T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE BİSÜLFİT TAYİNİ İÇİN YENİ BİR SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet BAYKARA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 18.07.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr.Mustafa ÖZYÜREK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte

Prof. Dr.Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Fakülte

Prof. Dr.Kubilay GÜÇLÜ
Adnan Menderese Üniversitesi
Fakülte

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin ..... numaralı projesi ile desteklenmiştir.
Bu tez, ... numaralı ..... projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik kariyerimin başlangıcı olarak nitelendirdiğim bu süreçte, çalışmalarıma özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e

Bilimsel ve akademik kimlikleriyle örnek aldığım; çalışmalarım süresince gerekli analizlerin yapılması hususunda tecrübelerinden yararlandığım ve aralarında yer almaktan mutluluk duyduğum değerli hocalarım Sayın Prof.Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye ve Prof.Dr. Mehmet ALTUN'a

Tezimin sentez kısmında bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen değerli dostum Öğr.Gör. Emin Ahmet YEŞİL'e

Sevgili aileme ve çok değerli arkadaşlarıma yardımları ve destekleri için yürekten teşekkür ederim.

Haziran 2019 Mehmet BAYKARA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
ÖZET ..... **xi**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **4**
2.1. HSO_3^- NEDİR ? GIDALARDA BİSÜLFİT KULLANIMI 4
2.2. BİSÜLFİT MİKTARININ TAYİN EDİLMESİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ 5
2.2.1. Gıdalarda Bisülfit Kullanımı Ve Maruz Kalma 6
2.2.2. Serbest Sülfit Miktarına Karşı Toplam Sülfit Miktarı Ölçümü 7
2.2.3. Sülfit Analizinin Kritik Bir Değerlendirmesi 8
2.2.4. Floresans Spektroskopisi 9
2.3.GIDALARDAKİ SÜLFİT VE KİMYASI 10
2.3.1. pH'ın Sülfit Üzerindeki Etkisi 11
2.3.2. Sülfitlerin Karbonillerle Reaksiyonları 12
2.3.3. Sülfitlerin Şekeri Azaltan Tepkimeleri 12
2.3.4. Sülfitlerin Proteinler ve Amino Asitler ile Tepkimeleri 13
2.3.5. Sülfitlerin Vitaminlerle Reaksiyonları 13
2.3.6.Sülfitlerin Nükleik Asitler ve Nükleotidlerle Reaksiyonları 14
2.3.7. Sülfitlerin Pigmentlerle Reaksiyonları 15
2.3.8. Sülfitlerin Yağ Asitleriyle Reaksiyonları 15
2.3.9. Belirli Gıdalarda Sülfitlerin Miktarları 15
2.3.10. Gıdalardaki Sülfit Sonucunun Belirlenmesinde Kritik Faktörler 16
2.4. PROB MEKANİZMALARI 17
2.4.1.Prob Moleküller Ve Bisülfit Arasında Gerçekleşen Etkileşim Mekanizmaları 18
2.5. YAKIN KIZILÖTESİ (NEAR INFRARED, NIR) ESASLI FLORESAN PROBLAR 20

2.6. LİTERATÜRDE YAPILAN ÇALIŞMALAR....25
3. MALZEME VE YÖNTEM....30
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR....30
3.2. KİMYASAL MADDELER....30
3.3. BİSÜLFİT İÇİN GELİŞTİRİLEN PROBUN SENTEZİ VE MEKANİZMASI....30
3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI....32
3.5. ÖRNEK HAZIRLANMASI....32
3.6. GELİŞTİRİLEN FLOROMETRİK YÖNTEM....32
3.7. DTNB REFERANS YÖNTEMİ....33
4. BULGULAR....34
4.1. NIR-BS PROBU İLE FLOROMETRİK BİSÜLFİT TAYİNİ....34
4.1.1. Florometrik Bisülfit Tayin Yönteminin Optimizasyonu....34
4.1.2. İnkübasyon Süresi....36
4.1.4. pH Etkisi....37
4.1.5. İnterferans Etkisi....37
4.2. BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE FLOROMETRİK BİSÜLFİT TAYİNİ....39
4.2.1. Bazı Şarap Örneklerinin Bisülfit İçeriklerinin Belirlenmesi....39
4.2.2. Bazı Kayısı Örneklerinin Bisülfit İçeriklerinin Belirlenmesi....43
4.3. BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE REFERANS YÖNTEMLE BİSÜLFİT TAYİNİ....46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ....47
KAYNAKLAR....52
ÖZGEÇMİŞ....61

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Sülfitlerin dönüşüm denklemleri. 11

Şekil 2.2: PET mekanizmasının etkin olduğu floresan prob. 17

Şekil 2.3: Siklizasyon mekanizmasının etkin olduğu floresan prob. 18

Şekil 2.4: Aldehit grubu bisülfitin nükleofilik reaksiyonuna dayanan florojenik prob örneği. 19

Şekil 2.5: Levunilat grubunun seçici olarak bisülfit yapıdan hidroliz edilmesi. 19

Şekil 2. 6: Koordinatif etkileşim ile bisülfit katılması. 19

Şekil 2.7: Micheal katılması reaksiyonunu içeren prob örneği. 20

Şekil 2.8: Near-Infrared bölgede emisyon değerlerine sahip polimetinsiyanin (a) ve bodıpy (b) floroforları. 21

Şekil 2.9: Heptametin (ICG) ve kloro-heptametin (Cy7-Cl) siyanin yapıları ve türevleri. 23

Şekil 2.10: Yeni NIR siyanin bileşiklerinin sentez mekanizması. 24

Şekil 2.11: Kumarin, florosein ve hemisiyanin boyalarının molekül yapıları. 24

Şekil 2.12: Bisülfite duyarlı fenantroimidazol türevi "turn-on" floresan prob örneği. 25

Şekil 2.13: Bisülfit tayini için "turn-off" floresan prob örneği (HHC). 26

Şekil 2.14: SPH'ın bisülfit ile reaksiyonu. 27

Şekil 2.15: Probe 1'in bisülfitle gerçekleşen katılma reaksiyonu. 28

Şekil 2.16: Probun bisülfit ile katılma reaksiyonu 29

Şekil 3.1: NIR-BS probunun sentez mekanizması. 31

Şekil 3.2: NIR-BS molekülünün yapısını oluşturan kısımların özellikleri. 31

Şekil 3.3: NIR-BS ve HSO_3^- arasında gerçekleşen reaksiyon mekanizması. 31

Şekil 4.1: HSO_3^- (0-12,5 μM) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm) 35

Şekil 4.2: HSO_3^-'in florometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi. 35

Şekil 4.3: NIR-BS probunun tek başına ve HSO_3^- katkılı intensite değerlerinin (λ_{em}=720 nm) inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi. 36

Şekil 4.4: NIR-BS probunun tek başına ve HSO_3^- katkılı UV-görünür alan spektrumları. 36

Şekil 4.5: NIR-BS + NIR-BS + HSO_3^- çözeltisinin intensite değerlerinin (λ_{em}=720 nm) pH'ya bağlı olarak değişimi. 37

Şekil 4.6: Bazı anyonların ve biyotiyollerin (1,0 mM) ve HSO_3^-'in karşılaştırmalı olarak florometrik yöntemle elde edilen intensite değerleri (λ_{em}=720 nm). 38

Şekil 4.7: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) beyaz şarap örneklerinin (1:100 oranında seyreltilmiş) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm). 39

Şekil 4.8: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) kırmızı öküzgözü şarap örneklerinin (1:100 oranında seyreltilmiş) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm). 40

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Kodeks GSFA, Avrupa Birliği mevzuatı ve ulusal mevzuata göre sülfitlerin maksimum seviyeleri. 3

Tablo 2.1: Sülfitleme ajanları ve formülleri. 10

Tablo 4.1: Bisülfitin konsantrasyon (c)-intensite (I) değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm) ve doğru denklemi 34

Tablo 4.2: Beyaz şarabın hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62). 39

Tablo 4.3: Kırmızı öküzgözü şarabının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62). 40

Tablo 4.4: Kırmızı sek şarabın hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62). 41

Tablo 4.5: Şarap örneklerine HSO_3^- katkıları ile elde edilen sonuçlar (N=3). 42

Tablo 4.6: Hasanbey kayısı ekstraktının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 211,01). 43

Tablo 4.7: Zerdali kayısı ekstraktının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,06). 44

Tablo 4.8: Kayısı türlerine HSO_3^- katkıları ile elde edilen sonuçlar (N=3). 45

Tablo 4.9: NIR esaslı florometrik yöntem ve DTNB yöntemi ile bazı şarap örneklerinin HSO_3^- içerikleri. 46

Tablo 4.10: NIR esaslı florometrik yöntem ve DTNB yöntemi ile bazı kayısı türlerinin HSO_3^- içerikleri. 46

Tablo 5.1: Literatürde HSO_3^- tayininde kullanılan bazı probların LOD değerleri 50

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

c **:** Konsantrasyon

I **:** İntensite

M **:**Molarite

r **:** Lineer korelasyon katsayısı

λ_{ex} **:** Eksitasyon dalgaboyu

λ_{em} **:** Emisyon dalgaboyu

ε **:** Florometrik olarak molar emisyon katsayısı

Kısaltmalar **Açıklama**

DNA : Deoksiribo nükleik asit

DTNB : 5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoik asit

FAD : Flavin adenin dinükleotid

FMN : Flavin mononükleotid

FRET : Rezonans etkisiyle gerçekleşen enerji transferi

HSO_3^- : Bisülfit

ICT : Molekül içi yük transferi

LOD : Dedeksiyon limiti - tayin edilebilen minimum miktar

MR : Manyetik rezonans

NAD : Nikotinamid adenin dinükleotid

NIR : Yakın kızılötesi, near infrared

NIR-BS : NIR esaslı bisülfit probu

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

OLED : Organik ışık yayan diyot

RNA : Ribonükleik asit

PET : Uyarılmış elektron transferi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE BİSÜLFİT TAYİNİ İÇİN YENİ BİR SPEKTROFLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet BAYKARA

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Bazı mikroorganizmaların büyümesini sınırlandırabilmesi ve küflenmeyi önleyebilmesi nedeniyle bisülfit (HSO_3^-), yiyecek ve içeceklerde koruyucu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu anyon aynı zamanda hücreler, dokular ve biyomakromoleküller üzerinde zararlı etki oluşturan atmosferik ana kirleticilerden biridir. Bu nedenle, HSO_3^-'in doğrudan dedeksiyonu için basit, duyarlı ve hızlı yöntemler gereklidir. Son yıllarda, floresan (florojenik) problar, yüksek seçimlilikleri, düşük dedeksiyon limitleri (yüksek duyarlılıkları) ve gerçek-zamanlı görüntülenmesi gibi özellikleri nedeniyle HSO_3^- dedeksiyonu için önemli ilgi görmektedir. Bu tez çalışmasında, Michael-katılma reaksiyon mekanizmasına dayanan NIR-BS bileşiği, HSO_3^- dedeksiyonu için ilk kez prob olarak kullanılmıştır (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm). Nükleofilik bir anyon olarak HSO_3^-, Michael-katılma mekanizmasıyla C=C çifte bağına saldırabilmektedir. Bu prob, bir hemisiyanin boyası ve resorsinol bileşiğinden oluşmaktadır. NIR-BS probunun HSO_3^- ile inkübasyonu sonucunda proba ait floresans şiddeti azalmaktadır, çünkü NIR-BS floresan olduğu halde HSO_3^- katkılı ürünü değildir. NIR-BS probunun floresansındaki azalma (ΔI), HSO_3^- konsantrasyonuna bağlıdır. HSO_3^- varlığında ve yokluğunda ölçülen floresans intensitelerinin farkından (ΔI) yararlanarak gerçek örneklerin HSO_3^- içerikleri tayin edilmiştir. HSO_3^- konsantrasyonu (3,01- 0,11 μM aralığında) ile ΔI arasında doğrusal bir ilişki vardır (r=0,998). Önerilen probla HSO_3^-, seçimli olarak dedekte edilebilmekte ve bu prob 0,045 μM LOD değeriyle yüksek duyarlılık göstermektedir. HSO_3^- dedeksiyonu için hız, yüksek seçimlilik ve duyarlılık gibi avantajlarından dolayı, önerilen bu yaklaşım bazı kayısı ve şarap örneklerinde HSO_3^- tayininde başarıyla uygulanmıştır. NIR-esaslı

florometrik yöntem ile bulunan sonuçlar referans yöntem olarak seçilen DTNB yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Bu yöntem ile DTNB yöntem bulguları arasında iyi bir korelasyon bulunmaktadır.

