasyon grafikleri oluşturularak doğrusal aralıklar, tayin sınırı (LOD) ve gözlenebilirlik sınırı (LOQ) belirlendi. Belirlenen optimum çalışma koşullar altında bitki çaylarında DPV yöntemiyle kafeik asit içeriğinin tayini yapıldı. Voltametrik deneylerde CV için (-1,5 V) - (+1,5 V), DPV için ise (-1,0 V) - (+1,2 V) potansiyel aralıkları çalışma aralığı olarak seçildi.

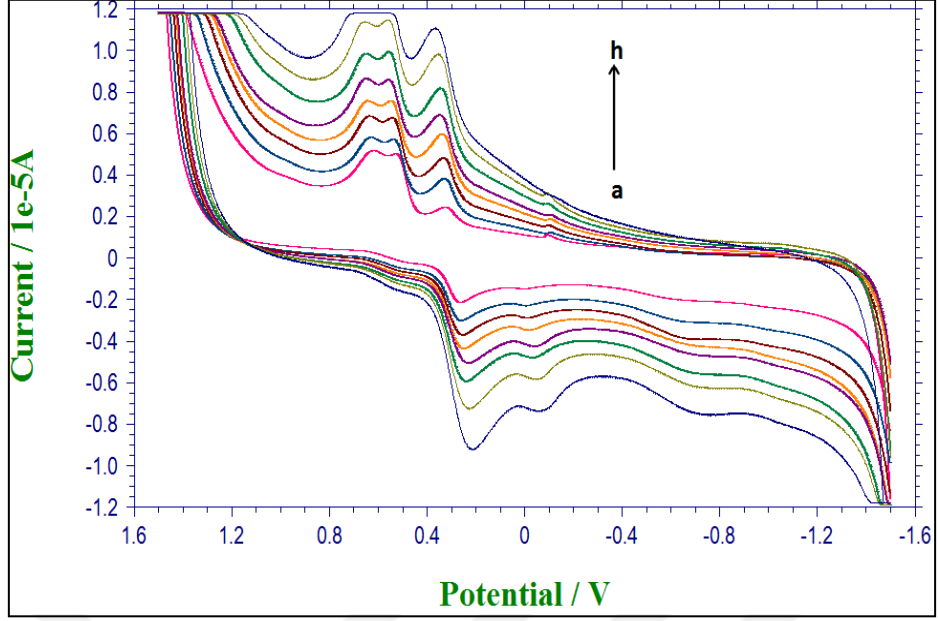
5.8.1. Tarama Hızının Etkisi

Oda sıcaklığında, $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin 0,1 M asetat tamponunda (pH: 4) GC elektrot kullanılarak farklı tarama hızlarında CV voltamogramları alındı. Standart ferulik asit çözeltisinin anodik ve katodik pik akımlarının farklı tarama hızlarındaki değişimi Şekil 5.1’de gösterildi.



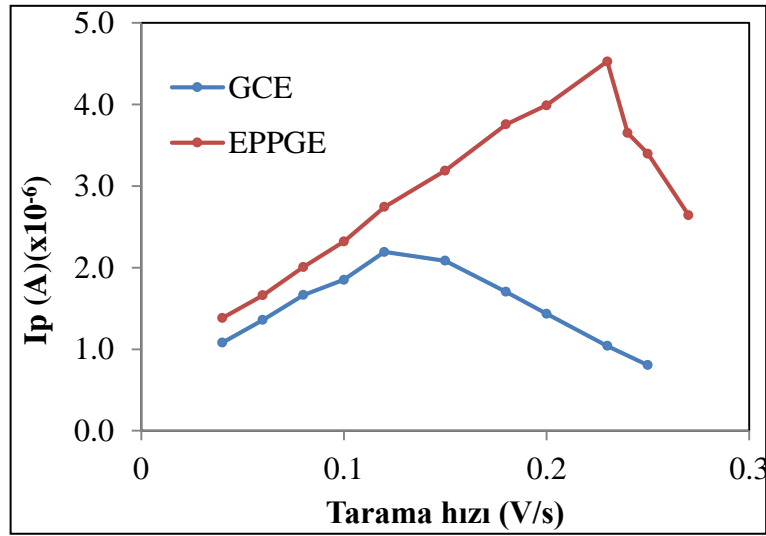
Şekil 5.1: GC elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin CV yönteminde pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi, a) 40 mV/s, b) 60 mV/s, c) 80 mV/s, d) 100 mV/s, e) 120 mV/s, f) 150 mV/s.

Oda sıcaklığında, $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin asetat tamponunda (pH: 4) EPPG elektrot kullanılarak farklı tarama hızlarında CV voltamogramları alındı. Standart ferulik asit çözeltisinin anodik ve katodik pik akımlarının farklı tarama hızlarındaki değişimi Şekil 5.2’de gösterildi.

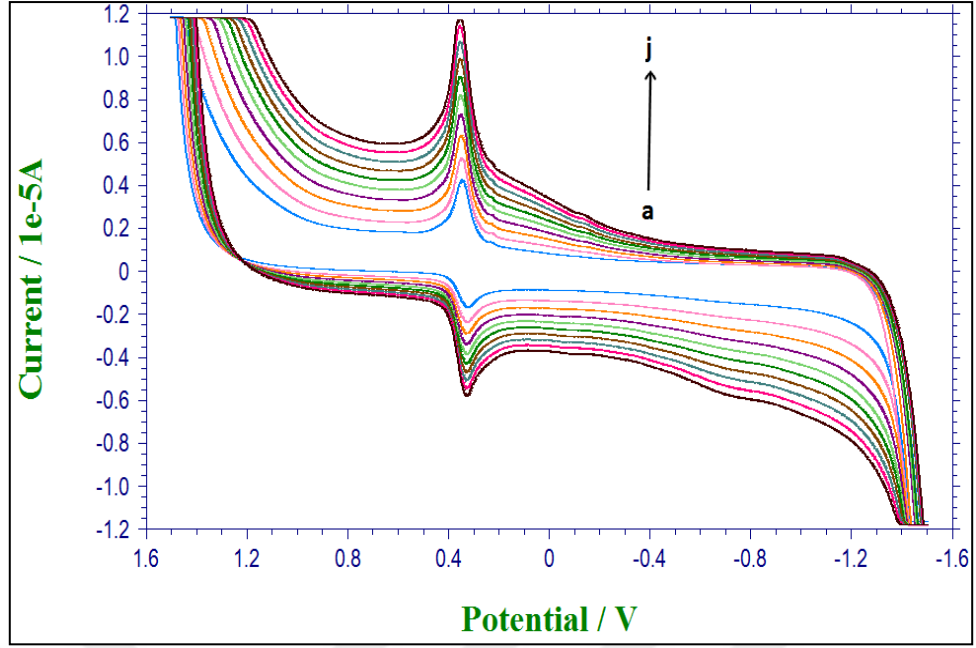


Şekil 5.2: EPPG elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltisinin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi. a) 40 mV/s, b) 60 mV/s, c) 80 mV/s, d) 100 mV/s, e) 120 mV/s, f) 150 mV/s, g) 180 mV/s, h) 230 mV/s.

Ferulik asidin oksidasyon pik potansiyel değerleri tarama hızının artmasıyla pozitifte kaydıgı gözlemlendi. Ayrıca $9,1 \times 10^{-5}$ M'lık ferulik asit çözeltisinin oksidasyon pik akımları GC elektrot kullanıldığında 40-100 mV/s aralığında, EPPG elektrot kullanıldığında ise 40-230 mV/s tarama hızı aralığında doğrusal bir artış gösterdi. GC ve EPPG elektrotlarının farklı tarama hızlarına göre performanslarının karşılaştırılması Şekil 5.3'de gösterildi.



Şekil 5.3: Standart ferulik asit çözeltisinin GC ve EPPG elektrotlarının farklı tarama hızlarına göre performanslarının karşılaştırılması.



Şekil 5.4: EPPG elektrot ile standart $9,1 \times 10^{-5}$ M kafeik asit çözeltisinin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyelinin tarama hızı ile değişimi. a) 40 mV/s, b) 60 mV/s, c) 80 mV/s, d) 100 mV/s, e) 120 mV/s, f) 140 mV/s, g) 160 mV/s, h) 180 mV/s, ı) 200 mV/s, j) 220 mV/s.

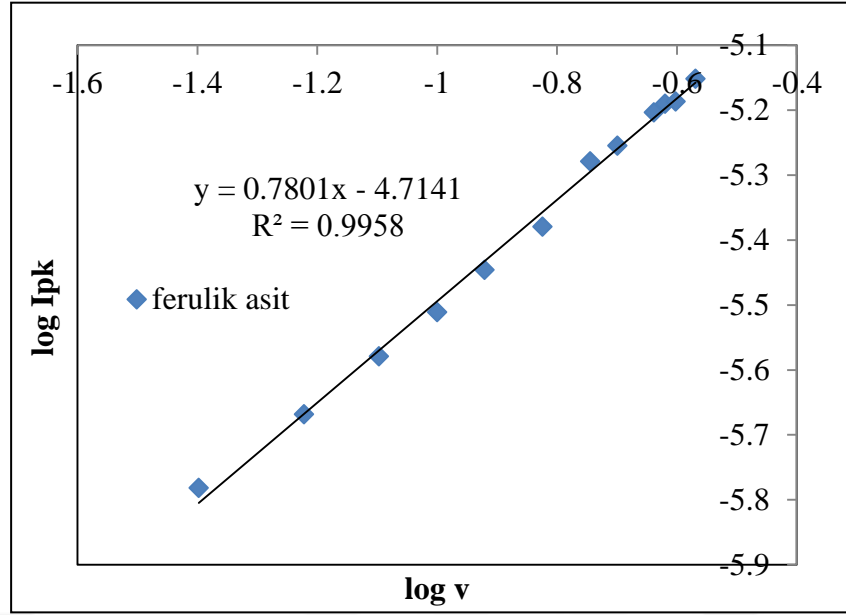
Tarama hızı ile akım pik yüksekliğinin değişimi incelendiğinde difüzyon, adsorbsiyon ve elektron aktarımına eşlik eden kimyasal reaksiyonlarla ilgili birçok bilgi edinilebilir [32]. Bu amaçla ferulik ve kafeik asidin EPPG elektrottaki tarama hızı etkisi ile elektrot yüzeyinde gerçekleşen kimyasal reaksiyonların difüzyon ve adsorbsiyon özellikleri incelendi. Ferulik ve kafeik asit için pik potansiyellerinin ve pik akımlarının tarama hızı ile değişimini gösteren voltamogramlar Şekil 5.2 ve 5.4'de gösterildi.

Tablo 5.1: 0,1 M asetat tamponunda (pH: 4), EPPG elektrot ile $9,1 \times 10^{-5}$ M ferulik ve kafeik asidin CV yöntemi ile elde edilen pik potansiyellerinin tarama hızına göre değişimi.