Haziran 2019, 61. sayfa.

Anahtar kelimeler: Bisülfit, florojenik prob, NIR-BS, florometrik yöntem, şarap, kayısı.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DEVELOPMENT OF A NOVEL SPECTROFLUOROMETRIC METHOD FOR DETECTION OF BISULFITE IN SOME FOODS AND BEVERAGES

Mehmet BAYKARA

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Due to of its capability to restrain the growth of some microorganisms and prevent mildew, bisulfite (HSO_3^-) is widely used in food and beverages as a preservative. This anion is also one of the main atmospheric pollutants, having harmful effect on cells, tissues, and biomacromolecules. So simple, rapid and sensitive methods for the direct detection of HSO_3^- are necessary. Fluorescent (fluorogenic) probes has received significant attention for the detection of HSO_3^- in recent years because of their high selectivity, low detection limits (high sensitivity), and real-time visiualization. In this thesis, NIR-BS has been firstly used as a probe for the fluorometric detection of HSO_3^- based on Michael-addition reaction mechanism (λ_{ex}=685 nm; λ_{em}=720 nm). HSO_3^- as a nucleophilic anion can attack the C=C bond *via* a Michael-addition mechanism. This probe was composed of a hemicyanin dye and resorcinol. The fluorescence intensity of NIR-BS is attenuated as a result of its reaction with HSO_3^-, because NIR-BS is fluorescent while its HSO_3^--adduct are not. The attenuated intensity of NIR-BS fluorescence (ΔI) is dependent upon the concentration of HSO_3^-. With the aid of NIR-BS fluorescence intensities recorded in the presence and absence of HSO_3^- (ΔI), the HSO_3^- content of a real sample can be calculated. There was a linear relationship between the ΔI and the concentrations of HSO_3^- ranging from 3,01 to 0,11 µM (r=0,998). The proposed probe can selectively detect HSO_3^- and shows good sensitivity with the limit of detection of 0,045 µM. On the basis of the advantages of speed, high selectivity and sensitivity for the determination of HSO_3^-, this proposed approach was successfully applied for the determination of HSO_3^- in

wine and apricot samples. The HSO_3^- content measured by the NIR-based fluorometric method was compared with that by the reference DTNB method. This assay correlated well with the reference DTNB assay.

June 2019, 61. pages.

Keywords: Bisulfite, fluorogenic prob, NIR-BS, flurometric method, wine, apricot.

1. GİRİŞ

Sülfit ve türevleri eski çağlardan günümüze kadar çok çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılmıştır. Yunanlılar, evlerini mikroplardan ardındırma amacıyla, Romalılar ve Mısırlılar şarap kaplarının dezenfeksiyonunda SO_2 gazından yararlanmıştır. Sülfitler, 1664 yılının sonlarına doğru gıdaların konulduğu kaplarda koruyucu maddeler olarak tercih edilmeye başlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, elma şaraplarının depo edildiği fıçı ve kaplar sülfitle muamele edilmiştir. Bu kronolojik süreçte, 1921 yılında sodyum bisülfit, 1930 yılında sodyum sülfit ve 1939 yılında sodyum-potasyum bisülfit gıda katkı maddesi olarak kullanılmıştır [1]. Sülfitlerin kullanımı en başta şarap ve biracılıkta başlamış, bunları alkol içermeyen meyve suları ile kurutulmuş meyve ve sebzeler takip etmiştir. Gıdalarda genel olarak kullanımı, çok miktarda fonksiyonel etki ve az miktarda toksik etki göstermesinin tespit edilmesinden sonra olmuş ve kullanım oranı hızla artmıştır. Sülfitli maddeler terimi, genel olarak SO_2 gazı ya da hidrojen sülfitin sodyum, potasyum ve kalsiyum tuzları (bisülfit), disülfit (metabisülfit) veya sülfit iyonlarını kapsamaktadır. Bunların hepsi, gıdalarla reaksiyona girdikten sonra, verilen pH ve belirli konsantrasyonlarda, iyonik kuvvet ve nonelekrolit konsantrasyonda, aynı iyonik ya da iyonik olmayan türlere dönüştükleri için kimyasal yönden birbirlerine benzer yapıdadır [2]. Sülfitler, çeşitli besin öğeleri ile reaksiyona girerler. Aldehitler, ketonlar, redüklenmiş şekerler, doymamış organik bileşikler, kararmaya neden olan karbonil ara ürünleri, proteinler ve antosiyaninler bunlardan bir kaçıdır [3]. Bu reaksiyonların süresi; pH, ısıya, sülfit konsantrasyonu ve gıda öğesinin çeşidine bağlıdır. Sülfitler, aldehit ve ketonlarla kolay reaksiyona girer ve ilk ürünleri hidroksisülfonatlardır [1,7]. 0-60°C arasındaki ısı değişimlerinde, asetaldehit hidroksisulfonatın kararlılığını etkilemezken, piruvik asit hidroksisulfonat, çok fazla çözünme gösterir. Sülfitler, glikoz gibi yükseltgen şekerlerle de reaksiyona girmekte ve şeker hidroksisülfonatları oluşturmaktadırlar. Sülfit ve glikoz arasındaki reaksiyon, pH 7'de, çok hızlı olmasına rağmen, çözünme çok fazladır ve serbest formdaki sülfitin çoğunluğu ortamdan ayrılmaktadır. Reaksiyonun hızı, pH 4-5'de düşmekte, çözünme yavaşlamakta, ortamda bileşik formlar artmaktadır. Reaksiyonun, pH 2'de çok yavaş olmasından üründe değişme olmamaktadır [1]. Sülfitler, şaraplarda bulunan antosiyaninler ve diğer fenollerle reaksiyona girer. Sonuçta oluşan sülfitantosiyanin kompleksi kararlı değildir, asidik ortamda ayrışır. Bu yüzden kırmızı şarapta titrimetrik yöntemle, serbest SO_2'ye

bakıldığında, gerçek olmayan yüksek değerler verebilir. Sülfitler, serbest linolenik asit ve mısır yağındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur ve bu tamamen bir serbest radikal mekanizmasıdır. Sülfitler, sıçan karaciğerinde lipid peroksidasyonu oluşturur. Yapılan çalışmalarda bisülfitlerin, tekli ve çoklu doymamış yağ asitlerindeki çifte bağlarla direkt olarak reaksiyona girdiği gösterilmiştir. Bu reaksiyon, E vitamini ve bütillenmiş hidroksitoluen ile inhibe edilir [1]. Gıdalara eklenen sülfitlerin miktarı, büyük oranda, gıdanın kimyasal yapısına, kullanılan işlemin tipi ve süresine, saklama şartlarına, saklamanın uzunluğuna, paketlemenin çeşidine ve katkının düzeyine bağlıdır. Sülfitler, gıdaya ilave edildikten sonra sülfata oksitlenebilir, asidik pH'ya sahip gıdalarda SO_2 buharlaşabilir. Sadece küçük bir kısmı serbest, inorganik sülfit olarak artakalır. Örneğin, tatlı bisküvi hamuruna eklenen sülfitin %63'ü un bileşimleriyle reaksiyon verir, %30'u sülfata oksitlenir ve %0,2'den daha az miktarı serbest, inorganik sülfit olarak geriye kalır. Çilek reçelinde, eklenen sülfitin %98,5'i pişirme esnasında ya SO_2 olarak buharlaşır ya da reçelin içeriğindeki maddelerle reaksiyona girer. İnorganik sülfit halinde %1,5'den daha az oranda bulunur [4]. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucunda, sülfitin günlük alım miktarı, 60 kg olan birey için, ortalama 43 mg/g olarak kabul edilmiştir [1]. Diyette sülfitlere maruz olma durumu, Gıda Katkı Maddeleri Kodeks Komitesi'nin talebi üzerine Komite tarafından değerlendirilmiştir. Komitenin on yedinci toplantısında, Komite olarak günlük sülfitlerin kabul edilebilir alım miktarı kükürt dioksit cinsinden 0-0,7 mg/kg olarak kabul edilmiştir. Sülfitler çeşitli gıda bileşenleri ile tepkimeye girer ve bazıları işleme ve depolama sırasında kaybolur. Sülfitlerin kullanım düzeyleri için ürünün raf ömrü boyunca etkili bir kalıntı düzeyinin sağlanması açısından belirli bir miktar belirlenemeyebilir ve bir gıdada kalan son konsantrasyonu yansıtmıyor olabilir [5]. Ulca'nın Türkiye'de yaptığı çalışmada tahıl ürünleri, dondurulmuş gıdalar, meyve suları ve pürelerin hiçbirinin 10 mg/kg üzerinde sülfit içermediği, bununla birlikte, incelenen tüm kuru kayısı örneklerinin Türk Gıda Kodeksindeki 2000 mg/kg olan üst sınırı yaklaşık %40 aşan düzeyde sülfit içerdiği gösterilmiştir [6]. Birçok işlevi olması nedeniyle, sülfitlerin çeşitli katı ve sıvı gıdalarda kullanımına izin verilmiştir. Komitenin izin verdiği miktarlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1.1: Kodeks GSFA, Avrupa Birliği mevzuatı ve ulusal mevzuata göre sülfitlerin maksimum seviyeleri.

Ülke	**Sülfitlerin Miktar Aralığı (mg/kg veya mg/L)**		**Spesifik Gıda Kategorilerinde Sülfitlerin En Yüksek Düzeyleri (mg/kg veya mg/L)**
Codex GSFA	Kuru	15-500	1000 kuru meyvede
	Sıvı	50-200	350 üzüm şarabı
Avrupa Birliği	Kuru	20-800	2000 kuru meyvede
	Sıvı	20-200	350 limon suyunda
Avustralya ve Yeni Zelanda	Kuru	10-1000	20000 konserve ve sebzede; 3000 kuru meyve sebzede, diğer meyve ve sebzelerden imal edilen ürünlerde
	Sıvı	25-400	
Brezilya	Kuru	20-200	1500 kuru üzümde
	Sıvı	40-350	3000 konsantre yüksek pulplu kaju elma suyu
Kore Cumhuriyeti	Kuru	20-900	2000 kuru meyvelerde; 5000 kurutulmuş rendelenmiş kabakta
	Sıvı	150-350	
Türkiye	Kuru	10-100	1000 kuru meyvede
	Sıvı	20-600	2500 konsantre meyve suyu

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HSO_3^- NEDİR ? GIDALARDA BİSÜLFİT KULLANIMI

Sodyum bisülfit ($NaHSO_3$), beyaz, kristal ve toz haldedir, kükürt dioksitin kokusunu taşır. Bir gramı 3.5 ml soğuk suda, 2 ml sıcak suda ve 70 ml alkolde çözünür [1]. Bisülfit, çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller oynar. Bu nedenle, bisülfitin doğru tespiti çok önemlidir. Antimikrobiyal, bakteriyostatis ve antioksidan özelliği nedeniyle yaygın olarak gıda koruyucu olarak kullanılan bisulfit HSO_3^-'ün, belirli konsantrasyon seviyesinin solunum yolu hastalıklarına sebep olduğunu gösterilmiştir [7]. Fizyolojik sistemlerde ana SO_2 formu olan bisülfit, gıda koruyucu, antioksidan ve antibakteriyel olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, hidrojen sülfitleri, memelilerde sistein veya glutatyon gibi sülfür içeren amino asitlerden endojen olarak da üretilebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, düşük konsantrasyonlardaki (450 mM'den az) bisülfitin, vazodilatif, antihipertansif ve anti-aterojenik etkilere sahip olduğunu ve kardiyovasküler sistemde yeni bir haberci olarak kabul edildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, çok sayıda epidemiyolojik çalışma, anormal sülfit seviyelerinin akciğer kanseri, kardiyovasküler hastalıklar ile bağlantılı olduğunu ve felç, migren baş ağrıları ve beyin kanseri gibi birçok nörolojik rahatsızlığın, bazı düşük seviyelerde bile bisülfitin bazı insanlara zararlı olduğunu göstermektedir. Bazı kişilerde alerjik reaksiyonlar, örneğin zorluk nefes alma, hışıltma, kurdeşen ve mide-bağırsak rahatsızlığına sebep olduğunuda kanıtlanmıştır [8].

Bu nedenle, biyolojik ortamlarda HSO_3^-'in görüntülenmesi ve dedeksiyonu için daha farklı analitik yöntemler geliştirilmelidir. Bugüne kadar elektrokimya da dahil olmak üzere HSO_3^-'ü nicel olarak saptamak için kromatografi, absorpsiyon ve floresans spektroskopisi gibi birçok analitik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında, floresan problar, yüksek seçiciliği, düşük tayin sınırı ve gerçek zamanlı izlemeye uygun olmaları nedeniyle yaygın olarak uygulanır [7].

Floresans spektroskopisi, basitliği, hassasiyeti, hızlı tepki süreleri ve ayrıca *in vivo* görüntüleme için uygun olmasından dolayı eser miktarda örneğin tayin edilebilmesi açısından güçlü bir teknik haline gelmiştir. Anyonlar için floresan probların keşfi son yıllarda oldukça fazla dikkat çekmiştir, çünkü birçok biyolojik işlem anyonik türlerin moleküler tanınmasını içerir [9].

2.2. BİSÜLFİT MİKTARININ TAYİN EDİLMESİ VE GÖRÜNTÜLENMESİ

Sülfitleme ajanları, enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşmenin kontrolü, antimikrobiyal etki, antioksidan ve indirgeyici madde kullanımlarının kontrolü, ağartıcı madde kullanımı ve çeşitli işlem yardımcısı kullanımlarının kontrolü de dahil olmak üzere birçok önemli teknik amaç için gıdalara eklenir. Birçok üründe, sülfitler birden fazla amaca hizmet eder. Sülfit ajanlarına alternatiflerin tanımlanması kolay değildir. Olası alternatifler genellikle daha az faydalar sağlar ve daha az etkilidirler.

Sülfit ajanları günümüzde birçok gıda ürününde kullanılmaktadır. Sülfit ve serbest kalan sülfitlerin gıdalara katılması seviyelerine ilişkin veriler hala bazı gıda ürünleri için mevcut değildir ve sanayide belirli ürünler için işleme tabi tutulma seviyelerinde geniş değişiklikler olduğu bilinmektedir. Gıdalardaki sülfit kalıntılarının analizi, sülfür ajanları ve çeşitli gıda bileşenleri arasındaki hızlı reaksiyon sonucunda oluşan sülfitlerle karıştırılmamalıdır. Sülfitler, indirgen şekerler, karboniller ve proteinlerle kolayca reaksiyona girer. "Serbest" SO_2 (SO_2 ve çeşitli inorganik sülfit tuzları) ve "toplam" SO_2 (serbest SO_2, ayrıca birleşik sülfit formlarının bazıları) için analitik yöntemler mevcuttur.

Gıdalarda serbest kalan sülfit seviyeleri belirli bir gıda ürünündeki gerçek serbest ve toplam SO_2 miktarları, gıda ile muamele sırasında sülfitlerin emilimi, sülfit ilavesinden sonraki işlemin niteliği ve saklama koşulları ile belirlenir. Tüketim noktasında gıdalarda kalan gerçek serbest ve toplam SO_2 seviyeleri daha az dikkat çekmiştir. Belirli yiyeceklere eklenen sülfitlerin sonucu, büyük ölçüde keşfedilmemiş bir çalışma alanıdır. Sülfitlerin gıda bileşenleri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girmesi, tüketim noktasında üründe az miktarda SO_2 kalıntısı bırakması beklenir [10] .

Son zamanlarda, gıdalarda katkı maddesi olarak sülfit kullanımına devam edilmesinin bazı hassas bireylerde astımlı reaksiyonların başlatılmasında sebep olduğu sorgulanmıştır. 1977'den bu yana tıbbi literatürde çok sayıda sülfit kaynaklı astım vakası bildirilmiştir [11,12]. Gıda ve İlaç İdaresi'ne ek anekdot raporları yapılmıştır. Sülfit kaynaklı bu vakalar astım kapsüllerle veya inorganik sülfit içeren çözeltilerle pozitif zorluklarla doğrulanmıştır. Sadece küçük bir astımlı popülasyon alt grubu, kapsüllerdeki sülfitlere karşı duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür.

Sülfitli gıdaların bu hassas bireylerde astımlı reaksiyonları başlatma olasılığı ile ilgili önemli sorular devam etmektedir. Açıklanan hastaların bir kısmı sülfatlanmış gıdalara astımlı reaksiyonlar bildirse de vakaların çoğunda, sülfatlanmış gıdalara verilen reaksiyon şüphelerinden oluşmasına rağmen, hassas ölçümlerde birkaç ölçüm zorluğu oluşturmuştur [13]. Bisülfitin, özellikle çok düşük konsantrasyonlarda bile direk tespit edilmesi, miktarının belirlenmesi ve görüntülenmesi, organizmadaki fizyolojik ve patolojik etkilerinin detaylıca araştırılmasında oldukça önemlidir [2]. Fakat HSO_3^-'ün çok reaktif ve kısa ömürlü bir radikal olması, düşük konsantrasyon değerlerinde ve az miktarda sentezlenmesi bu işlemi oldukça zorlaştırmaktadır. Bu gibi dezavantaj veya zorluklardan yola çıkarak, bisülfitin tayini için uygulanacak olan yöntemlerde yüksek duyarlılık ve hassasiyet ön plana çıkmaktadır. Daha da önemlisi yöntemin, diğer yöntemlere göre daha üstün olması gerektiğidir [7]. Bu nedenle, hassas, seçici, kesin ve düşük maliyetli analitik yöntemlerin geliştirilmesi hayati öneme sahiptir. Şaraplar, içecekler ve yiyeceklerde sülfitleri belirlemek için titrasyon, spektrofotometri, elektroforez ve elektrokimyasal algılama gibi çeşitli analitik yöntemler kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin çoğu fazla zaman alır ve çeşitli örnek ön işlemleri, çoklu reaktifler ve karmaşık araçlar gerektirir. Buna karşılık, floresan prob son derece hassastır, kullanımı basit ve hızlıdır, ucuzdur, geleneksel yöntemlerden daha avantajlıdır [10].

2.2.1. Gıdalarda Bisülfit Kullanımı Ve Maruz Kalma

Kükürt dioksit ve kullanım koşulları altında kükürt dioksiti serbest bırakan çeşitli inorganik sülfit formları, toplu olarak kükürt ajanı olarak bilinen gıda katkı maddeleridir. Kükürt dioksit (SO_2), potasyum bisülfit ($KHSO_3$), potasyum metabisülfit , sodyum bisülfit ($NaHSO_3$), sodyum metabisülfit ve sodyum sülfit (Na_2SO_3) etler veya bir tiamin kaynağı olarak kabul edilen diğer gıdalarda kullanılmaması koşuluyla, GRAS olarak Federal Düzenlemeler Kodunda (CFR) listelenmiştir.

Bununla birlikte, bu sülfit ajanlarının GRAS durumu şu anda yeniden incelenmekte ve değişiklikler yapılabilir. Ek olarak, CFR'nin diğer bölümleri, özellikle gıdayla ilgili çeşitli işlemlerde sülfür ajanlarının kullanılmasına izin verir. Tüm GRAS sülfür ajanlarının şu anda bu amaçlarla kullanılmasına izin verildiğine dikkat edin. GRAS maddesi olmayan potasyum sülfit (K_2SO_3) ve sülfürik asidin (H_2SO_3), sadece karamel işlemesinde kullanımına izin verilir. Alkol, Tütün ve Ateşli Silahlar Bürosu (BATF), şarap ve biradaki sülfit kullanımının bir

dereceye kadar sınırlandırılmasını önermiş olmasına rağmen, şarap ve birada kullanım için sülfit ajanlarına da izin verilmektedir.

Halen, çoğu gıdada sülfür ajanlarının kullanım seviyeleri düzenleme ile sınırlı değildir. İstisnalar, glukoz şurubu, dekstroz monohidrat ve izin verilen maksimum SO_2 kalıntı seviyelerinin belirlendiği şarap ve SO_2 işlem seviyesinin maksimum% 0.05 olarak kontrol edildiği gıda nişastası ağartmasıdır [14].

2.2.2. Serbest Sülfit Miktarına Karşı Toplam Sülfit Miktarı Ölçümü

Sülfitler, gıdalarda sülfürik asit, inorganik sülfitler ve çeşitli biçimlerde sülfit formlarında bulunurlar. Bir dizi faktöre bağlı olan karmaşık denge, bu durumların her birinde sülfit miktarını kontrol eder. Serbest SO_2 ölçüm yöntemleri, ayrışmamış sülfürik asit, bisülfit iyonları ve sülfit iyonlarının tespitine yöneliktir olarak yapılır. Toplam SO_2 miktarının ölçümü için seçilen yöntemler ise bu maddelerin ve ayrıca bazı sülfit formlarının tespit edilmesine yöneliktir. Genel olarak, toplam SO_2 analiz yöntemleri iki grupta incelenebilir. Bunlardan birincisi birleşik SO_2'nın asitten damıtılmasıyla serbest hale getirilmesi ikincisi ise birleşik SO_2'nın fazla alkali içeren bir ekstraktın işlenmesiyle serbest bırakılması olarak tanımlanabilir.. SO_2, bu işlemlerin hiçbiri ile bütün kombine sülfit formlarından tam olarak serbest bırakılmayacaktır çünkü bazı kombine sülfitler oldukça kararlıdır. Kombine sülfit seviyeleri, belirli bir belirleme olarak analiz yöntemlerine dahil edilmez. Genellikle toplam SO_2 ve serbest SO_2 arasındaki farklardan hesaplanırlar ve bu nedenle sadece birleşik sülfitlerin ayrışabilir formlarını ölçülebilir [15].

Serbest SO_2 ölçüm metotları, Ripper (1892) tarafından geliştirilen orijinal iodometrik titrasyon metodu üzerindeki değişiklikler ile yapılmıştır. Sülfata oksidasyon ve diğer iyot azaltıcı maddelerin varlığı kontrol edilebilir. Bununla birlikte, yöntem ayrıca şarapta SO_2 analizi için önemli hatalar içermiştir [16-18].

Toplam SO_2 kalıntılarının analizi için en yaygın kullanılan yöntem, asidik bir damıtma prosedürü olan Monier-Williams yöntemidir [19]. Monier-Williams yönteminin uzun yıllardır SO_2 için gıdalarda analiz için en güvenilir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, yöntem oldukça zaman alıcı ve zahmetlidir. Bu, uygun alternatiflerin aranmasına ihtiyaç oluşturmuştur.

2.2.3. Sülfit Analizinin Kritik Bir Değerlendirmesi

Yıllar öncesinden beri tam olarak nedeni bilinmediğinden gıdalarda direk SO_2 analizi yapılabiliyordu. Buna sebep muhtemelen testin koşulları altında sadece SO_2 salınımı olması ile ilgilidir. Bununla birlikte, SO_2 aslında gıdalarda tek bu formda bulunmaz. Serbest SO_2 yöntemleri, aslında serbest inorganik sülfit tuzlarının kalıntılarınıda tespit eder. O bunlara, serbest SO_2 yerine serbest sülfit (veya SO_3 gibi serbest sülfit) deneyleri olarak atıfta bulunulması tercih edilir. Toplam SO_2 yöntemleri, bazı sülfit formlarının yanı sıra serbest sülfit kalıntılarını da tespit etmektedir , birleşik sülfit formlarının çoğunu tespit edebilmektedir. Bu metotlar, toplam SO_2 yerine toplam sülfit analizleri olarak adlandırılmalıdır, ancak toplam toplamın kullanımı yanıltıcı olabilir, çünkü bütün kombine sülfit formları bu analizlerle tespit edilememektedir [20].