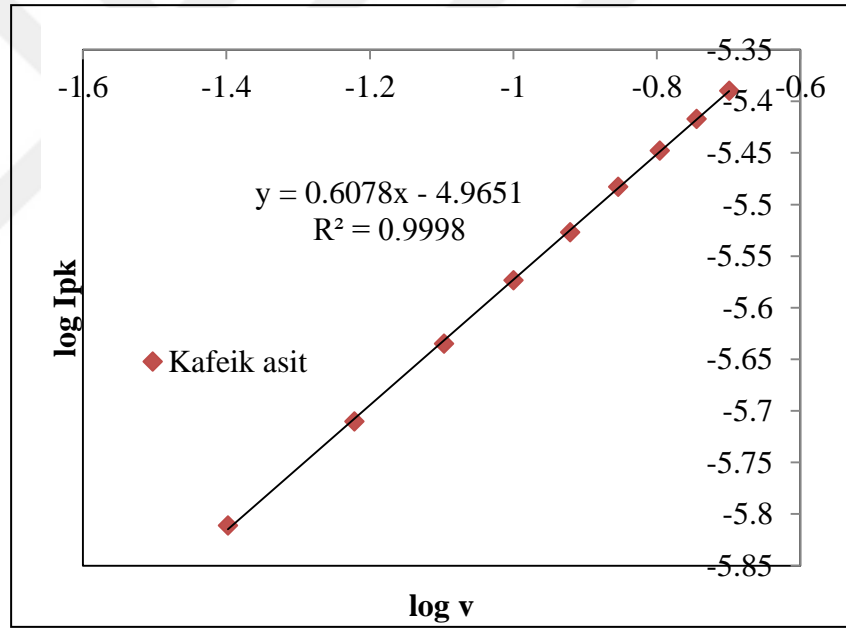
Ferulik Asit			Kafeik Asit		
v (V/s)	Epa (V)	Epk (V)	v (V/s)	Epa (V)	Epk (V)
0,04	0,328	0,265	0,04	0,346	0,321
0,06	0,328	0,256	0,06	0,346	0,330
0,08	0,328	0,256	0,08	0,346	0,330
0,10	0,337	0,245	0,10	0,347	0,329
0,12	0,346	0,227	0,12	0,350	0,330
0,15	0,346	0,236	0,14	0,356	0,329
0,18	0,355	0,227	0,16	0,355	0,330
0,20	0,355	0,227	0,18	0,355	0,330
0,23	0,366	0,218	0,20	0,355	0,329
0,24	0,366	0,209	-	-	-
0,25	0,366	0,218	-	-	-

Tablo 5.1’de ferulik ve kafeik asit için tarama hızı ile değişen anodik ve katodik pik potansiyel değerleri verilmiştir. Standart ferulik asidin tarama hızı arttıkça anodik pik potansiyeli artarken, katodik pik potansiyelinin azaldığı gözlemlendi. Standart kafeik asit için ise hem anodik hem de katodik pik potansiyeli tarama hızının artması ile arttığı görüldü.

Organik maddelerin önemli bir kısmı elektrot yüzeyine adsorbe olur ve bu moleküllerin elektrot yüzeyine adsorbe olması elektrot reaksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir. İncelenen maddelerin elektrot yüzeyine kuvvetli adsorblandığını anlamamanın en kolay yolu, indirgenme pikinden daha negatif veya daha pozitif potansiyellerde farklı bir pikin gözlenmesidir. Ayrıca adsorbsiyonun olup olmadığını belirlemek için bir diğer yöntem ise incelenen maddelerin farklı tarama hızlarında CV voltamogramları alınarak pik akımlarının tarama hızı arasındaki ilişkinin incelenmesi ile belirlenmesidir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların adsorbsiyon kontrollü olup olmadığını belirlemek amacı ile ferulik ve kafeik asit için log I_{pk} -log v grafikleri çizildi (Şekil 5.5 ve 5.6).



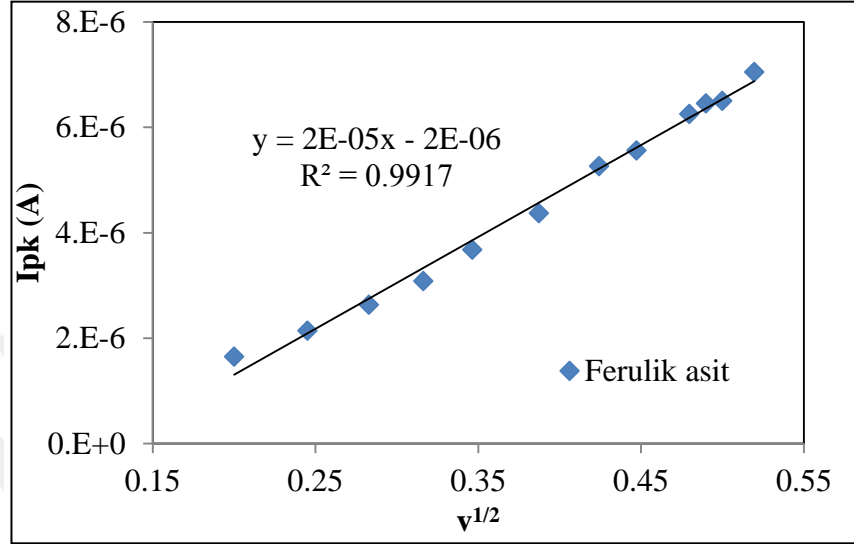
Şekil 5.5: Ferulik asidin log Ipk-log v grafiği.



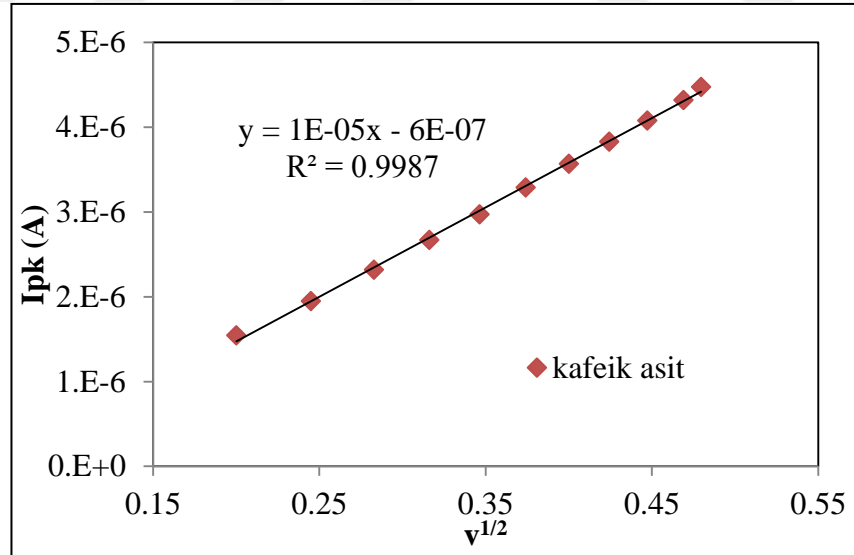
Şekil 5.6: Kafeik asidin log Ipk-log v grafiği.

Difüzyon dikkate alınarak türetilen ve CV voltamogramlarındaki pik akımını veren Randless-Sevcik eşitliğinden, log Ipk ve log v arasında, eğimi 0,5 olan bir doğru elde edilir. Maddenin elektrot yüzeyinde adsorpsiyonu söz konusu ise, bu bağıntıdan ve dolayısıyla 0,5'den sapmalar meydana gelir ve genellikle bu durumda grafiklerin eğimi 0,5'den büyük olur [24]. Ferulik ve kafeik asit için elde edilen log Ipk-log v grafiklerinin eğimlerinin 0,5'den büyük olması bu moleküllerin elektrot yüzeyine adsorbe olduklarını gösterdi (Şekil 5.5 ve 5.6). Ayrıca Randless-Sevcik

eşitliğine göre difüzyon kontrollü reaksiyonlarda pik akımının tarama hızının karekökü ile doğrusal bir ilişki olduğu görülür. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların difüzyon kontrollü olup olmadığını belirlemek için ise ferulik ve kafeik asidin $I_{pk}-v^{1/2}$ grafikleri çizildi (Şekil 5.7 ve 5.8).



Şekil 5.7: Ferulik asidin $I_{pk}-v^{1/2}$ grafiği.



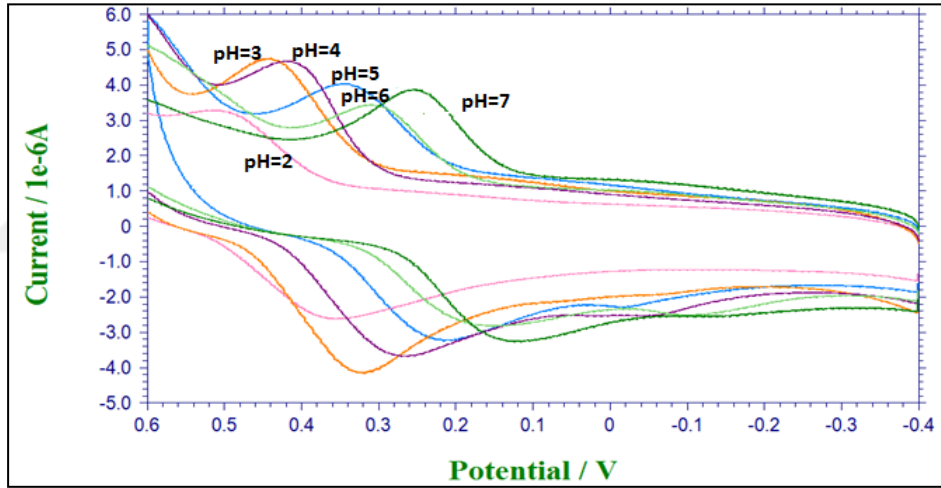
Şekil 5.8: Kafeik asidin $I_{pk}-v^{1/2}$ grafiği.

Ferulik ve kafeik asit için farklı tarama hızlarında alınan CV voltamogramlarından yararlanılarak çizilen $I_{pk}-v^{1/2}$ grafiklerinin (Şekil 5.7 ve 5.8) doğrusal olması elektrot yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonların adsorbsiyon kontrollü olmasının yanında difüzyon kontrollü olduğunu da göstermektedir [24].

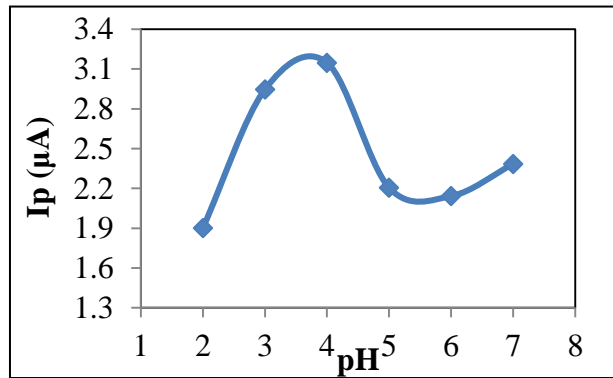
5.8.2. pH'ın Etkisi

Organik maddelerin elektrot yüzeyindeki elektrokimyasal reaksiyonlarında çoğunlukla proton görev alır. Bu nedenle akım ile potansiyel arasındaki ilişki ortamın pH'ına göre değişiklik gösterir. Voltametrik yöntemlerde ortamın pH'ından kaynaklanacak hatalardan kurtulmak için analit çözeltilerinin mutlaka tamponlanması gerekir [34].

Bu tez kapsamında ferulik asidin voltametrik yöntemler ile tespitinde pH'a bağlılığının incelenmesi için 0,1 M pH'ı 2, 3, 6 ve 7 olan fosfat tamponları ve pH'ı 4 ve 5 olan asetat tamponları hazırlandı ve bu pH değerlerine sahip tamponlar kullanılarak $1,67 \times 10^{-4}$ M ferulik asidin GC elektrotta CV yöntemi ile voltamogramları alındı (Şekil 5.9).



Şekil 5.9: Farklı pH'da $1,67 \times 10^{-4}$ M ferulik asit çözeltisinin CV voltamogramları ((-0,4 V) - (+0,6 V) potansiyel aralığında; GCE; tarama hızı: 0,1 V/s).

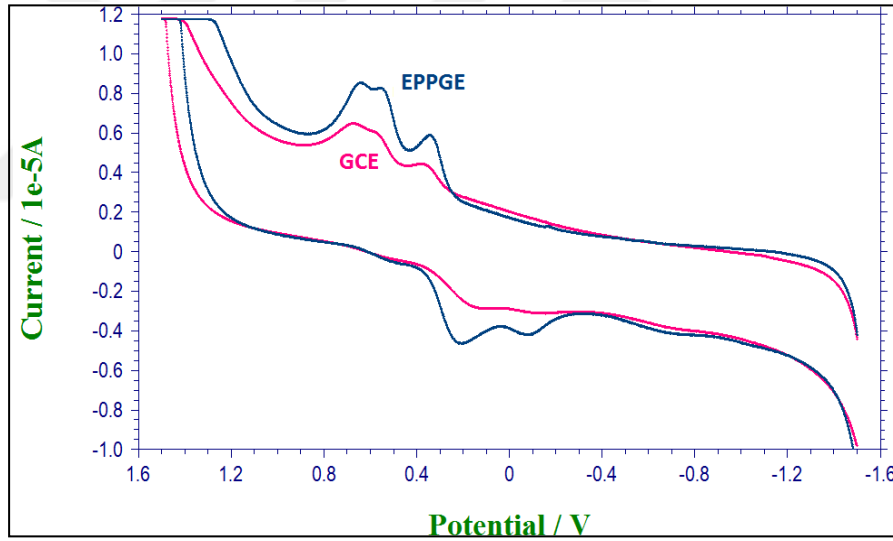


Şekil 5.10: Farklı pH'a sahip destek çözeltilerinde anodik pik akımlarının değişime karşı grafiği.

CV voltamogramları incelendiğinde pH'ın artmasıyla anodik ve katodik pik potansiyellerinin negatife kaydığı gözlemlendi. Ayrıca Şekil 5.10'da görüldüğü gibi maksimum pik akımı, pH'ı 4 olan asetat tamponu ortamında elde edildi. Bu nedenle ferulik ve kafeik asidin tespiti için yapılan sonraki deneylerde pH'ı 4 olan asetat tampon çözeltisi destek elektrolit çözeltisi olarak seçildi.

5.8.3 Çalışma Elektodunun Seçilmesi

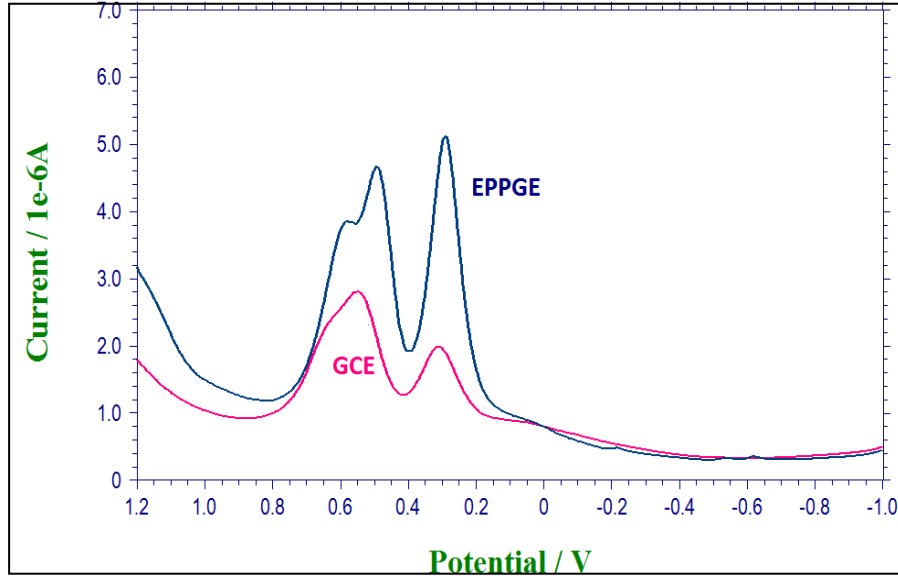
Standart ferulik asit çözeltilerinin 0,1 M asetat tamponunda (pH: 4) GC ve EPPG elektrotları kullanılarak (-1,5 V) - (+1,5 V) potansiyel aralığında, 0,1 V/s tarama hızında CV voltamogramları (Şekil 3.11) ve (-1,0 V) - (+1,2 V) potansiyel aralığında 0,05 V puls genliğinde DPV teknikleriyle voltamogramlar (Şekil 5.11 ve 5.12) alındı. Seçilen elektrotların performansları karşılaştırıldı.



Şekil 5.11: $8,3 \times 10^{-5}$ M ferulik asit çözeltilerinin GC ve EPPG elektrotla ölçülen pik akımlarının CV voltamogramları ((-1,5 V) - (+1,5 V); tarama hızı: 0,1 V/s).

Tablo 5.2: $8,3 \times 10^{-5}$ M standart ferulik asit için 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) farklı elektrotlarda CV yöntemleri ile elde edilen potansiyel ve pik akımı parametrelerinin karşılaştırılması.

Elektrot	Epa (V)	Epk (V)	Ipa (μ A)	Ipk (μ A)
GCE	0,384	-	1,00	-
EPPGE	0,346	0,209	2,90	-3,47



Şekil 5.12: $1,1 \times 10^{-4}$ M ferulik asit çözeltilerinin asetat tamponunda GC ve EPPG elektrotları ile ölçülen pik akımlarının DPV voltamogramları ((-1,0 V) - (+1,2 V); puls genliği: 0,05 V).

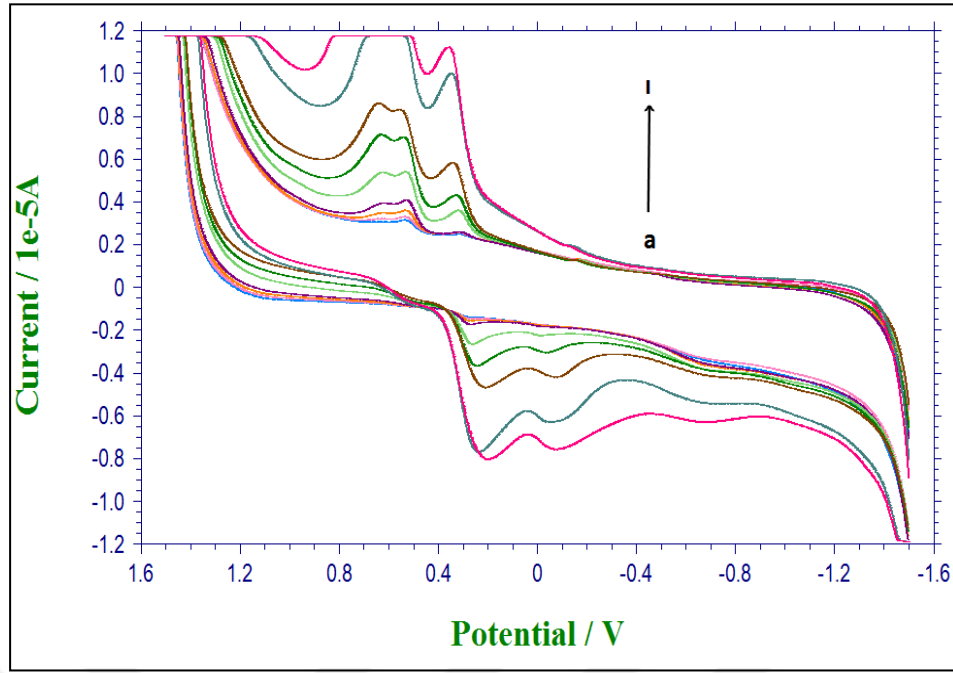
Tablo 5.3: $1,1 \times 10^{-4}$ M ferulik asit için 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) farklı elektrotlarda DPV yöntemleri ile elde edilen potansiyel ve pik akımı parametrelerinin karşılaştırılması.

Elektrot	Epa (V)	Ipa (μ A)
GCE	0,308	0,84
EPPGE	0,288	3,54

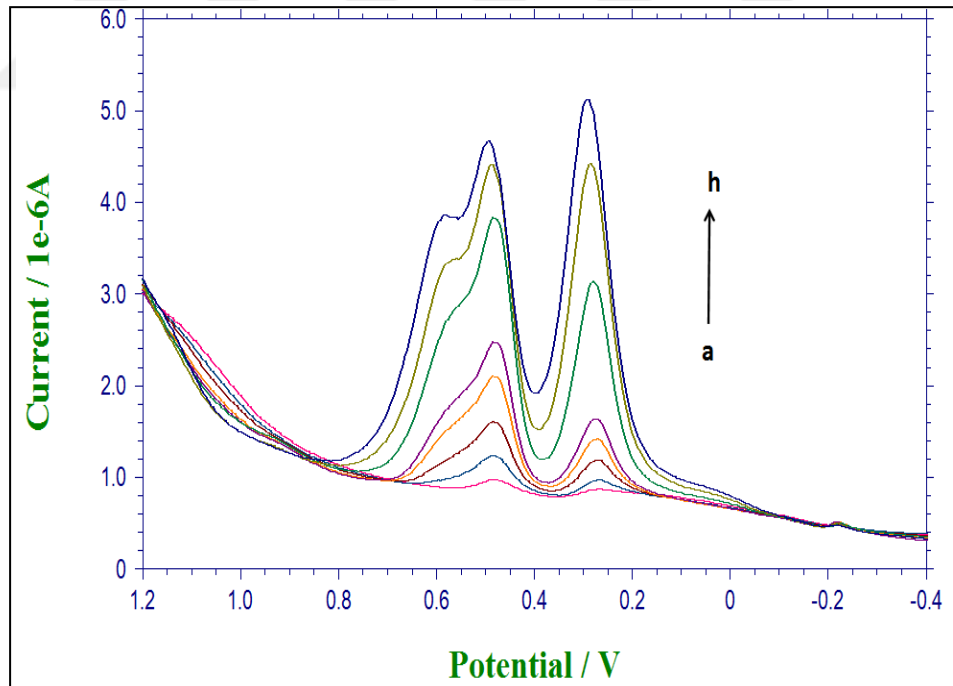
CV ve DPV yöntemleri ile GC ve EPPG elektrotları kullanılarak alınan voltamogramlarda EPPG elektrodunun ferulik asit tayininde daha duyarlı olduğu ve pik akımlarının EPPG elektrodunda daha belirgin pikler verdiği gözlemlendi (Tablo 5.2 ve 5.3).

5.8.4. Voltametrik Yöntemin Seçilmesi

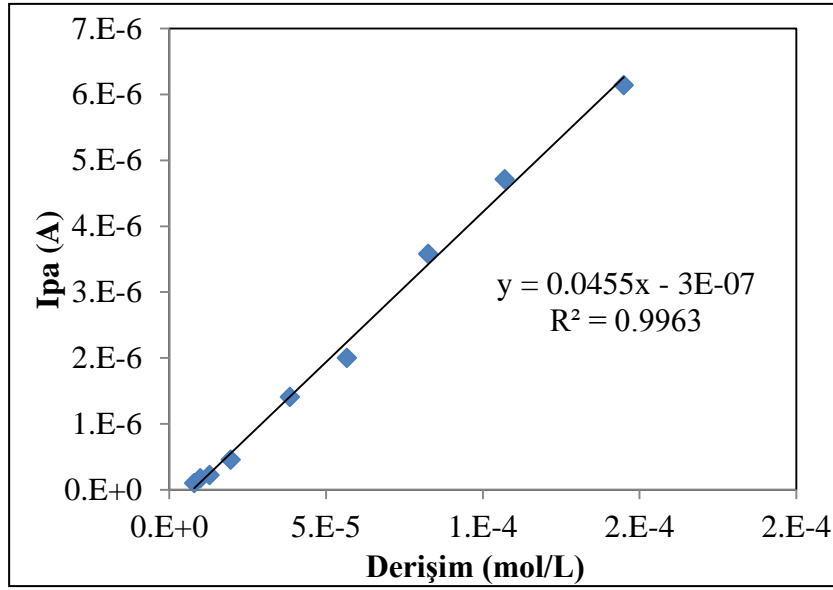
Standart ferulik asit çözeltilerinin CV voltamogramları (Şekil 5.13) ve DPV voltamogramları (Şekil 5.14) alındı. Seçilen voltametrik yöntemlerin performansları karşılaştırıldı.



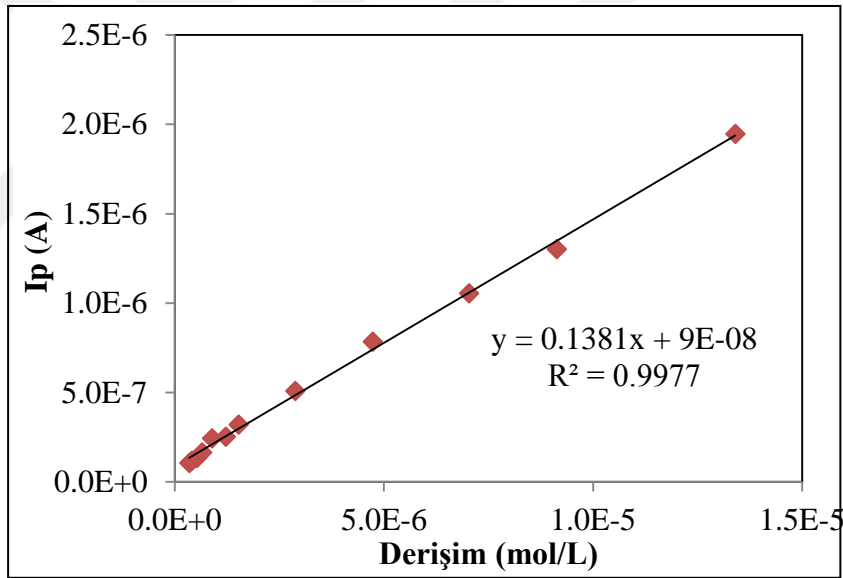
Şekil 5.13: Farklı derişimlerdeki ferulik asidin CV voltamogramları (EPPG elektrot, (-1,5 V) - (+1,5 V); pH: 4 asetat tamponu; tarama hızı: 0,1 V/s). a) 8×10^{-6} mol/L, b) $9,9 \times 10^{-6}$ mol/L, c) $1,28 \times 10^{-5}$ mol/L, d) 2×10^{-5} mol/L, e) $3,9 \times 10^{-5}$ mol/L, f) $5,7 \times 10^{-5}$ mol/L, g) $8,3 \times 10^{-5}$ mol/L, h) $1,07 \times 10^{-4}$ mol/L, i) $1,45 \times 10^{-4}$ mol/L.