Literatürde SO_2 kalıntısı ile ilgili, gıdalarda bulunan önemli miktarları ile ilgili veriler bulunmaktadır. Gıdalardaki kalıntı sülfit seviyelerinin ölçümü için birçok yöntemde vardır fakat çoğu gıda için çeşitli yöntemler arasında korelasyon kurulmamıştır. Bu yüzden ölçümler ile ilgili hep şüpheler olmuştur. Bu nedenle, yayınlanan kalıntı verilerinin bazılarının geçerliliğini değerlendirmek zordur. Kullanılan yöntemlerden bazıları bu kalıntı verilerinin üretildiğinden daha sonra hatalı sonuçların verildiği gösterilmiştir. İkincisi, piyasadan elde edilen sülfitlenmiş gıdalar için çok az kalıntı verisi vardır. Elde edilen verilerin çoğu, işlemden hemen sonra örneklenen ürünlerden elde edildiği için bu nedenle, depolamanın etkileri ve standart, günümüz ticari uygulamalarıyla ilgili herhangi bir fark olmamıştır.

Ancak, en önemli konu gerçekte neyin ölçülmesi gerektiği sorusunu cevaplamaktır. Önceki verilerden bazıları serbest SO_2 içindir, bazıları ise toplam SO_2 içindir serbest inorganik sülfitlerin toksik ve astımlı reaksiyonlarda organik sülfit eklentilerinden daha fazla görülme ihtimalinin yüksek olduğunu tahmin ediyoruz. Tüketici maruz kalma değerlendirmeleri için ideal olarak, toksik veya aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olan sülfit formlarına, büyük olasılıkla serbest inorganik sülfit kalıntılarına veya serbest sülfit kalıntılarına ek olarak, SO_2'nun salınması beklenen kombine sülfit formlarına maruz kalmayı ölçmek isteyebilirsiniz. Sindirim veya metabolik işlemler sırasında in vivo olarak maruz kalma değerlendirmelerinin çoğu toplam SO_2 kalıntısı kullanmıştır. Bununla birlikte, Monier-Williams damıtma prosedürünün koşulları, in vivo olarak karşılaşılabilecek herhangi bir koşuldan çok daha şiddetlidir. Bu nedenle, Monier-Williams prosedürü, in vivo olarak SO_2 salınması beklenmeyen bazı kombine

sülfit formlarını tespit edebilir. Çeşitli kombine sülfit formlarının Monier-Williams'larına veya toplam sülfit analizi için diğer prosedürlere kıyasla in vivo kararlılitesi hakkında daha fazla bilgi gereklidir. Monier-Williams prosedürü, doğru sonuçlar için aşırı miktarda SO tespit edebilirken maruz kalma değerlendirmeleri, serbest sülfit analizleri uygun olmayabilir, çünkü in vivo olarak SO_2 salgılayan kombine sülfit formlarını tespit etmemektedirler.

Karışıklık, serbest ve toplam sülfitin belirlenmesi için prosedürlerin sayısız çeşitliliği ve modifikasyonları ile büyütülür. Birçok durumda alternatif ve / veya değiştirilmiş prosedürler aynı numune için farklı sonuçlar verir. Standardize Edilmiş Resmi Analitik Kimyacılar Birliği (AOAC) prosedürleri hem ücretsiz hem de toplam SO_2 analizleri için mevcuttur , ancak birçok analist bu yöntemlerin modifikasyonlarını kullanır. Bu nedenle, bir analistin verilerini diğerinin verisiyle karşılaştırmak zordur. Bu belirsizlik, maruz kalma değerlendirmeleri yapanların durumunu daha da karıştırmaktadır [21].

2.2.4. Floresans Spektroskopisi

Organizmada fizyolojik olaylarda ve birçok biyolojik olayın gerçekleşmesinde önemli roller üstlenen HSO_3^- tam olarak hangi bölgelerde oluştuğu, biyolojik aktiviteleri nasıl gerçekleştirdiği, etki mekanizması, ne kadar miktarda üretilip ne kadar miktarda kullanıldığı gibi sorular, kullanılan tayin ve görüntüleme yöntemlerinin bir takım dezavantajlarından dolayı genellikle tam olarak cevap bulamamıştır. Bu belirsizliklere çözüm olarak belirli dalgaboylarında floresans ışıma gerçekleştiren probların kullanıldığı yöntemler günümüz bilimsel çalışmalarında yoğun ilgi görmektedir [22].

Diğer metotlar ile karşılaştırıldığında bu yöntemin HSO_3^- tayininde birçok avantaj sağladığı belirtilmektedir. Floresan problar mükemmel bir algılama olarak kabul edilmiştir.

Kolay hazırlanma, yüksek seçicilik ve hassasiyet nedeniyle teknik gerçek zamanlı görüntüleme için potansiyel olarak. Son on yılda, SO_2 türevlerinin tespiti için bir dizi floresan prob geliştirilen nükleofilik ilavesi, Michael ilavesi ve levulinatın korumasının kaldırılmasını içeren algılama mekanizmaları geliştirildi. Bu alanda büyük çaba sarf edilmesine rağmen, sadece birkaç sonda mitokondriyari hedeflenmiştir ve bildirilen probların çoğunun pratik uygulamalarda yanıt oranını iyileştirmesi gerekmektedir [23].

2.3.GIDALARDAKİ SÜLFİT VE KİMYASI

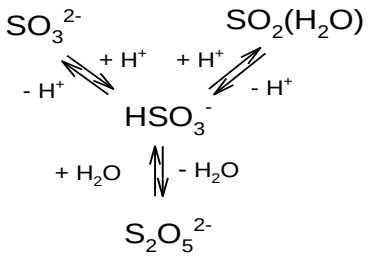
Birçok çiğ gıda, havaya maruz kaldığında, hızlı bir şekilde renk atmakta veya doğal görünüşlerini yitirmektedir. Bu oksidatif süreçleri yavaşlatmak için, perakende işletmecisi geçmişteki gıdalardaki işletmecilere sülfit ajanları denilen kimyasallar uygulanmıştır. Kamuya satılacak veya çiğ olarak sunulacak yiyeceklere sülfit ekleme uygulaması, son zamanlarda kullanımda olan sülfitlerin güvenli (GRAS) statüsünün iptal edilmesiyle yasaklanmıştır [24]. Ayrıca, 10 ppm'den daha fazla bir sülfit maddesi içeren herhangi bir yiyecek, bir etiket beyanına sahip olmalıdır [25]. Sülfit ajanlarının neden olabileceği tehlikeye dair endişe, Kionka'nın (1896), gıdalardaki sülfitlerin olası toksisitesi konusundaki bir makalesine de önemli bir zaman alır. Son zamanlarda gıdalarda sülfit kullanımı, hem tüketici hem de düzenleyici kurumlar için endişe kaynağı haline gelmiştir [26]. 'Sülfitler' veya 'sülfit ajanları' genellikle çeşitli sülfür bazlı bileşiklere uygulanan terimlerdir. Gıda endüstrisi tarafından en sık kullanılan altı sülfitleme maddesi kükürt dioksit, sodyum ve potasyum metabisülfit, sodyum ve potasyum bisülfit ve sodyum sülfittir. Bu sülfitleme ajanlarının kimyasal formülleri Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Sülfitleme ajanları ve formülleri.

Ajan	Formül
Kükürt dioksit	SO_2
Sodyum sülfit	Na_2SO_3
Sodyum bisülfit	$NaHSO_3$
Potasyum bisülfit	$KHSO_3$
Sodyum metabisülfit	$Na_2S_2O_5$
Potasyum metabisülfit	$K_2S_2O_5$

Bir gıda matriksine eklendiğinde, sülfit yapan ajanların bir kısmı yiyeceğin moleküllerine bağlanır ve bir kısmı ise bağlanmaz. Sülfit ajanının yiyecekle birleşmeyen kısmına 'serbest sülfit' denir. Bu 'serbest sülfit', dinamik kimyasal dengede bir SO_2, HSO_3^- ve SO_3^{2-} karışımıdır. Matriksteki üç kimyasal türün her birinin yüzdesi yemeğin pH'ına (asitliği) bağlıdır [27].

Tersinir ve tersinir olamayan bağlı şekilde bağlı SO_3^{2-} olmak üzere iki bağlı SO_3^{2-} formu gözlemlenmiştir. Şekil 2.1'de ilgili dönüşüm denklemleri verilmiştir.



Şekil 2.1: Sülfitlerin dönüşüm denklemleri.

2.3.1. pH'ın Sülfit Üzerindeki Etkisi

SO_2, su ile tepkimesinde H_2SO_3 asidi oluşturur. Alkali ile muamelede H_2SO_3, SO_3^{2-}, HSO_3^- ve metabisülfitleri verir. Bu inorganik sülfit formları, sulu çözeltilerde birbirleriyle dengededir ve her bir türün konsantrasyonu pH'a bağlıdır. Yüksek pH'larda SO_3^{2-} baskın türdür, çok düşük pH'larda ise H_2SO_3 daha baskındır. Ara pH'larda, HSO_3^- baskındır ve pH 4.0'da maksimum konsantrasyona ulaşır. SO_2, H_2SO_3'dan geliştirilebilir, ancak yalnızca asidik pH'larda oluşturulur. pH'nın 4.0 altında olan hiçbir çözeltiden çözelti elde edilemez [28].

SO_3^{2-}, aldehitler, ketonlar, indirgeyici şekerler, doymamış organik bileşikler, esmerleştirici ara ürünler, proteinler ve antosiyaninleri içeren çeşitli gıda bileşenleri ile kolayca reaksiyona girer. Reaksiyonun derecesi pH, sıcaklık, SO_3^{2-} konsantrasyonu ve gıda matriksinin reaktif bileşenlerine bağlıdır. Bazı reaksiyonlar hemen hemen geri alınamazken, diğerleri daha kolay geri dönüşümlü olsa da, sülfitlerin birleşik ve serbest formları arasında her zaman bir denge vardır. Tepkimeler, gıdadaki serbest SO_3^{2-}'leri uzaklaştırır ve bu da gıda ürünlerindeki etkinliğini azaltır. Ayrışabilen, birleşik SO_3^{2-} formları, serbest SO_3^{2-} için bir rezervuar görevi görebilir, ancak geri dönüşü olmayan reaksiyonlar sülfitin serbest SO_2 havuzundan kalıcı olarak çıkarılmasını sağlar.

Daha önce belirttiğimiz gibi, SO_3^{2-}'lerin istenilen aksiyonlarının çoğu serbest formlara bağlıdır; Kombine SO_3^{2-}'ler genellikle etkisizdir [20].

2.3.2. Sülfitlerin Karbonillerle Reaksiyonları

SO_3^{2-}'lerin, aldehitler ve ketonlarla reaksiyonlar için özel bir afiniteye sahip oldukları bilinmektedir. Bu reaksiyonların birincil ürünleri hidroksisülfonatlardır. Karbonillerle SO_3^{2-}'ler arasındaki reaksiyonlar hızlıdır ve denge sabitleri baskın bir şekilde hidroksisülfonatları pH 1-8 aralığında tercih eder [29,30].

Daha yüksek pH'larda, daha fazla ayrışma meydana gelir [29]. 0-60°C aralığındaki sıcaklık değişimlerinin, asetaldehid hidroksisülfonatın kararlıitesi üzerinde çok az etkisi vardır, ancak piruvik asit hidroksisülfonat, daha yüksek sıcaklıklarda kademeli olarak daha fazla ayrışma gösterir [30].

Karbonil bileşiklerinin hidroksisülfonatları oldukça kararlı reaksiyon ürünleridir. En kararlı karbonil hidroksisülfonatlar, esmerleşme reaksiyonunun, beta-doymamış karbonil ara maddeleridir. Bununla birlikte, asetaldehit hidroksisülfonat, son derece kararlı bir reaksiyon ürünü olarak düşünülmelidir. Diğer karbonil hidroksisülfonatların bazıları, piruvik asit ürünü gibi daha az kararlı olmasına rağmen, bu reaksiyon sınıfının tamamı kararlıdır. Midede büyük ölçüde ayrışmaları beklenmezken ince bağırsakta ayrışması özellikle hızlı deiğildir [31].