Şekil 5.14: Farklı derişimlerdeki ferulik asidin DPV voltamogramları (EPPG elektrot, (-1,0 V) - (+1,2 V); pH: 4 asetat tamponu; puls genliği: 0,05 V). a) 2×10^{-6} mol/L, b) 4×10^{-6} mol/L, c) 8×10^{-6} mol/L, d) $1,3 \times 10^{-5}$ mol/L, e) 2×10^{-5} mol/L, f) $3,9 \times 10^{-5}$ mol/L, g) $5,7 \times 10^{-5}$ mol/L, h) $1,1 \times 10^{-4}$ mol/L.



Şekil 5.15: Ferulik asidin EPPG elektrot ile elde edilen CV voltamogramlarının pik akımı-derişim grafiği.



Şekil 5.16: Ferulik asidin EPPG elektrotta elde edilen DPV voltamogramlarının pik akımı-derişim grafiği.

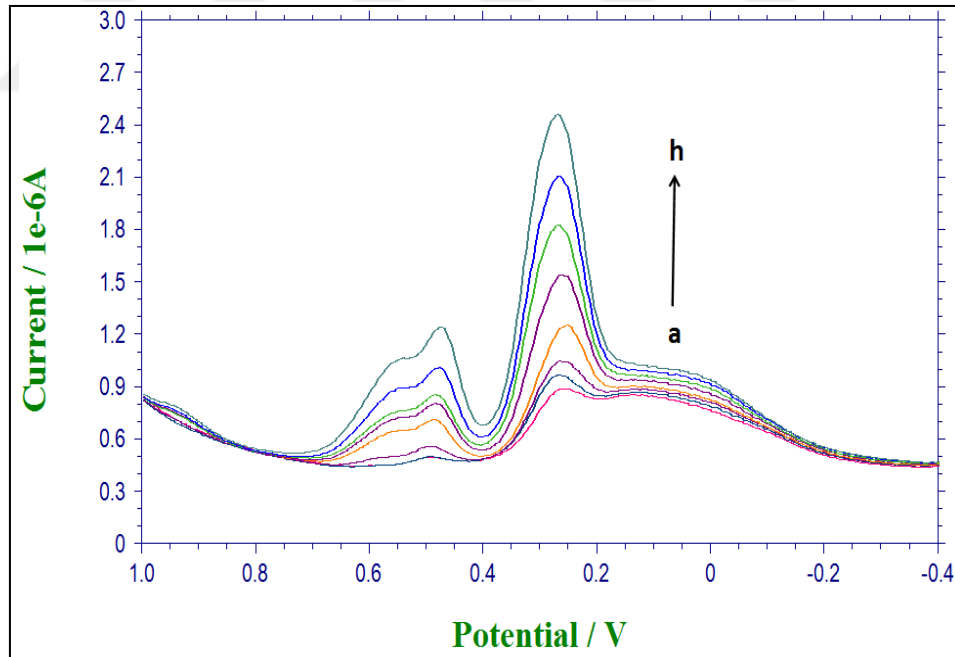
Tablo 5.4: Farklı standart ferulik asidin çözeltilerinin 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) EPPG elektrotta CV ve DPV yöntemleri ile elde edilen analitik parametrelerinin karşılaştırılması (N=5).

Voltametik Yöntem	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)	LOD (mol L ⁻¹)	LOQ (mol L ⁻¹)
CV	7,94x10 ⁻⁶ -1,45x10 ⁻⁴	2,04x10 ⁻⁶	6,81x10 ⁻⁶
DPV	1,00x10 ⁻⁶ -1,07x10 ⁻⁴	9,20x10 ⁻⁷	3,07x10 ⁻⁶

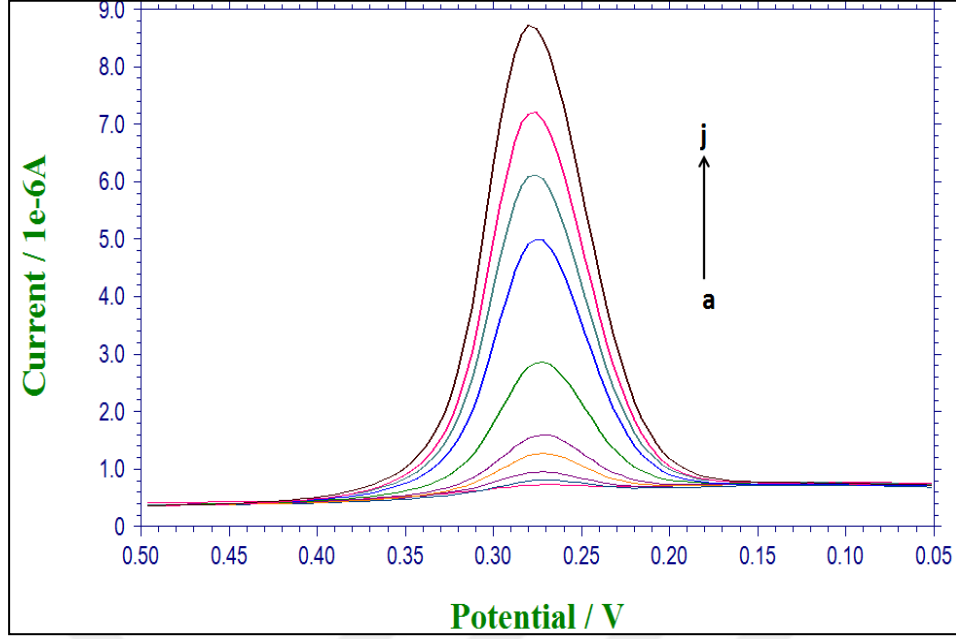
Standart ferulik asidin tespitinde daha duyarlı olan yöntemin belirlenmesi Şekil 5.15 ve 5.16 grafiklerinden yararlanılarak hesaplanan doğrusal aralık, LOD ve LOQ analitik parametreleri Tablo 5.4’de gösterildi. CV ve DPV yöntemleri arasındaki bu parametreler karşılaştırıldığında DPV yönteminin daha duyarlı sonuçlar verdiği görüldü.

5.8.5. Kalibrasyon Grafiklerinin Oluşturulması

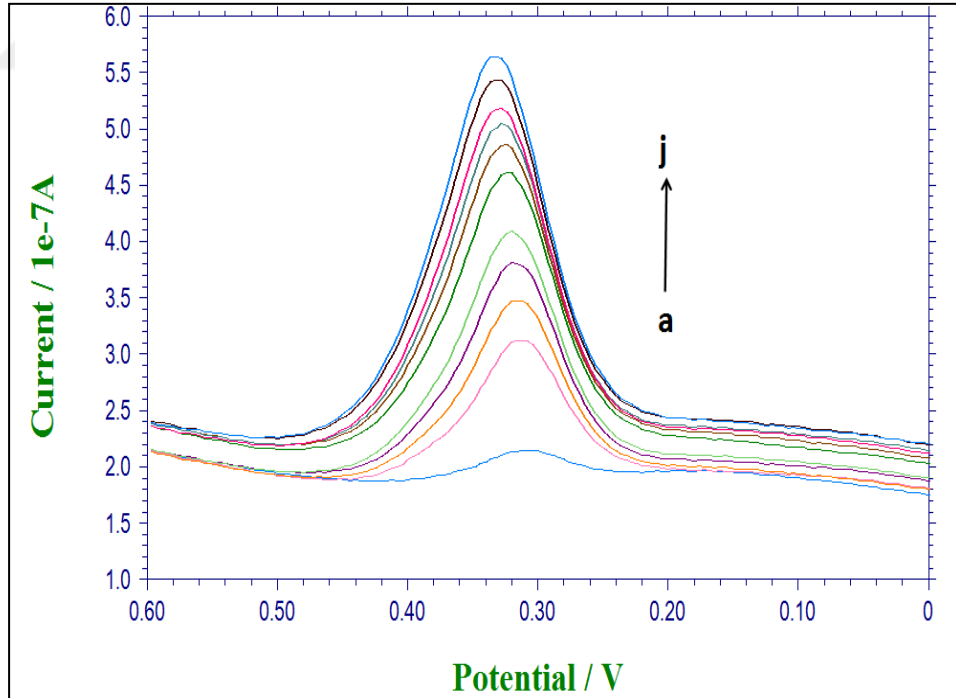
Ferulik ve kafeik asidin tayin edilebilir aralığını (lineer aralık) belirlemek için kalibrasyon çalışmaları yapılmalıdır. Doğrusal aralığın saptanması için 5 ml pH 4 asetat tamponu üzerine, artan derişimlerde standart çözeltilerden eklendi ve DPV voltamogramları kaydedildi (Şekil 5.17, 5.18 ve 5.19). Derişime karşı pik akımı değerleri grafiğe geçilerek kalibrasyon eğrileri çizildi (Şekil 5.20, 5.21 ve 5.22). Kalibrasyon grafiklerinden ferulik ve kafeik asidin doğrusal aralık, LOD ve LOQ analitik parametreleri hesaplandı.



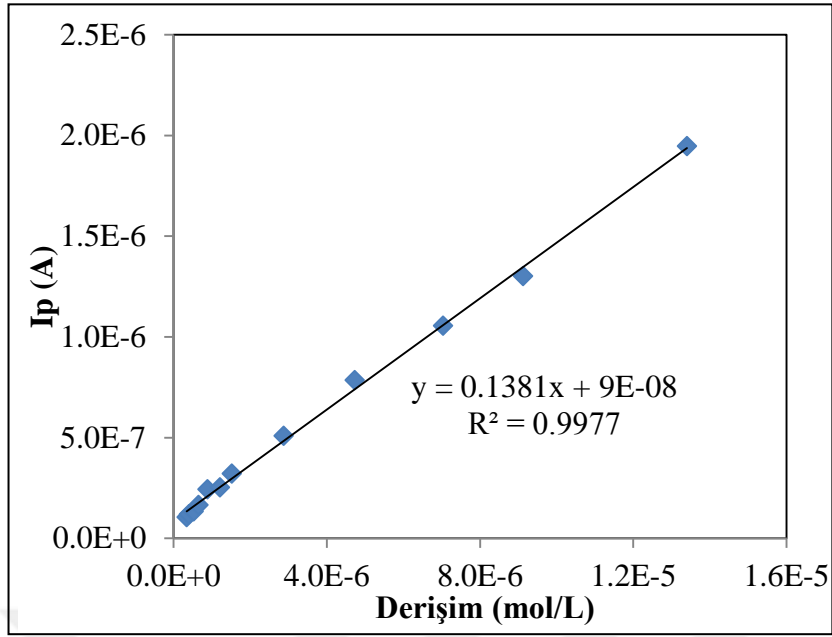
Şekil 5.17: Standart ferulik asidin farklı derişimlerdeki EPPG elektrot ile elde edilen DPV voltamogramları; a) $6,5 \times 10^{-7}$ mol/L, b) $8,8 \times 10^{-7}$ mol/L, c) $1,5 \times 10^{-6}$ mol/L, d) $2,9 \times 10^{-6}$ mol/L, e) $4,7 \times 10^{-6}$ mol/L, f) $7,0 \times 10^{-6}$ mol/L, g) 9×10^{-6} mol/L, h) $1,3 \times 10^{-5}$ mol/L ((-1,0 V) – (+1,2 V); pH: 4 asetat tampon; puls genliği: 0,05V, EPPG elektrot).



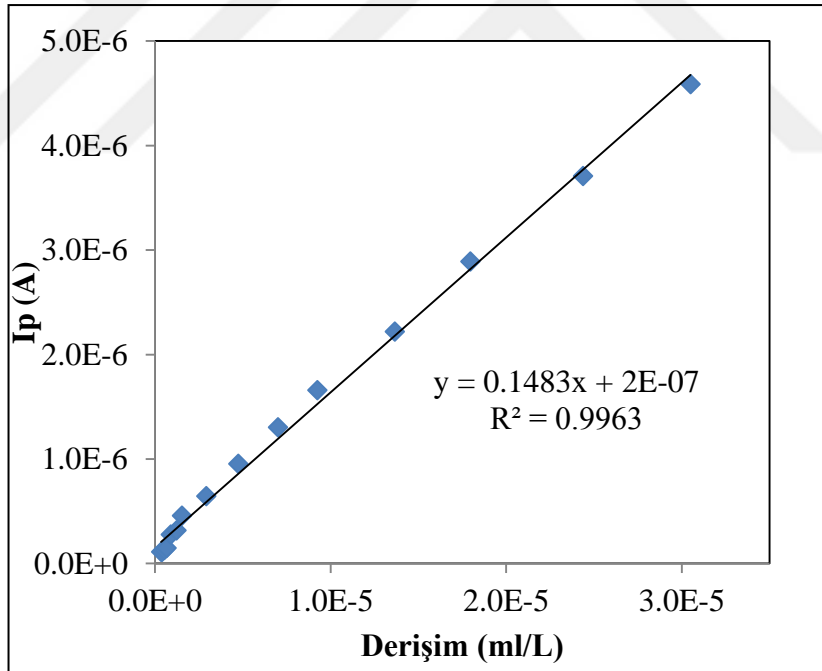
Şekil 5.18: Standart kafeik asidin farklı derişimlerdeki EPPG elektrot ile elde edilen DPV voltamogramları; a) $2,8 \times 10^{-7}$ mol/L, b) $8,8 \times 10^{-7}$ mol/L, c) $1,2 \times 10^{-6}$ mol/L, d) $2,9 \times 10^{-6}$ mol/L, e) $4,7 \times 10^{-6}$ mol/L, f) $1,4 \times 10^{-5}$ mol/L, g) 3×10^{-5} mol/L, h) $4,2 \times 10^{-5}$ mol/L, i) 5×10^{-5} mol/L, j) $6,7 \times 10^{-5}$ mol/L ((-1,0 V) - (+1,2 V); pH: 4 asetat tampon; puls genliği: 0,05 V, EPPG elektrot).



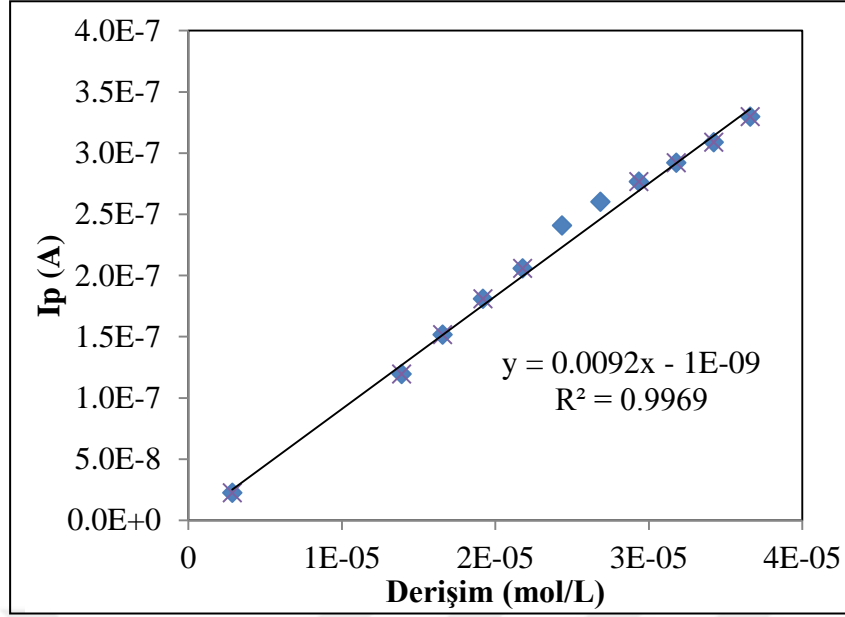
Şekil 5.19: Standart kafeik asidin farklı derişimlerdeki GC elektrotta DPV voltamogramları. a) $7,4 \times 10^{-7}$ mol/L, b) $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L, c) $1,8 \times 10^{-5}$ mol/L, d) $2,17 \times 10^{-5}$ mol/L, e) $2,5 \times 10^{-5}$ mol/L, f) $2,8 \times 10^{-5}$ mol/L, g) $3,1 \times 10^{-5}$ mol/L, h) $3,5 \times 10^{-5}$ mol/L, i) $3,8 \times 10^{-5}$ mol/L, i) 4×10^{-5} mol/L, j) $4,4 \times 10^{-5}$ mol/L ((-1,0 V) - (+1,2 V); pH: 4 asetat tampon; puls genliği: 0,05 V, GC elektrot).



Şekil 5.20: DPV yöntemi ile ferulik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında EPPG elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi.
 $I_p (A) = 0,1381 C_o (mol/L) + 9 \times 10^{-8}$ ($R^2 = 0,9977$) (N=11).



Şekil 5.21: DPV yöntemi ile kafeik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında EPPG elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi.
 $I_p (A) = 0,1483 C_o (mol/L) + 2 \times 10^{-7}$ ($R^2 = 0,9963$) (N=12).



Şekil 5.22: DPV yöntemi ile kafeik asidin pH 4 asetat tamponu ortamında GC elektrotta derişim artışı ile oluşan pik akımlarının kalibrasyon eğrisi.

$$I_p \text{ (A)} = 0,0092 C_o \text{ (mol/L)} - 1 \times 10^{-9} \text{ (R}^2 = 0,9969 \text{) (N=8)}.$$

Kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak ferulik ve kafeik asit için doğrusal aralık, LOD ve LOQ değerleri belirlendi ve Tablo 5.5’de gösterildi.

Tablo 5.5: Standart ferulik ve kafeik asitlerinin tayininde 0,1 M asetat tamponu ortamında (pH: 4) DPV yöntemleri ile elde edilen analitik parametrelerinin karşılaştırılması.

Standart çözelti	Elektrot	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)	LOD (mol L ⁻¹)	LOQ (mol L ⁻¹)
Ferulik Asit	EPPGE	3,39x10 ⁻⁷ - 1,34x10 ⁻⁵	1,49x10 ⁻⁷ ^a	4,97x10 ⁻⁷ ^a
Kafeik Asit	EPPGE	3,39x10 ⁻⁷ - 3,05x10 ⁻⁵	1,33x10 ⁻⁷ ^b	4,44x10 ⁻⁷ ^b
Kafeik Asit	GCE	2,90x10 ⁻⁶ - 3,70x10 ⁻⁵	1,43x10 ⁻⁶ ^c	4,76x10 ⁻⁶ ^c
N için a=8; b=10 ve c=8.				

5.9. Bitkisel Çaylarda Kafeik Asit Tayini

Bitkisel ürünlerin antioksidan etkileri özellikle flavonoidler başta olmak üzere ferulik ve kafeik asit türevleri gibi fenolik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Antioksidan etkisi kanıtlanan fenolik asit ve flavonoidleri içeren bitki çayları yaygın

olarak kullanılmaktadır. Tablo 5.6'de son yıllarda bu tez kapsamında kullanılan bitki çaylarıyla ilgili ferulik ve kafeik asit içeriklerinin farklı yöntemlerle belirlenmiş değerleri gösterilmiştir. Ayrıca bu tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaların sonucunda bitki çaylarında elde edilen kafeik asit değerleri gösterildi.

Bu tez kapsamında standart ekleme metodu ile bitkisel çay örneklerinde standart kafeik asit çözeltisini referans olarak toplam fenolik asidin voltametrik yöntemlerle miktar tayini yapıldı. Çay numunelerinin hazırlanması için 2 g tartılan kuru bitki örnekleri 50 ml saf su içerisinde 30 dakika boyunca 100 °C de kaynatıldı. Hazırlanan çay numuneleri soğumaya bırakıldı ve daha sonra süzme kâğıdı ile süzüldü. 10 ml pH 4 asetat tamponunda hazırlanmış bitki çayı örneklerinin belirli miktarları alındı ve standart ekleme metodu ile standart 1×10^{-3} M kafeik asit çözeltisi eklenerek diferansiyel puls voltamogramları alınmıştır.

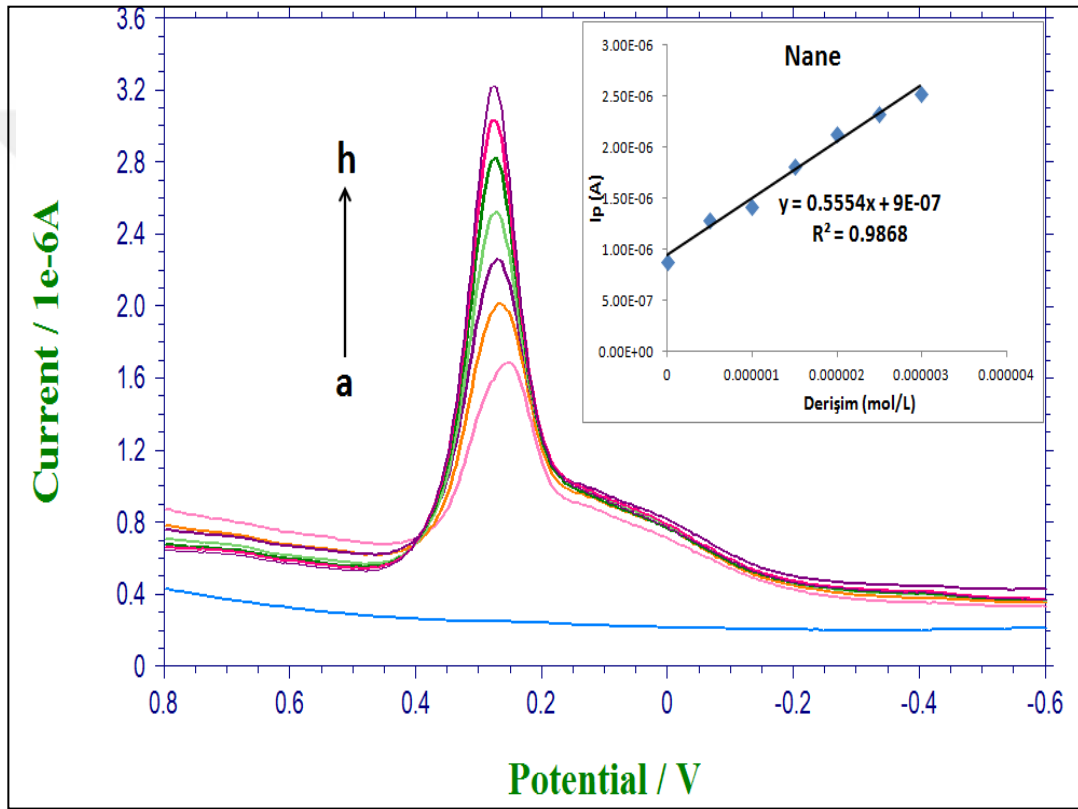
Tablo 5.6: Bitki çaylarında kafeik ve ferulik asit içerikleri.