2.3.3. Sülfitlerin Şekeri Azaltan Tepkimeleri

SO_3^{2-}'ler ayrıca glukoz gibi indirgen şekerler ile reaksiyona girebilir. Şeker hidroksisülfonatlar, karbonil hidroksisülfonatlar kadar kolayca oluşturulmaz; genellikle önemli miktarda molar indirgeyici şeker gereklidir [31]. Glikoz hidroksisülfonatlar aynı zamanda karbonil benzerlerinden çok daha az kararlıdır. nötr pH'da, SO_3^{2-}'lerle glukoz arasındaki reaksiyon çok hızlı olur, fakat ayrışma baskın olacağından SO_3^{2-}'in kütlesini serbest halde bırakacaktır. pH 4 ila 5'de, reaksiyon hızı hala oldukça yüksek olacağından ayrışma çok daha yavaş olacaktır, böylece reaksiyon birleştirilmiş form lehine olacaktır. pH 2'de reaksiyon hızı yavaştır, ancak bir kez oluştuğunda ürün kararlı olacaktır. Şeker hidroksisülfonatlar, karbonil hidroksisülfonatlar kadar kararlı olmasa da, midede hala kararlı kalır, ancak ince bağırsakta ayrışmanın tahmin edilmesi gerekir [32].

2.3.4. Sülfitlerin Proteinler ve Amino Asitler ile Tepkimeleri

Sistin, peptidler ve proteinlerin disülfit bağları, bir tiyol ve bir S-sülfonat oluşumuyla sonuçlanan sülfit ile ayrılabilir. Reaksiyon esasen fizyolojik pH'da serbest sistin ile tamamlanmasına kadar gider, fakat birçok proteinin disülfür bağları, muhtemelen sterik engel veya elverişsiz bir elektronik ortam nedeniyle tepkimeye girmez. Denatüre proteinler bu sülfitoliz reaksiyonuna daha duyarlıdır [33].

SO_3^{2-}'ler ayrıca protein ve peptidlerin sisteinil kalıntıları ile reaksiyona girer. Sistein ile reaksiyon ürünü, beta-karboksietiltiyosülfonattır. Amin bisülfitlerin oluşumu, sülfitlerin üçüncül aminler ile reaksiyonundan ve esmerleşme reaksiyonundan kaynaklanan Schiff bazlarından da rapor edilmiştir. Aminlerle ve tiyollerle bu reaksiyonlar, glutenin önemli bir bileşen olduğu un hamurları gibi gıda sistemlerinde baskındır [34].

Metiyonin, serbest radikal bir mekanizma vasıtasıyla SO_3^{2-}'lerle metiyonin sülfoksit'e oksitlenebilir. Triptofan, SO_3^{2-} kaynaklı serbest radikal reaksiyonla tahrip olabilir. SO_3^{2-}'in proteinler ve amino asitlerle yapışma kararlılığı bilinmemektedir [35].

2.3.5. Sülfitlerin Vitaminlerle Reaksiyonları

SO_3^{2-}'ler, tiamin, askorbik asit, B vitamini ve K vitamini gibi bir dizi vitaminle reaksiyona girebilirler. Tiaminin sülfitolizi, uzun yıllardır bilinmektedir ve bu vitaminin besleyici değerini tahrip ettiği için zararlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle, Birleşik Devletler'deki başlıca tiamin kaynakları olarak kabul edilen et gibi yiyeceklere yasal olarak sülfitler eklenemez. Bu tür ilaveler başka ülkelerde de kabul edilmektedir. Tiaminin sülfitolizi geri dönüşümsüzdür [36]. Sülfit eklentileri *in vivo* olarak son derece kararlıdır [37]. Kobalaminler, SO_3^{2-}'lerle kolayca reaksiyona girer. Çalışmaların çoğu, doğal olarak B12 vitamini (siyanokobalamin) formu olan hidroksikobalamini içerir. Hidroksikobalamin ve SO_3^{2-} arasında kolayca bir kompleks oluşur. Kobalaminler, sülfitin sülfata oksidasyonunu katalize edebilir [38]. Sülfit, suda çözünen sentetik bir K vitamini formu olan 2,3 çift menadion bağına (K3 vitamini) tersine ekler. Sülfonat ara ürünü, vücutta muhtemelen ayrışır, Doğal olarak elde edilen yağda çözünen K vitamini formlarının sülfit ile reaksiyon oranı bilinmemektedir [39].

Sülfit ayrıca piridin ve flavin nükleotitleri ile tersinir ürünler oluşturur. SO_3^{2-}, 3,4 çifte nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) bağına katılır. Sülfit-NAD eklentisi özellikle kararlı değildir, ancak NAD bir enzimle ilişkiliyse kararlıitesi artar. Flavin nükleotitleri, flavin adenin

dinükleotidi (FAD) ve flavin mononükleotidi (FMN) ile ilave reaksiyon, izoaloksazin halkasının N-5 atomunda meydana gelir. Flavin nükleotit-sülfit eklentileri, NAD-sülfit eklentisine göre daha az kararlıdır, ancak yine de, proteine bağlandıklarında kararlıite arttırılır. Sülfitin enzime bağlı NAD, FAD ve FMN ile reaksiyonları, enzimin inhibe edilmesine yol açar [40,41].

Sülfitler ayrıca A vitaminin öncüsü olan beta-karoten'i de yok edebilir. Mekanizma görünüşte serbest radikalleri içerir. Sülfit kaynaklı lipit peroksidasyonu bu reaksiyonu başlatabilir [42].

2.3.6.Sülfitlerin Nükleik Asitler ve Nükleotidlerle Reaksiyonları

Sülfit ve nükleik asitler veya nükleotitler arasında çeşitli reaksiyonlar tarif edilmiştir. Bu reaksiyonların bazılarının, bazı sistemlerde gözlenen sülfitlerin mutajenitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Sülfitler 5,6 çift urasil ve sitozin bağlarına ve bunların türevlerine tersine ekleyebilirler. Urasil ile reaksiyon pH 7'de en hızlıdır, pH 7'nin altındaki ve altındaki pH'larda kolayca geri dönüşümlüdür ve nispeten yüksek sülfit konsantrasyonlarına bağlıdır [43].

Üridin, sülfonat ilave maddesinden, serbest sülfitin reaksiyon karışımından uzaklaştırılmasıyla rejenere edilebilir. Sitidin ilaveleri asit pH'sında en kararlıdır ve bunların oluşumları da yüksek konsantrasyonlardaki sülfitlere bağlıdır. Sitidin ilaveleri fizyolojik pH'da kararsızdır. RNA ve tek iplikli DNA bu mekanizma ile deamine edilebilir. 5,6-dihidroksitosin-6-sülfonat, urasil ilavesini vermek üzere bazı koşullar altında deamine edilebilir. Deaminasyon sülfit ile katalize edilir ve pH 5'te optimal olarak gerçekleşir. Düşük sülfit konsantrasyonlarında ve fizyolojik pH'ta, bu dönüşümün oranı son derece yavaştır. Bununla birlikte, bu dönüşümün, sülfitlerin gözlenen mutajenik etkilerinden bazılarının sorumlu olduğu düşünülmektedir [44].

Sülfitlerin nükleik asitlerle reaksiyonları, bu biyomoleküllerin in vitro sistemlerdeki aktivitelerini değiştirebilir [45]. Sülfit kaynaklı serbest radikal reaksiyonlar, DNA'nın Bacillus subtilis'ten dönüşüm aktivitesini inhibe edebilir, bakteriyofaj A'yı etkisiz hale getirebilir, olgunlaşma ve kaplama proteinlerini RNA bakteriyofaj MS2'deki nükleik asitlerle çapraz bağlayabilir [46].

2.3.7. Sülfitlerin Pigmentlerle Reaksiyonları

Antosiyaninler ve şaraplardaki diğer fenoller de sülfitlerle reaksiyona girebilir. Sülfit içeren antosiyanin kompleksleri, asidik koşullar altında bile ayrıştığından oldukça kararsızdır. Bu nedenle, serbest SO_2 için titrimetrik yöntemlerin, kırmızı şaraplara uygulandığında hatalı şekilde yüksek sonuçlar vermesi beklenir. Antosiyanin-sülfit komplekslerinin, mide asidine maruz kaldığında kolayca ayrışması beklenir [47].

2.3.8. Sülfitlerin Yağ Asitleriyle Reaksiyonları

0.5-10 mM konsantrasyon aralığında bulunan sülfitler, muhtemelen serbest radikal bir mekanizma vasıtasıyla mısır yağı ve serbest linolenik asitte doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu indükleyebilir. Sülfitler, ayrıca sıçan karaciğer homojenatında lipid peroksidasyonunu arttırmıştır. Bisülfitin doğrudan mono ve çoklu doymamış yağ asitlerinin ikili bağları ile reaksiyona girebileceğini göstermiştir. Bu reaksiyon E vitamini ve butile hidroksitolüen (BHT) tarafından inhibe edilebilir [48].

2.3.9. Belirli Gıdalarda Sülfitlerin Miktarları

Kombine formda bulunan ilave sülfit oranı gıdadan gıdaya değişebilir. Çoğu gıdada, birleşik sülfit formlarının baskın olması beklenir. Bir istisna, neredeyse tüm sülfitin serbest formda mevcut olduğu sülfit marul olacaktır. Havalandırma-oksidasyon yöntemiyle belirlenen bazı gıdalardaki serbest, kombine ve toplam SO_2 kalıntı değerlerinin karşılaştırılması ilginçtir. Serbest SO_2 olarak mevcut toplam SO_2 yüzdesi, beyaz şarap için% 2.3, konsantre portakal suyu için% 22.3, melas için% 14.8, mısır nişastası için% 34.4 ve dondurulmuş soyulmuş karides için% 32.3'tür. Sülfitin geri kalanı kombine formdadır [49].

Gıdalardaki sülfitlerin sonuçları bu nedenle oldukça karmaşık bir durumdur. Organik bileşenlerle kombinasyon, çeşitli inorganik formlar arasındaki denge, SO_2'nun uçucu hale getirilmesi ve sülfata oksidasyonun tümü önemli reaksiyonlar olabilir. Bu reaksiyonların nispi önemi, ilgili özel gıdalara bağlıdır. Her ne kadar birçok çalışma kalıntı SO_2 kalıntısı bildirmiş olsa da, gıdalardaki seviyeler, radyo-etiketli sülfitlerle yapılan birkaç çalışma, gıdalardaki sülfitlerin sonuçlarıinin tek sistematik araştırması olarak göze çarpmaktadır.

Thewlis ve Wade sert tatlı bisküvi hamurlarında radyoaktif etiketli sülfitleri incelemişlerdir. Sonuçlar, hamura ilave edilen sülfit sülfürün% 93'ünün bisküvi içerisinde kaldığını göstermiştir. Sülfitin yaklaşık% 30'u sülfata dönüştürülmüştür ve bir başka % 73'ü muhtemelen

S-sülfoproteinler gibi birleşik sülfitler olarak ortaya çıkmıştır. Pişmiş bisküvilerdeki inorganik sülfit (serbest SO_2) olarak, % 0.2'den daha az kalmıştır [50].

2.3.10. Gıdalardaki Sülfit Sonucunun Belirlenmesinde Kritik Faktörler

Gıdaların HSO_3^- içeriklerinin belirlenmesinde ilk kritik adım, HSO_3^-'in dip çözeltilerinden veya SO_2'dan atmosferden ürüne emilmesidir. Kurutulmuş meyvelerle, absorbe edilmiş SO_2 konsantrasyonu, daldırma çözeltisindeki sülfit konsantrasyonunun, daldırma süresinin ve pH'ın bir fonksiyonudur SO_2, absorpsiyon, pH 2.5'te pH 4.5'ten daha yüksektir. Sofralık üzümlerde sülfatlama SO_2'den salınması ile gerçekleştirilir , taşıma ve depolama sırasında paket içi jeneratörleri Kabın atmosferinde salınan SO_2, 3 hafta içinde kaybolur.

Üzümlerde tabii ki SO_2 miktarı ile orantılıdır, maruziyet ve sıcaklık işlemine ve paket tipine bağlı olarak 17 ila 40 ppm arasında değişir [51] .

Gıdalardaki sülfitlerin sonuçlarını belirlemede ikinci önemli faktör işleme işlemlerinin niteliğidir. Daha önce alıntı yapılan çalışmalardan görülebileceği gibi sülfit seviyeleri çeşitli şekillerde değiştirilebilir. Ürün pH'ı pH 4.0'un altına düşerse, özellikle ürün ısıtıldığında; asitsiz olarak sülfitlerin çoğu ürünler birçoğu karakterize edilmeye devam eden birleşik sülfit eklentilerine dönüştürülebilir.