Bitki çayı	CA (mg/g)	FA (mg/g)	Yöntem	Kaynak
Nane	1.02	1.3	HPLC-PDA	[35]
	0.25	<0.05	LC×LC-MS	[36]
	2.15	0.5	HPLC	[37]
	0.22	-	HPLC	[38]
	0.4-1.9	1.55-5.7	RP-HPLC	[39]
	0.2-0.3	-	HPLC	[40]
	0.15	0.64	HPLC	[41]
	2.44	-	DPV	Bu çalışmada
Civanperçemi	4.29	0.35	RP-HPLC	[42]
	0.46	-	MIC	[43]
	0.87	-	DPV	Bu çalışmada
Ada Çayı	0.11	<0.05	LC×LC-MS	[36]
	0.8	0.77	HPLC	[37]
	1.49	1.48	HPLC-PDA	[35]
	0.3-0.4		HPLC	[40]
	2.96	0.13	RP-HPLC	[42]
	0.08	<0.05	LC×LC-MS	[36]
	0.29	-	DPV	Bu çalışmada
Biberiye	0.4-1.4	0.85-7.55	RP-HPLC	[39]
	0.1-0.2	-	HPLC	[40]
	1.031	0.603	HPLC	[44]
	0.63	-	HPLC	[37]
	0.24	-	DPV	Bu çalışmada
Pıtrak	1.47-1.08	1.82-1.11	UMAE ve ME ekstraktları	[45]
	0.281-0.256- 0.261	-	UMAE ve HRE	[46]
	3.71	-	DPV	Bu çalışmada

HPLC-PDA: Fotodiyot array yöntemi ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi; LC×LC-MS: İki boyutlu sıvı kromatografisi (LC×LC) sistemi-kütle spektrometrisi; UMAE ve ME ekstraktları: Eş zamanlı ultrasonik/mikrodalga destekli ekstraksiyon ve maserasyon ekstraksiyonu; HRE: Isı geri akış ekstraksiyon; MIC: Minimum inhibe edici konsantrasyon yöntemi, DPV: Diferansiyel puls voltametri.

5.9.1. Nane Çayında Kafeik Asit Tayini

Nane çayında kafeik asit tayini için standart ekleme metodu kullanılmıştır. Hazırlanan nane çayı numunesinden içerisinde 10 ml 0,1 M asetat tampon çözeltisi (pH:4) bulunan hücreye 0,03 ml ilave edildi. Çözeltiden 3 dakika boyunca argon gazı geçirildikten sonra DPV ile voltamogramları alındı. Ardından hücreye 1×10^{-3} mol/L standart kafeik asit çözeltisinden ard arda altı defa 0,005 ml ilave edilerek voltamogramlar alındı (Şekil 5.23).

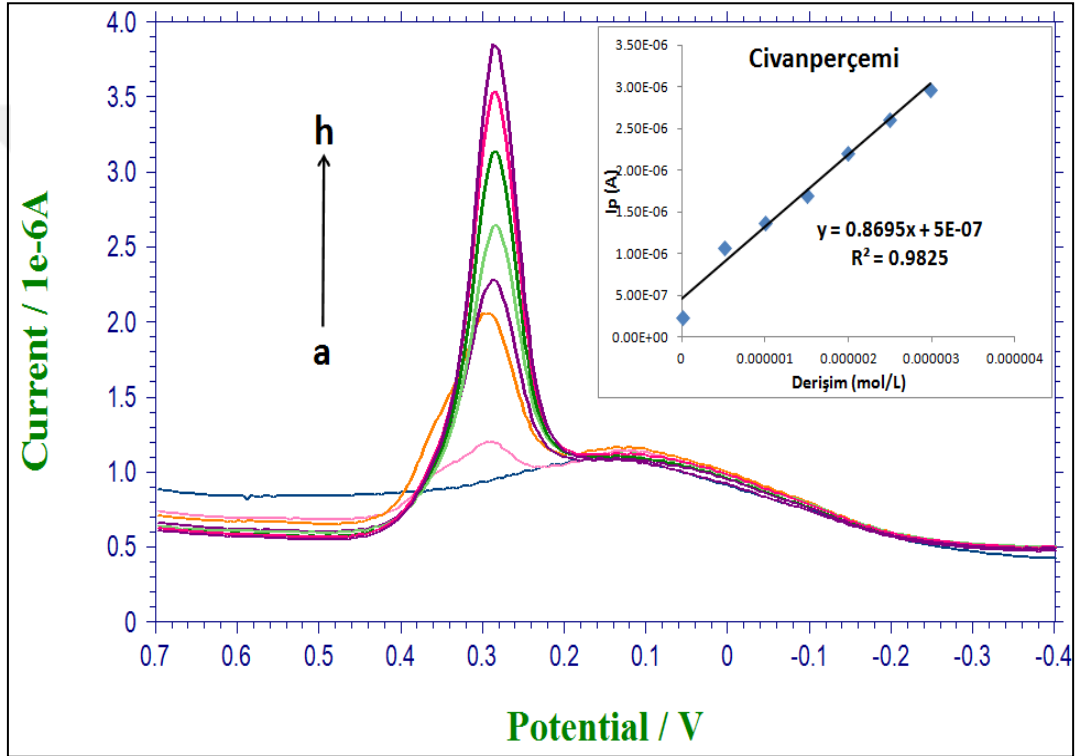


Şekil 5.23: Nane örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğrisi ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliği: 0.05 V, EPPG elektrot). a) 10 ml pH 4 asetat tampon çözeltisi, b) a+0,03 ml nane çayı, c) b+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, d) c+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, e) d+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, f) e+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, g) f+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, h) g+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit.

Standart kafeik asit eklenmesi sonucu oluşan pik akımlarının artışı yardımıyla nane çayının kafeik asit içeriği hesaplandı. 1 g nane çayında kafeik asit miktarı yaklaşık 2,44 mg CA olarak bulunmuştur.

5.9.2. Civanperçemi Çayında Kafeik Asit Tayini

Civanperçemi çayında kafeik asit tayini için standart ekleme metodu kullanılmıştır. Hazırlanan civanperçemi çayı numunesinden, içerisinde 10 ml pH 4 asetat tampon çözeltisi bulunan hücreye 0,03 ml ilave edildi. Çözeltiden 3 dakika boyunca argon gazı geçirildikten sonra DPV ile voltamogramları alındı. Ardından hücreye ard arda altı defa 0,005 ml 1×10^{-3} mol/L standart kafeik asit çözeltisinden ilave edilerek voltamogramlar alındı (Şekil 5.24).

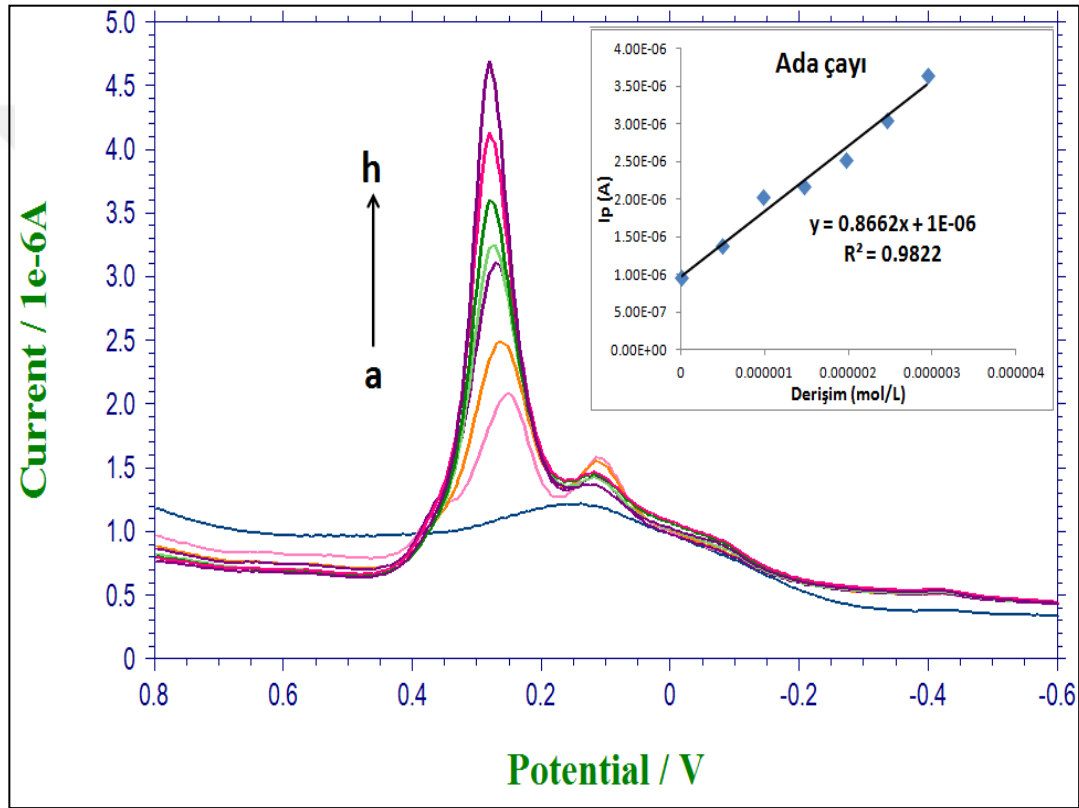


Şekil 5.24: Civanperçemi örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2V) - (+1,0 V), pik genliği: 0,05 V; EPPG elektrot). a) 10 ml pH 4 asetat tampon çözeltisi, b) a+0,03 ml civanperçemi çayı c) b+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, d) c+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, e) d+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, f) e+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, g) f+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, h) g+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit.

Eklenen standart kafeik asit miktarının oluşan pik akımlarına karşı grafiği oluşturuldu ve bu grafik yardımıyla civanperçemi çayının kafeik asit miktarı hesaplandı. 1 g civanperçemi çayında kafeik asit miktarı yaklaşık 0,87 mg CA olarak bulunmuştur.

5.9.3. Ada Çayında Kafeik Asit Tayini

Ada çayında kafeik asit tayini için standart ekleme metodu kullanılmıştır. Hazırlanan ada çayı numunesinden, içerisinde 10 mL pH 4 asetat tampon çözeltisi bulunan hücreye 0,18 ml ilave edildi. Çözeltiden 3 dakika boyunca argon gazı geçirildikten sonra DPV ile voltamogramları alındı. Ardından hücreye ard arda altı defa 0,005 mL 1×10^{-3} mol/L standart kafeik asit çözeltisinden ilave edilerek voltamogramlar alındı (Şekil 5.25).

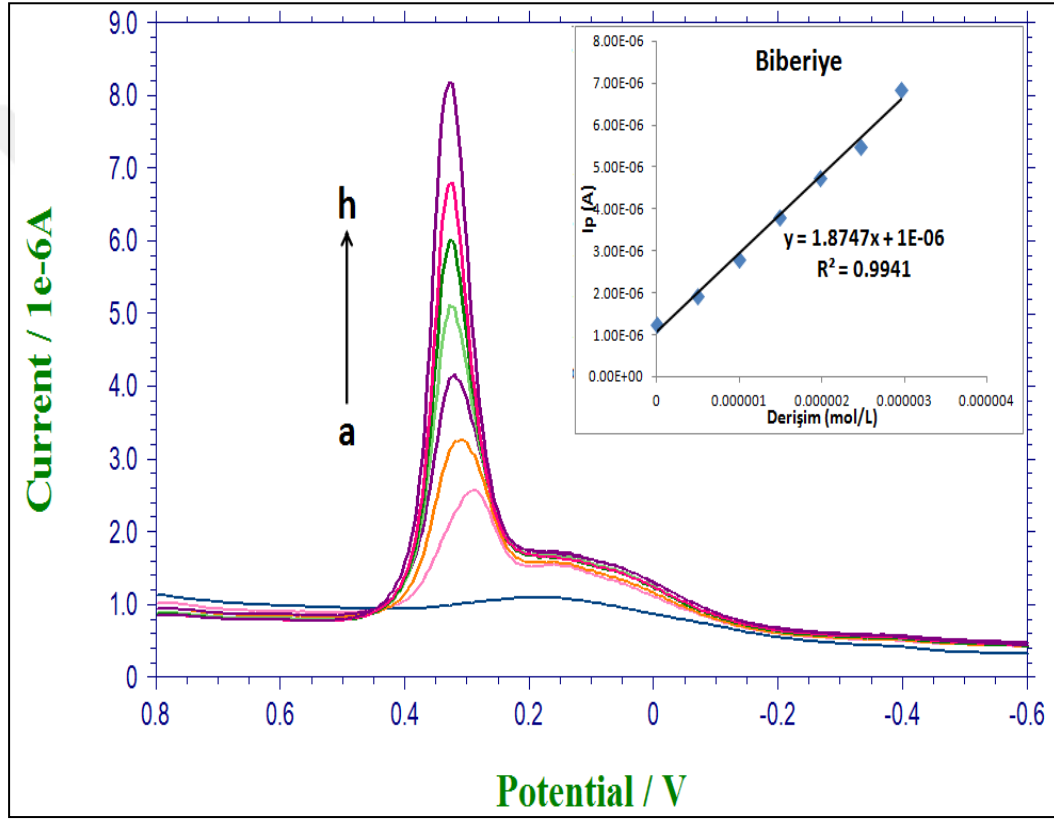


Şekil 5.25: Ada çayı örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliği: 0,05 V, EPPG elektrot). a) 10 mL pH 4 asetat tampon çözeltisi, b) a+0,18 ml ada çayı c) b+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, d) c+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, e) d+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, f) e+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, g) f+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, h) g+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit.