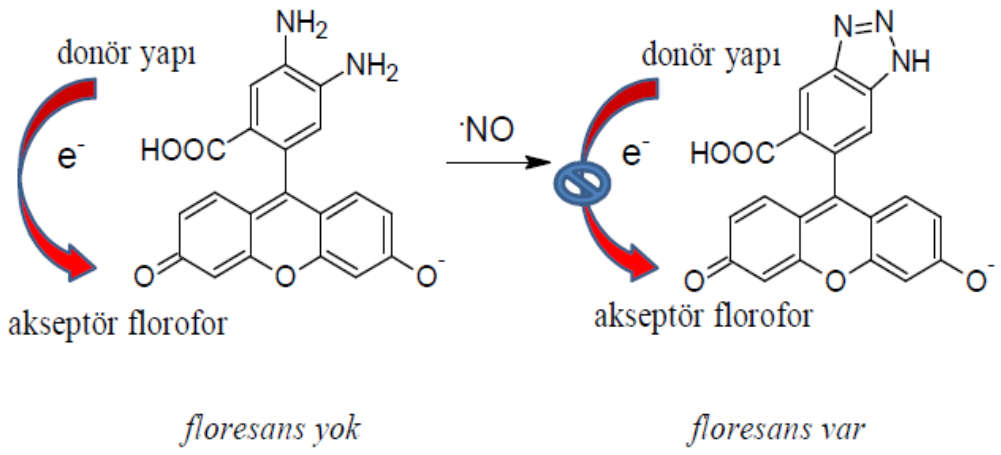
Gıdalardaki sülfitlerin sonuçlarını belirlenmesindeki son adım, preparatın kalıntı sülfit seviyelerine etkisidir. Bu son adım, sülfitlerle ilgili son kaygılar ve konuyla ilgili neredeyse hiçbir şey yayınla kadar çok az ilgi gördü. Sülfatlanmış Tayland eriştelerinin pişirilmesi, toplam SO_2 düzeyini yaklaşık% 70 oranında azaltır [52].

Görünüşe göre, işleme, depolama ve hazırlama büyük ölçüde gıdalardaki kalıntı sülfit seviyelerini düşürmek için etkilidir. Depolama ve hazırlamanın kalıntı sülfit seviyeleri üzerindeki etkilerinin daha fazla araştırılması ve birleşik sülfit katkı maddelerinin astımlı tepkinin tetikleyici olmadığı hipotezimizin doğrulanması ile birlikte daha fazla çalışma gerekecektir.

2.4. PROB MEKANİZMALARI

Floresans esaslı organik problar genellikle dört farklı mekanizma üzerinden etki göstermektedir:

- **PET (Uyarılmış Elektron Transferi)**: Uyarılmış elektronların molekül üzerinde yer değiştirmesine dayalı bir mekanizmadır. Prob'un üzerinde donör ve akseptör olarak isimlendirilen kısımlar arasındaki elektron transferi söz konusudur. Donörden akseptör florofora elektron akışıyla floresans etki gözlenmediği gibi, aksi şekilde, florofor akseptörden donör yapıya elektron akışı sağlandığı durumlarda da floresans etki gözlenmeyebilir (Şekil 2.1) [53].



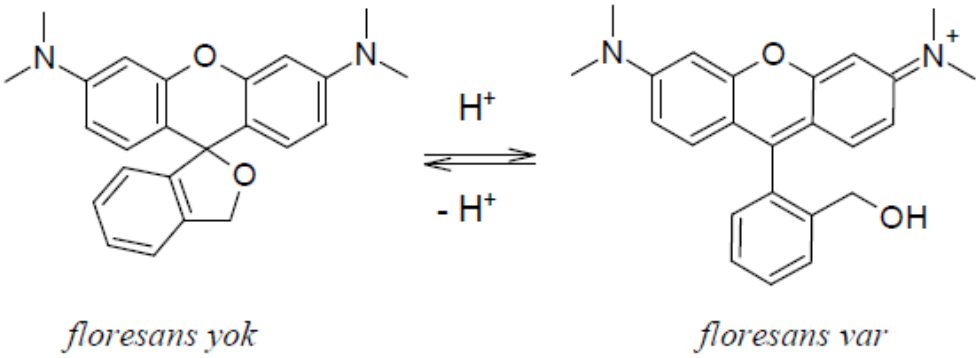
Şekil 2.2: PET mekanizmasının etkin olduğu floresan prob.

- **FRET (Rezonans Etkisiyle Gerçekleşen Enerji Transferi):** Uyarılmış haldeki enerjinin herhangi bir ışıma olmaksızın donör florofordan akseptör florofora aktarılmasına dayanmaktadır. Donör ve florofor yapıların spektral örtüşmelerine, birbirlerine olan uzaklık ve yönlenme açılarına bağlıdır [54]. FRET mekanizmasının geçerli olduğu problar hücresel görüntülemede kullanılmak için oldukça uygun yapılar olmakla birlikte, bazı probların hücrelere genetik kodlama ile tanımlanması gerekmektedir [55].

- **ICT (Molekül İçi Yük Transferi):** Florofor bir yapı üzerinde, elektronca zengin bir sübstitüe grup bulunuyorsa (amin grubu gibi) ve elektron verme isteğinde olan bu grup, yine aynı florofor üzerinde elektronca zengin olmayan bir yapıya konjuge olarak bağlı

ise, ışıma yoluyla uyarılma gerçekleştiğinde iki yapı arasında elektron transferi olur. Bu sayede dipol momentinin değişimine bağlı olarak Stoke kayması meydana gelir. Katyonların donör ve akseptör yapılarla olan yakın etkileşimi florofor üzerinde fotofiziksel değişimlere sebep olmakta ve molekül içi yük verimliliği buna göre değişmektedir [56].

- **Spirosiklizasyon:** Floresan probun, temel halde floresans ışıma göstermediği ve halkalı bir yapıda bulunduğu; ancak analizi istenilen bileşikler ile etkileşim gösterdiğinde halkanın açılması sonucu elektron akışının sağlanmasıyla floresans ışımanın gözlemlendiği mekanizmadır (Şekil 2.3) [57].



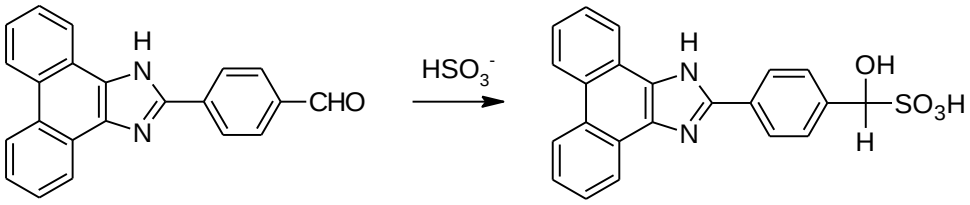
Şekil 2.3: Siklizasyon mekanizmasının etkin olduğu floresan prob.

2.4.1.Prob Moleküller Ve Bisülfit Arasında Gerçekleşen Etkileşim Mekanizmaları

Genel olarak, literatürde yeralan HSO_3^- tayini için geliştirilen floresan problar ile HSO_3^- arasında gerçekleşen reaksiyonlar şu şekilde sınıflandırılmıştır:

- **Aldehit grubu ile nükleofilik reaksiyon**

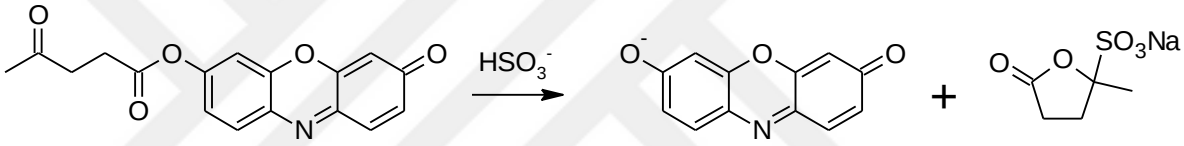
  Literatürde aldehit gruplarının HSO_3^- ve SO_3^{2-} ile katılma reaksiyonu verdiği bilinmektedir. Bu yöntem genellikle aldehit gruplarının saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu katılma mekanizması kullanılarak yeni florojenik problar geliştirilmiş ve analitik olarak HSO_3^- miktarlarının tayini sağlanmıştır [58].



Şekil 2.4: Aldehit grubu bisülfitin nükleofilik reaksiyonuna dayanan florojenik prob örneği.

- **Levunilat grubunun seçici olarak prob üzerinden hidrolizi**

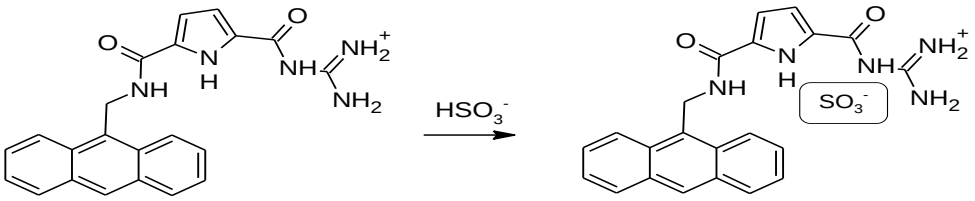
Levonilil klorür grubu, nükleotitlerde peptitlerde ve şekerlerde genellikle hidroksil grubunun korunması için kullanılmaktadır. Ayrıca levonilat ile korunmuş olan fenolik yapılar, nötral koşullar altında sülfit varlığında kolaylıkla deprotenize olabilmektedir. Bu bilgi kullanılarak levonilil grupları ile korunmuş fenolik yapılara sahip florojenik problar geliştirilmiş ve HSO_3^- tayininde kullanılmıştır [59].



Şekil 2.5: Levunilat grubunun seçici olarak bisülfit yapıdan hidroliz edilmesi.

- **Koordinatif etkileşim**

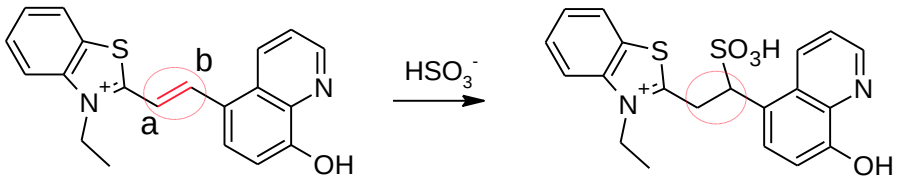
Floresans özellik taşıyan antresen halkası üzerine iyon seçici elektrot yapımında kullanılan pirol sübsitiye guanidin yapılarının kullanılmasıyla sentezlenen ve FRET mekanizmasının hakim olduğu iyon paylaşımı ve çoklu hidrojen bağlarının oluşumuna dayanan moleküller ile sülfit tayini gerçekleştirilmiştir [60].



Şekil 2.6: Koordinatif etkileşim ile bisülfit katılması.

- **Micheal katılması**

C=C bağına sahip hemisiyanin ve benzotiyazol esaslı florojenik problarla bisülfit yapısının 1,4 katılma mekanizmasına göre (Micheal katılması) reaksiyonunu içerir. Alifatik C=C çift bağı üzerindeki beta karbon üzerinden HSO_3^- çifte bağa katılır ve elektron konjugasyonunda değişim meydana gelir [61].



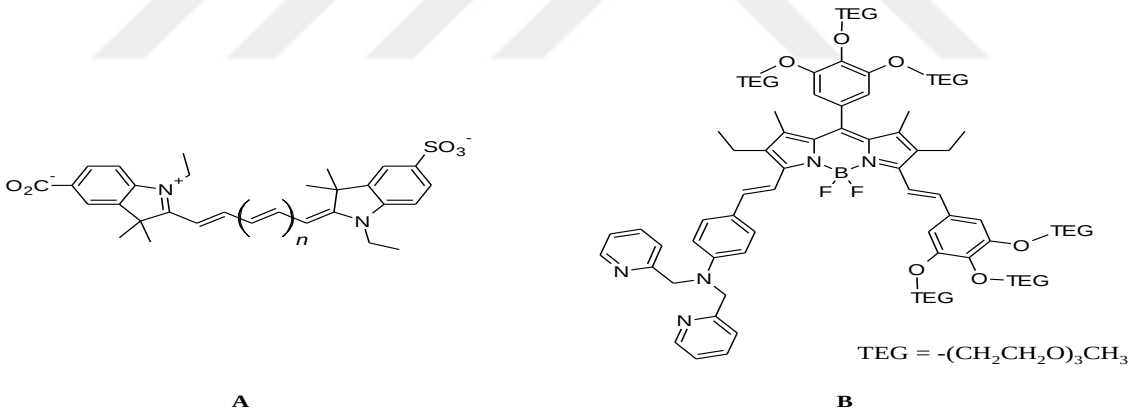
Şekil 2.7: Micheal katılması reaksiyonunu içeren prob örneği.

2.5. YAKIN KIZILÖTESİ (NEAR INFRARED, NIR) ESASLI FLORESAN PROBLAR

Hedef olarak tayin edilen biyoaktif bileşene özgü duyarlılık ve etkileşim gösteren ve etkileşim sonucu yapısında gözlenebilir derecede floresans değişimi meydana gelen floresan esaslı sentetik bileşiklere "floresan prob" denilmektedir. Floresan problar ile gerçekleştirilen tayin ve görüntüleme teknikleri modern biyolojide, biyolojik olay ve bileşenleri görüntülemek için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir [62,63]. Mikroskop altında hücrelerin görüntülenmesi ile karşılaştırıldığında, dokuların ve küçük deney hayvanlarının üzerinde gerçekleştirilen görüntülemelerin daha zor ve karmaşık bir işlem olduğu aşikârdır. Organizmada bazı hormon ve proteinlerin sudaki dağılımı sırasında 200-650 nm dalgaboyu değerlerinde birtakım ışık saçılmaları meydana gelmektedir. Ayrıca dokular, yapılarından kaynaklı olarak fotonlar saçarlar veya saçılan fotonları yansıtmaktadır [64]. Günümüze kadar gelen süreçte literatüre giren ve birçok alanda çeşitli amaçlar doğrultusunda kullanılan çok sayıda floresan prob sentezlenmiştir. Fakat bu probların çoğu elektromanyetik spektrumun UV-görünür bölge aralığında (400-650) eksitasyon (uyarılma) ve emisyon (absorpsiyon) değerlerine sahiptir. Bahsedildiği gibi, yüksek doku hücrelerinin yapısından ve birtakım vücut içi emilimlerden kaynaklanan otofloresansın da aynı değerler arasında gerçekleşiyor olması nedeniyle bu probların kullanımı zorlaşmakta veya kullanıldıklarında alınan ölçümlerin ve görüntüleme verilerinin doğruluğuna şüphe düşmektedir. Bu nedenle ışımanın dokulara nüfuz etmesi tam anlamıyla gerçekleşmiş olmaz [63-64].

Ortaya konulan mevcut problemlerin çözümü için yakın kızılötesi bölgede (near-infrared, NIR) eksitasyon ve emisyon dalgaboylarına (650-900 nm) sahip yapılar florofor olarak kullanılmaktadır. Bu sayede görüntüleme esnasında doku ve hücrelerde herhangi bir hasar meydana gelmeksizin, dokulara derinlemesine nüfuz ile daha detaylı görüntüleme ve analiz işlemlemleri yapılmaktadır. Probun floresansının dokulardan kaynaklanan otofloresans ile girişim yapması engellenmektedir. Sonuç olarak biyolojik prosesler hakkında moleküler

düzeyde daha sağlıklı verilerin alınması sağlanmaktadır [69]. NIR esaslı floroforların geliştirilmesi son yıllarda oldukça büyük bir önem kazanmıştır. Fotodinamik tedavide, OLED (organik ışık yayan diyot) teknolojisinde, biyogörüntüleme ve biyo-etiketleme işlemlerinde ve optik sensörlerde oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir [70]. Ciddi bir disiplin içerisinde ve çok yönlü araştırmalar sonucunda bilim insanları biyoloji alanında kullanılan çeşitli özelliklerde ve seçicilikte birçok NIR floresan prob geliştirmişlerdir [65-67]. Bu konudaki potansiyel uygulamaların gelişmekte olduğu bu süreçte, NIR özellikli yeni florofor gruplarının (yeni molekül yapısı olarak) geliştirilmesi ise oldukça sınırlı sayıda olmuştur. Her ne kadar yeni teoriler oluşturulmuş olsa da, near infrared bölgede eksitasyon ve emisyon değerlerine sahip probların oluşturulması için genellikle mevcut kullanılan floroforlar (kumarin, floresein, BODIPY çekirdeği ve siyanin boyaları) üzerinde konjuge sistemin uzatılması işlemi uygulanmaktadır. Örneğin polimetilen siyanin boyaları üzerinde konjuge sistem ikili bağların (C=C) çoğaltılması veya BODIPY boyalarının başka heterosiklik yapılar ve konjuge sistemler ile birleştirilmesiyle moleküllerin daha uzun dalgaboylarında uyarılması sağlanmıştır.(Şekil 2.3) [68,69].

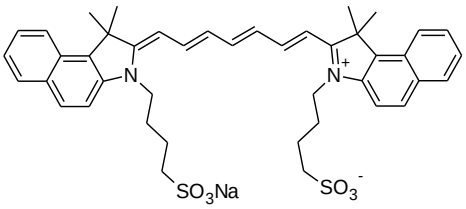


Şekil 2.8: Near-Infrared bölgede emisyon değerlerine sahip polimetinsiyanin (a) ve bodipy (b) floroforları.

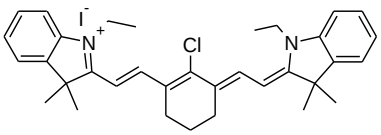
Florofor grupları içerisinde yaklaşık olarak yüz yıllık bir geçmişe sahip olan siyanin boyaları diğer yapılara göre her zaman daha fazla ilgi görmüştür. Yüksek molar ekstinksiyon katsayısına sahip olmaları, elektromanyetik spektrumun yakın infrared bölgesinde uyarılma, biyouyumluluk ve düşük miktarda sitotoksik özellik gösterme gibi avantajlarından dolayı sensörlerde, biyo-etiketleme ve biyo-görüntüleme tekniklerinde araştırmacılar tarafından sıklıkla NIR floresan yapısı olarak kullanılmıştır [72,73]. Genel olarak molekül yapıları

üzerinde iki adet azot atomu (N) vardır. Bu azot atomlarından bir tanesi kuaterner formda (NR4 +, artı yüklü katyon olarak) ve diğer yüksüz azot atomuna konjuge olarak (polimetin zinciri ile) bağlanmış halde bulunmaktadır. Molekül üzerindeki konjuge bağlar üzerinden azot atomları arasında yük (elektron) akışı sağlanmakta ve uzun dalgaboylarında uyarılmalar gerçekleşmektedir [70]. Yapılan araştırmalarda polimetin zincirin belirli bir uzunlukta genişletilmesiyle yüksek dalgaboylarında uyarılma kapasitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Fakat polimetin zincirinin uzamasına bağlı olarak molekül içerisinde agregasyon olarak nitelendirilen zincir üzerindeki grupların belirli yerlerden kıvrılarak kümelenmeye gittiği oluşum gözlemlenmiştir. Ayrıca molekülün kuantum verimi ve güçlü nükleofillerin bulunduğu ortamlarda molekülün gösterdiği kararlılık düşmektedir.

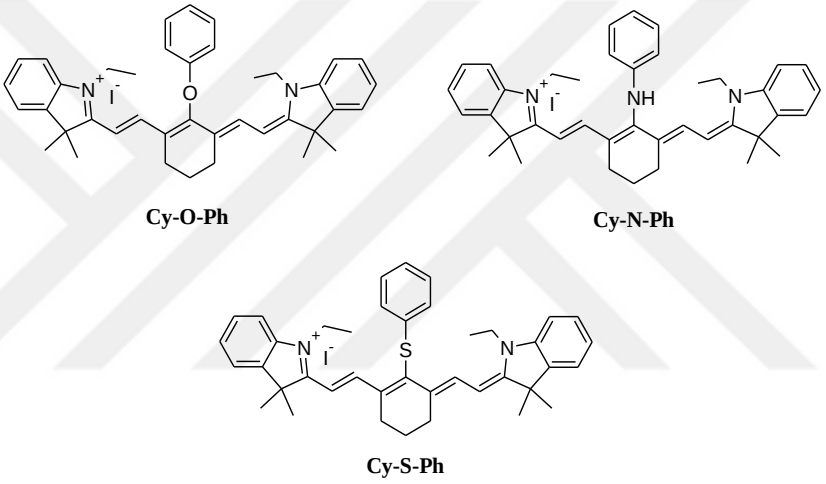
Bu sebeple siyanin molekülleri üzerinde bir takım modifikasyonlar yapılması kaçınılmaz olmuştur [65,66]. Birçok siyanin boyası sentezlenmiş olmasına rağmen, bunlar arasında bazı yapılar dikkatleri üzerine çekmiştir. Heptametin yapılarının benzoksazol, indol veya kinolin türevi yapılar ile kondenzasyonu sonucu meydana gelen ve kloro-heptametinsiyanin olarak isimlendirilen heterosiklik bileşikler de bu grupta yer almaktadır [73]. Molekül yapısı üzerinde bulunan klor atomu, birçok tiyol, amin ve fenolik (alkolat) nükleofiller ile kolaylıkla yer değiştirebilme özelliğine sahiptir (Şekil 2.4) [74-76].



ICG



Cy7-Cl



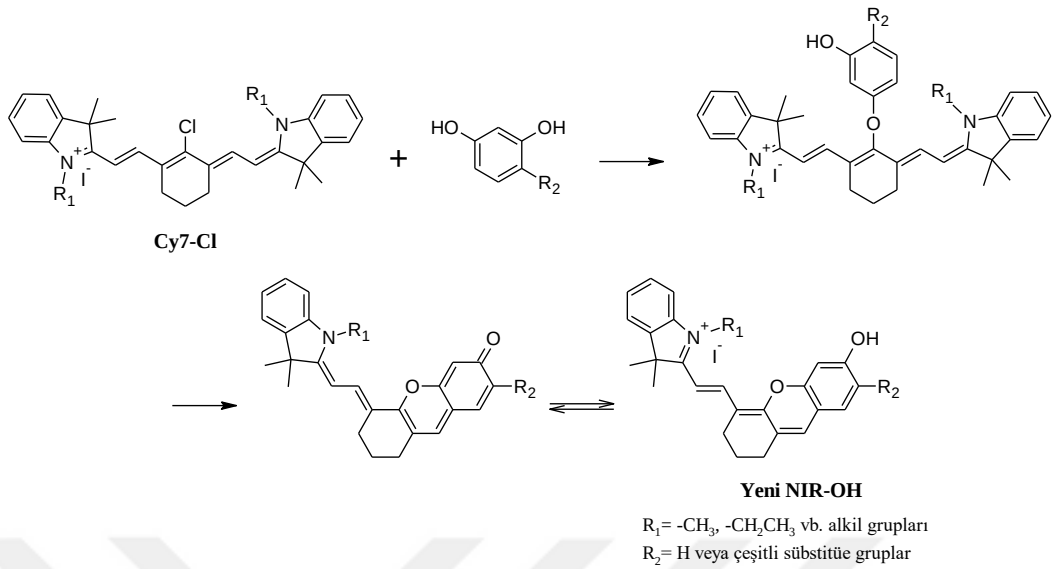
Cy-O-Ph

Cy-N-Ph

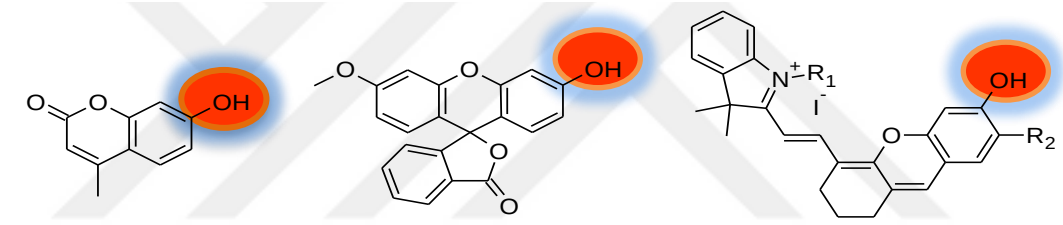
Cy-S-Ph

Şekil 2.9: Heptametin (ICG) ve kloro-heptametin (Cy7-Cl) siyanin yapıları ve türevleri.