Eklenen standart kafeik asit miktarının oluşan pik akımlarına karşı grafiği oluşturuldu ve bu grafik yardımıyla ada çayının kafeik asit miktarı hesaplandı. 1 g ada çayında kafeik asit miktarı yaklaşık 0,29 mg CA olarak bulunmuştur.

5.9.4. Biberiye Çayında Kafeik Asit Tayini

Biberiye çayında kafeik asit tayini için standart ekleme metodu kullanılmıştır. Hazırlanan ada çayı numunesinden, içerisinde 10 mL pH 4 asetat tampon çözeltisi bulunan hücreye 0,10 ml ilave edildi. Çözeltiden 3 dk boyunca argon gazı geçirildikten sonra DPV ile voltamogramları alındı. Ardından hücreye ard arda altı defa 0,005 mL 1×10^{-3} mol/L standart kafeik asit çözeltisinden ilave edilerek voltamogramlar alındı (Şekil 5.26).

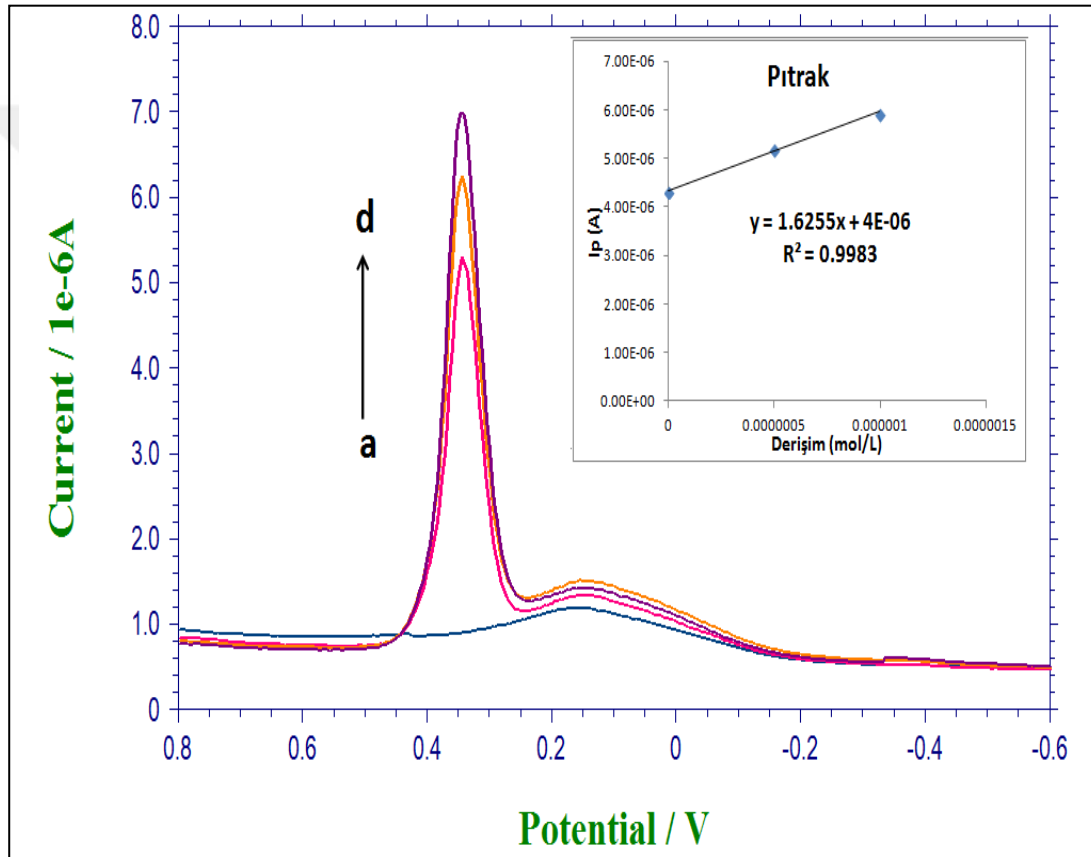


Şekil 5.26: Biberiye örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliği: 0,05 V, EPPG elektrot). a) 10 mL pH 4 asetat tampon çözeltisi, b) a+0,10 ml biberiye çayı, c) b+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, d) c+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, e) d+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, f) e+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, g) f+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, h) g+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit.

Eklenen standart kafeik asit miktarının oluşan pik akımlarına karşı grafiği oluşturuldu ve bu grafik yardımıyla biberiye çayının kafeik asit miktarı hesaplandı. 1 g biberiye çayında kafeik asit miktarı yaklaşık 0,24 mg CA olarak bulunmuştur.

5.9.5. Pıtrak (*Arctium lappa*) Çayında Kafeik Asit Tayini

Pıtrak (*Arctium lappa*) çayında kafeik asit tayini için standart ekleme metodu kullanılmıştır. Hazırlanan pıtrak çayı numunesinden, içerisinde 10 mL pH 4 asetat tampon çözeltisi bulunan hücreye 0,10 mL ilave edildi. Çözeltiden 3 dakika boyunca argon gazı geçirildikten sonra DPV ile voltamogramları alındı. Ardından hücreye ard arda altı defa 0,005 ml 1×10^{-3} mol/L standart kafeik asit çözeltisinden ilave edilerek voltamogramlar alındı (Şekil 5.27).

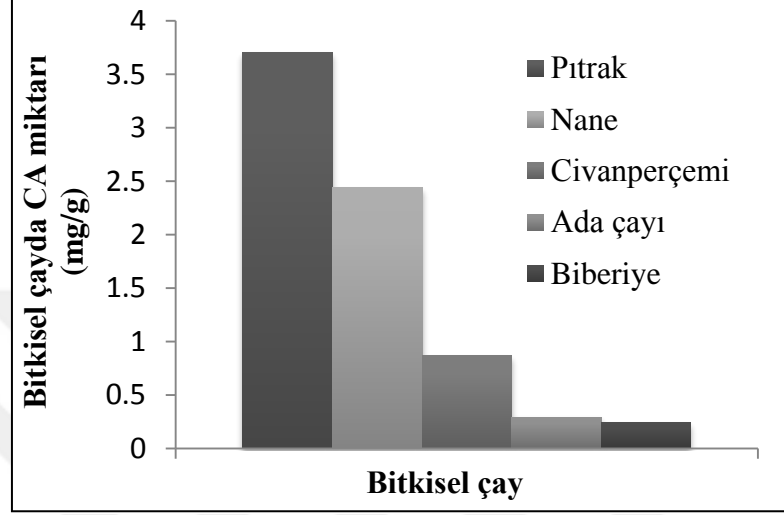


Şekil 5.27: Pıtrak çayı örneğinin standart ekleme metodu ile DPV yönteminde alınan voltamogramları ve pik akımlarının derişim artışı ile oluşturulan eğri ((-1,2 V) - (+1,0 V), pik genliği: 0,05 V, EPPG elektrot). a) 10 ml pH 4 asetat tampon çözeltisi, b) a+0,03 ml pıtrak çayı, c) b+0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit, d) c +0,005 ml 1×10^{-3} mol/L kafeik asit.

Eklenen standart kafeik asit miktarının oluşan pik akımlarına karşı grafiği oluşturuldu ve bu grafik yardımıyla pıtrak çayının kafeik asit miktarı hesaplandı. 1 g pıtrak çayında kafeik asit miktarı yaklaşık 3,71 mg CA olarak bulunmuştur.

5.10. Bitkisel Çay Örneklerinde Kafeik Asit İçeriklerinin Karşılaştırılması ve Geri kazanım Hesabı

Standart ekleme metodu ile bitki çaylarında miktar tayini yapılmıştır. Şekil 5.28'da 1 g kuru çay örneklerinin içerdiği kafeik asit oranları gösterilmiştir.



Şekil 5.28: 1 g bitki çayında bulunan kafeik asit miktarı.

Standart kafeik asit çözeltileri için uygulanan çalışma koşulları, bitki çaylarında kafeik asit içeriğinin belirlenmesinde kullanıldı. Bitki çaylarının 10 ml pH 4 asetat tamponunda (-1.0 V) - (+1,2 V) potansiyel aralığında, 0.1 V/s tarama hızında EPPG elektrot kullanılarak DPV voltamogramları alındı. Nane, civanperçemi ve pıtrak çaylarından 0,03 ml, ada çayından 0,18 ml, biberiye çayından 0,10 ml kullanıldı. Bu numunelere 6 mM, 8 mM ve 10 mM standart kafeik asit çözeltilerinden ilave edilerek geri kazanım değerleri Tablo 5.7'de gösterildi.

Tablo 5.7: Bitki çaylarının kafeik asit tayininde EPPG çalışma elektrodu ve DPV yöntemi ile elde edilen % geri kazanım değerleri.

Çay örneği	İlk bulunan ($\times 10^{-3}$ mg CA)	Eklenen ($\times 10^{-3}$ mg CA)	Son bulunan ($\times 10^{-3}$ mg CA)	% Geri kazanım ortalama
Nane	10,42	10,81	21,04	97,18
	6,18	14,41	19,70	
	7,97	18,02	25,89	
Civanperçemi	0,85	10,81	11,51	96,36
	0,65	14,41	14,42	
	1,37	18,02	18,48	
Ada çayı	3,83	10,81	14,66	101,56
	9,37	14,41	24,42	
	10,72	18,02	28,76	
Biberiye	10,06	10,81	21,62	102,26
	11,94	14,41	26,76	
	12,87	18,02	32,01	
Pıtrak	49,60	10,81	60,21	97,55
	49,91	14,41	65,31	
	78,51	18,02	94,31	

6. SONUÇLAR

Ferulik ve kafeik asitin elektrokimyasal davranışının voltametrik yöntemler ile incelenmesi ve bazı bitki örneklerinde tayini amaçlanan bu çalışmada;

- Optimum pH 4 olarak belirlendi.
- Ferulik ve kafeik asidin elektrot yüzeyine difüzyon ile taşındığı ve aynı zamanda elektrot yüzeyine adsorbe olduğu belirlendi.
- GC ve EPPG çalışma elektrotlarının kullanıldığı voltametrik ölçümlerde EPPG elektrotunun GC elektroda göre daha iyi ve geniş potansiyel aralığına sahip olduğu, daha hassas ve duyarlı sonuçlar verdiği gözlemlendi.
- Voltametrik yöntemin seçimi için yapılan deneysel çalışmalar sonucunda CV ve DPV yöntemlerinin verdiği sonuçlar karşılaştırıldığında DPV'nin daha duyarlı ve hassas sonuçlar verdiği görüldü.
- Ferulik asidin EPPG elektrotta DPV yöntemi ile gözlenen pik akımlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinde $3,39 \times 10^{-7}$ - $1,34 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu LOD ve LOQ değerlerinin sırası ile $1,49 \times 10^{-7}$ ve $4,97 \times 10^{-7}$ M olarak,
- Kafeik asidin EPPG elektrotta DPV yöntemi ile gözlenen pik akımlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinde $3,39 \times 10^{-7}$ - $3,05 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu LOD ve LOQ değerlerinin sırası ile $1,33 \times 10^{-7}$ M ve $4,44 \times 10^{-7}$ M olarak,
- Kafeik asidin GC elektrotta DPV yöntemi ile gözlenen pik akımlarının derişime karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinde ise $2,9 \times 10^{-6}$ - $3,7 \times 10^{-5}$ M aralığında doğrusal olduğu LOD ve LOQ değerlerinin sırası ile $1,43 \times 10^{-6}$ M ve $4,76 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı.

Çalışma koşullarının belirlenmesinden sonra, EPPG elektrotta DPV yöntemi ile bitki çaylarında fenolik asitlerin miktar tayini için referans olarak kafeik asit seçildi ve uygulanabilirliği araştırıldı.

- Nane, biberiye, ada çayı, civanperçemi ve pıtrak bitki çaylarında kafeik asit miktar tayini standart ekleme metodu ile yapıldı. Hazırlanan bitki çaylarının

arasında en fazla pıtrak bitki çayının kafeik asit içeriğine sahip olduğu görüldü (Şekil 5.28).

- Bu tez kapsamında kullanılan bitki çaylarıyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda ferulik ve kafeik asit içerikleri farklı yöntemlerle belirlenmiş değerleri ve bu tez kapsamında ölçülmüş olan değerler Tablo 5.7'de gösterilmiştir. HPLC gibi pahalı ve uzun analiz süresi gerektiren yöntemlerin aksine daha düşük maliyetli, pratik, hızlı ve duyarlı olan voltametrik yöntemler kullanılarak fenolik asit tespitinin yapılabileceğini gösterdi.

- Ayrıca kafeik asidin kalibrasyon grafiği yardımıyla bulunan değerlerden standart çözeltiye ilave edilen bitki çayı numunesinin %95 güven seviyesinde geri kazanımı Tablo 5.8 verildi ve geri kazanım % 97,2-102,3 arasında elde edildi.

KAYNAKLAR

- [1] Meral R., Dođan İ. S., Kanberođlu G. S., (2012), “Fonksiyonel Gıda Bileşeni Olarak Antioksidanlar”, Iğdır Üniversitesi, Journal of The Institute of Science and Technology, 2 (2), 45-50.
- [2] Web 1, (2016), https://www.dispersions-pigments.basf.com/portal/basf/ien/dt.jsp?setCursor=1_556325, (Erişim tarihi: 30/01/2016).
- [3] Web 2, (2016), <http://www.bitkiseldiyet.com/antioksidan-nedir-faydalanir.html>, (Erişim tarihi: 30/01/2016).
- [4] Öđüt S., (2014), “Doğal Antioksidanların Önemi”, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (1), 25-30.
- [5] Dobes J., Zitka O., Sochor J., Ruttkay-Nedecky B., Babula P., Beklova M., Kynicky J., Hubalek J., Klejdus B., Kizek R., Adam V., (2013), “Electrochemical Tools for Determination of Phenolic Compounds in Plants. A review” International Journal of Electrochemical Science, 8, 4520-4542.
- [6] Özdatlı Ş., Sipahi H., Charehsaz M., Aydın A., Yeşilada E., (2014), “Bitki Çaylarına Bal İlavesinin Total Antioksidan Kapasitesine Etkisi”, Marmara Pharmaceutical Journal, 18, 147-152.
- [7] Bianchini C., Curulli A., Pasquali M., Zane D., (2014), “Determination of Caffeic Acid in Wine Using PEDOT Film Modified Electrode”, Food Chemistry, 156, 81-86.
- [8] Filik H., Çetintaş G., Avan A. A., Aydar S., Koç S. N., Boz İ., (2013), “Square-Wave Stripping Voltammetric Determination of Caffeic Acid on Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Nafion Composite Film”, Talanta, 116, 245-250.
- [9] Silva L. F., Stradiotto N. R., Oliveira H. P., (2008), “Determination of Caffeic Acid in Red Wine by Voltammetric Method”, Electroanalysis, 20 (11), 1252-1258.
- [10] Tyszczyk K., Skalska-Kaminska A., Wozniak A., (2011), “Voltammetric Method Using a Lead Film Electrode for the Determination of Caffeic Acid in a Plant Material”, Food Chemistry, 125, 1498-1503.
- [11] Wang X. G., Li J., Fan Y.J., Zhang X., (2012), “Determination of Ferulic Acid in Chinese Proprietary Medicine Based on a Poly-Glutamic Acid Film Sensor”, Russian Journal of Electrochemistry, 48 (12), 1160-1165.

- [12] Souza L. P., Calegari F., Zarbin A. J. G., Marcolino-Junior L. H., Bergamini Marcio F., (2011), "Voltammetric Determination of the Antioxidant Capacity in Wine Samples Using a Carbon Nanotube Modified Electrode", *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59, 7620–7625.
- [13] Yıldız H., Baysal T., (2003), "Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri", *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 39, 29-35.
- [14] Nizamlıoğlu N. M., Nas S., (2010), "Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri", *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5 (1), 20-35.
- [15] Kahraman A., Serteser M., Koken T., (2002), "Flavonoidler", *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3, 01-08.
- [16] Skoog D.A., West D.M., (1981), "Principles of Instrumental Analysis", 2nd Edition, Saunders: Philadelphia.
- [17] Skoog, D.,A., Holler, F., J., West, D., M., Crouch, R., S., (2004), "Fundamentals of Analytical Chemistry", 8th Edition, Thomson-Brooks/Cole.
- [18] Tural H., Gökçel H., Ertas F.N., (2003), "Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler", *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, 131, 194-197.
- [19] Yüce M., (2011), "Bazı Ağır Metallerin Tayininde Kullanılmak Üzere Mikrobiyal Biyosensör Geliştirilmesi", *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi*.
- [20] Gündüz T., (2012), "Enstrümental Analiz", 11. Baskı, Gazi Yayınevi.
- [21] Yıldız A., Genç Ö., (1993), "Enstrümental Analiz", *Hacettepe Üniversitesi Yayınları*.
- [22] Gürler N., (2012), "Valsartan'ın Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi ve Tayini için Anodik Adsorptif Sıyırma Yönteminin Geliştirilmesi", *Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi*.
- [23] Gökmeşe, F., (2004), "Bazı Naftaldimin ve Salisildiminlerin Çeşitli Voltametrik Tekniklerle Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi", *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi*.
- [24] Bard, A.J., Faulkner, L.R., (2001), "Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications", 2nd Edition, John Wiley and Sons, Incorporated.
- [25] Şen S., (2014), "Tetra sodyum;3-[[4-[[4-[(6-Amino-1-Hidroksi-3-Sülfonato-2-Naftilazo)]-6-Sülfonato-1-Naftil]Azo]-1-Naftil]Azo] Naftalin-1,5 Disülfonat (Direct Blue 71)'in Elektrokimyasal İndirgenme Davranışının Belirlenmesi", *Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi*.

- [26] Abdel-Hamid R., Newair E. F., (2015), "Voltammetric Determination of Ferulic Acid Using Polypyrrole-Multiwalled Carbon Nanotubes Modified Electrode with Sample Application", *Nanomaterials*, 5, 1704-1715.
- [27] Liu L. J., Gao X., Zhang P., Feng S., Hu F., Li Y., Wang C., (2014), "Ultrasensitive Detection of Ferulic Acid Using Poly(Diallyldimethylammonium Chloride) Functionalized Graphene-Based Electrochemical Sensor", *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1-9.
- [28] Sousa W. R., Rocha C., Cardoso C. L., Silva D. H. S., Zanoni M. V. B., (2004), "Determination of The Relative Contribution of Phenolic Antioxidants in Orange Juice by Voltammetric Methods", *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 619-633.
- [29] Brčanović J. M., Pavlović A. N., Mitić S. S., Stojanović G. S., Manojlović D. D., Kalicanin B. M., Veljković J. N., (2013), "Cyclic Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity of Cocoa Powder, Dark Chocolate And Milk Chocolate Samples: Correlation with Spectrophotometric Assays and Individual Phenolic Compounds", *Food Technology and Biotechnology*, 51 (4), 460-470.
- [30] Romani A., Minunni M., Mulinacci N., Pinelli P., Vincieri F. F., (2000), "Comparison Among Differential Pulse Voltammetry, Amperometric Biosensor, and HPLC/Dad Analysis for Polyphenol Determination", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1197-1203.
- [31] Magarelli G., Silva J. G., Filho I. A. S., Lopes I. S. D., SouzaDe J. R., Hoffmann L. V., Castro C. S. P., (2013), "Development and Validation of a Voltammetric Method for Determination of Total Phenolic Acids in Cotton Cultivars", *Microchemical Journal*, 109, 23-28.
- [32] İnan D., (2013), "Histaminin Kare Dalga Sıyırma Voltametrisi ile Tayini ve Uygulanması", Yüksek Lisans Tezi, Nevşehir Üniversitesi.
- [33] Yavaş A. N., (2014), "Karbon Pasta Elektrotların Bitki Dokuları ile Modifikasyonu ve Elektrokataliz Özelliklerinin İncelenmesi" Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi.
- [34] The Singapore Accreditation Council (SAC), (2008), "Technical Guide 2: A Guide on Measurement Uncertainty in Chemical and Microbiological Analysis", 2 nd Edition, Spring Singapore.
- [35] Kulisić-Bilusić T., Katalinić V., Dragović-Uzelac V., Ljubenkov I., Krisko A., Dejanović B., Jukić M., Politeo O., Pifat G., Milos M., (2008), "Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibiting Activity of Several Aqueous Tea Infusions in Vitro", *Food Technology Biotechnology*, 46 (4) 368-375.

- [36] Kivilompolo M., Hyöylainen T., (2007), "Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography an Analysis of Lamiaceae Herbs: Haracterisation and Quantification of Antioxidant Phenolic Acids", *Journal of Chromatography A*, 1145, 155-164.
- [37] Vladimir-Knežević S., Blažeković B., Kindl M., Vladić J., Lower-Nedza A. D., Brantner A. H., (2014), "Acetylcholinesterase İnhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family", *Molecules*, 19, 767-782.
- [38] Dorman H. J. D., Koşar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R., (2003), "Antioxidant Properties and Composition of Aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties, and Cultivars", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4563-4569.
- [39] Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M., (2008), "Investigation of the Antioxidant Behavior of Air- and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5743-5752.
- [40] Wang H., Provan G. J., Helliwell K., (2004), "Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC", *Food Chemistry*, 87, 307-311.
- [41] Tahira R., Naeemullah M., Akbar F., Masood M. S., (2011), "Major Phenolic Acids of Local and Exotic Mint Germplasm Grown in İslamabad", *Pakistan Journal of Botany*, 43, 151-154.
- [42] Wojdyło A., Oszmianski J., Czemerys R., (2007), "Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in 32 Selected Herbs", *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- [43] Mărghitaş L., Dezmirean D., Chirilă F., Fiş N., Bobiş O., (2011), "Antibacterial Activity of Different Plant Extracts and Phenolic Phytochemicals Tested on *Paenibacillus Larvae Bacteria*", *Animal Science and Biotechnologies*, 44 (2), 94-99.
- [44] Grigore A., Pirvu L., Bubueanu C., Panteli M., Rasit I., (2015), "Influence of Chemical Composition on the Antioxidant and Anti-İnflammatory Activity of *Rosmarinus Officinalis* Extracts", *Romanian Biotechnological Letters*, 20 (1), 10047-10054.
- [45] Lou Z., Wang H., Li J., Zhu S., Lu W., Ma C., (2011), "Effect of Simultaneous Ultrasonic/Microwave Assisted Extraction on the Antioxidant and Antibacterial Activities of Burdock Leaves", *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (22), 5370-5377.

ÖZGEÇMİŞ

Sevinç GÜLYÜZ 1989 yılında İstanbul'da doğdu. 2007 yılında başladığı Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2012 yılında üçüncülükle tamamlayarak 2014 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı.



EKLER

EK A: LOD ve LOQ Hesaplanması

Ferulik ve kafeik asitin LOD ve LOQ hesaplamaları için;

$$LOD = 3 \frac{s}{m} \quad (A1.1)$$

$$LOQ = 10 \frac{s}{m} \quad (A1.2)$$

eşitlikleri kullanıldı [7]. Bu eşitlikte;

- s : standart sapma
- m : kalibrasyon grafiğinin eğimidir.

EK B: Geri Kazanımın Hesaplanması

Bitki çaylarında standart kafeik asit ilave edilerek yapılan geri kazanım deneyleri için;

$$Geri\ kazanım = \frac{m_2 - m_1}{m_s} \times 100 \quad (B1.1)$$

eşitliği kullanıldı [34]. Bu eşitlikte;

- m_1 : Ölçülen örneğin kütlesi
- m_2 : Ölçülen örneğin kütlesi + standardın kütlesi
- m_s : Örneğe eklenen standardın kütlesidir.