Kloro-heptametin bileşiği üzerinden nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile yeni bileşikler oluşturuluması konusunda, Yuan ve ekibi çok önemli bir gelişme sağlamıştır (Şekil 2.20). Tıpkı 7-hidroksikumarin ve floresein floroforlarının sahip olduğu ve floresans özelliklerinin ana kaynağı olan karakteristik OH grubunu ve ayrıca katılma reaksiyonlarınun gerçekleşebileceği alifatik C=C çift bağını içeren siyanin boyalarını sentezlemeyi başarmışlardır (Şekil 2.5). Böylece NIR floresan boyaları alanında yeni bir grubun literatüre girmesi sağlanmıştır. Daha da önemlisi, kumarin ve floresein floroforları ile dizayn edilen tüm floresans esaslı sensör ve probların near infrared bölgeye taşınmasının ve buna bağlı olarak yeni floresan moleküllerin geliştirilmesinin önü açılmıştır (Şekil 2.9) [77-80].



Şekil 2.10: Yeni NIR siyanin bileşiklerinin sentez mekanizması.



7-Hidroksikumarin
λ_{em}: 448 nm

Floresein
λ_{em}: 513 nm

Yeni NIR Siyanin
$\lambda_{em}\geq$ 716 nm

R_1= -CH_3, -CH_2CH_3 vb. alkil grupları
R_2= H veya çeşitli sübstitüe gruplar

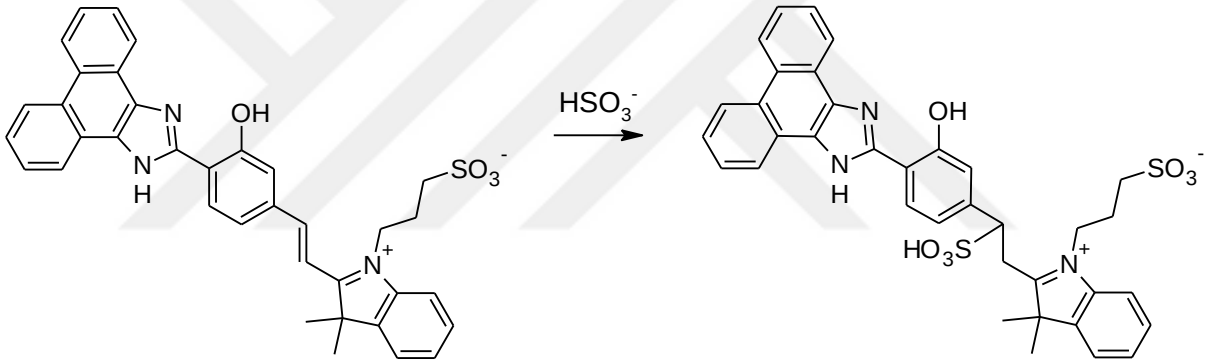
Şekil 2.11: Kumarin, floresein ve hemisiyanin boyalarının molekül yapıları.

2.6. LİTERATÜRDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

Floresan problar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda iki tip yanıt alma şekli vardır. Bunlar floresans intensitesinin artışına dayalı olan (turn-on) ve floresans intensitesinin azalmasına dayalı olan (turn-off) sistemlerdir.

- Zhang ve diğ. [81] geliştirdikleri floresan prob ile intensite artışına dayalı olarak bisülfit miktarını tayin etmişlerdir.

Fenantroimidazol yapısı, florojenik probların tasarlanmasında bir platform olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da, bisüfit tayini için fenantroimidazol esaslı yeni bir floresan prob geliştirilmiştir. Probe-1, bisülfite karşı floresans intensitesinin artışına dayalı olarak yüksek duyarlılıkta ve seçicilikte cevap vermiştir.



Probe 1
floresans yok

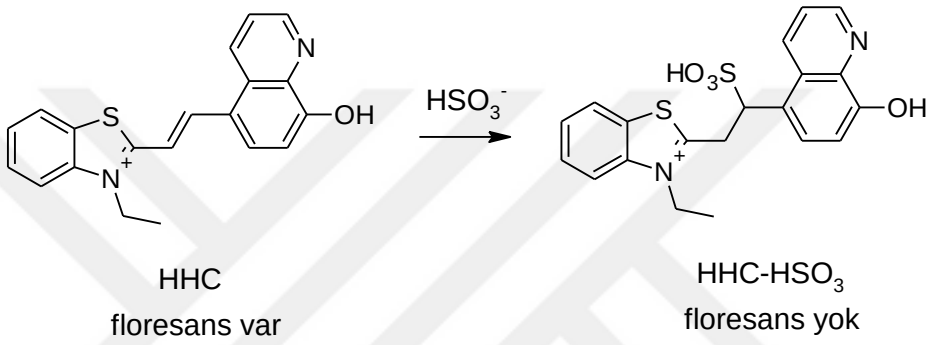
Probe 1-HSO_3
floresans var

Şekil 2.12: Bisülfite duyarlı fenantroimidazol türevi "turn-on" floresan problar.

Probe 1'in çalışma stok çözeltisi dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanmıştır. 10 μM prob çözeltisi içerisine belirli miktarlarda bisülfit ilave edilmiş ve bu karışımlar 10 dakika oda şartlarında bekletildikten sonra spektroflorometrede 453 nm'de ölçümler alınmıştır.

- Li [82] geliştirdiği florometrik prob aracılığıyla şeker ve şarap örneklerde bisülfit miktarını hesaplamış; ayrıca hücresel görüntüleme de sağlamıştır.

Prob olarak kullanılan HHC'nin (3-Ethyl-2-methyl-1,3-benzothiazol-3-ium iodide) stok çözeltisi DMSO içerisinde hazırlanmıştır. 10 µM prob çözeltisi içerisine belirli miktarlarda bisülfit ilave edilmiş ve tampon çözeltiler kullanılarak ortam pH'sının 7.4 olması sağlanmıştır. HHC ve bisülfit arasında floresans intensitesinin azalmasına dayalı gerçekleşen reaksiyon Şekil 2.13 deki gibidir.



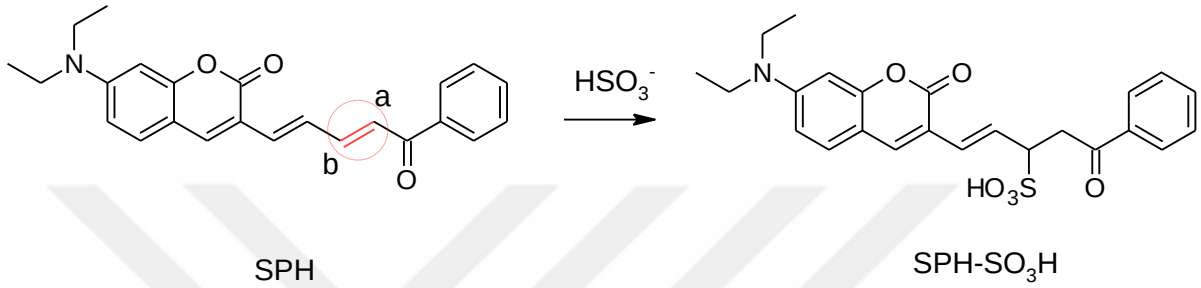
Şekil 2.13: Bisülfit tayini için "turn-off" floresan prob (HHC).

HHC için eksitasyon ve emisyon dalgaboyları sırasıyla 568nm ve 591nm olarak ölçülmüştür. Şeker numunelerinin stok çözeltisi deiyonize suda (0.25 g / ml); şarabın stok çözeltisi ise deiyonize su içinde şarap numunesinin 100 kez seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. 10 µM HHC çözeltisi üzerine farklı konsantrasyonlarda HSO_3^- ve şeker-şarap çözeltileri ilave edilmiş; tampon çözeltiler kullanılarak ortam pH'sının 7.4 olması sağlanmıştır. Spektroflorometrede oda şartlarında ve 590 nm'de ölçümler alınmış; sonuç olarak şekerdeki bisülfit miktarı 1,62 µM, kırmızı şarapta ise 0,54 µM olarak tespit edilmiştir.

- Sun ve diğ. [83] beyaz şarap içerisindeki bisülfit miktarını geliştirdikleri floresan prob aracılığıyla hesaplamışlardır.

Bu çalışmada kullanılan SPH prob molekülü (7-(diethylamino)-3-((1e,3e)-5-oxo-5-phenylpenta-1,3-dien-1-yl)-2H-chromen-2-one), Micheal katılma mekanizmasına dayalı olarak bisülfit tayini için tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Kumarin floroforu, C=C bağları ile konjuge olarak bağlanmış ve ayrıca bisülfitin nükleofilik olarak katılmasını sağlamak amacıyla bir α, β-doymamış karbonil yapısı ile türevlendirilmiştir. Sonuç olarak molekül üzerindeki

konjugasyonun artması absorpsiyon ve emisyon dalgaboylarında da kırmızıya kaymayı sağlamıştır (batokromik etki). 488 nm'de bisülfitin nükleofilik olarak SPH'ın β karbonuna katılma reaksiyonu sonucunda mevcut çözeltinin rengi kırmızıdan yeşile dönmüştür. Bu durum, bisülfit katılmasının probun molekül yapısındaki konjugasyonu kısalttığını ve kırmızıdan maviye kaymanın gerçekleştiğini göstermektedir. Çeşitli anyon ve tiyol bileşikleri içeriside dahi SPH'ın bisülfite karşı yüksek seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir.



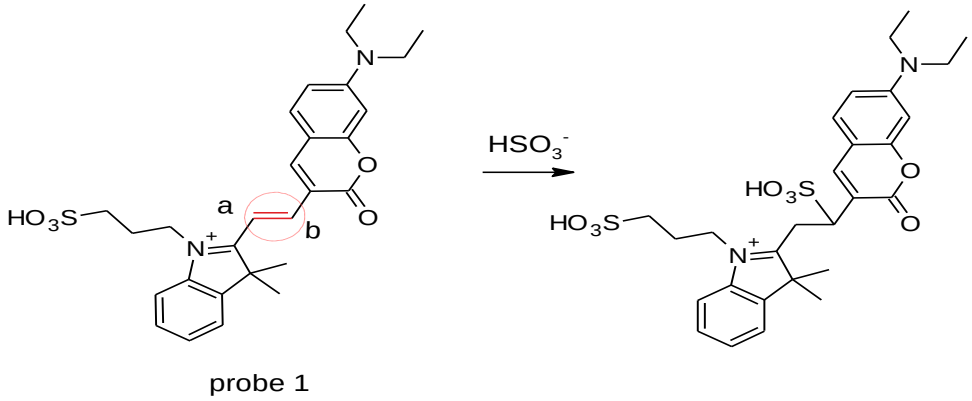
Şekil 2.14: SPH'ın bisülfit ile reaksiyon mekanizması.

Gerçekleştirilen çalışmada beyaz şarap numunesi 1/100 oranında seyreltilmiş ve belirli konsantrasyonlarda bisülfit katkısı yapılarak spektroflorometrik ölçümler yapılmıştır. Çalışma pH'sı 7.4 olarak ayarlanmıştır. Prob ve analizi gerçekleştirilecek örnekler, prob ve bisülfit arasında reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla karıştırıldıktan sonra 10 dk oda şartlarında bekletilmiştir. Analiz edilen beyaz şarap örneğinde toplam 24,8 µM bisülfit tayin edilmiştir.

- Zhang ve diğ. [84] geliştirdikleri florometrik prob ile serumda ve bazı gıdalarda bisülfit miktarını tayin etmişlerdir.

Bisülfit ve sülfit anyonlarının kantitatif olarak tespiti için yeni bir near infrared floresan prob olarak Probe 1'i sentezlemişlerdir. Kumarin türevi olan bu prob bisülfit iyonlarına yüksek seçicilik ve hassasiyet göstermiştir. Gerçek gıda örnekleri, serum ve hücresel görüntüleme uygulamalarında yüksek başarı elde edilmiştir.

Sistematik adı *2,3,3-trimethyl-1-(propan-3-sulfonyl) indolenine* olan Probe 1, elektron verici özellikteki (donör) kumarin molekülü ve güçlü elektron çekici özelliğe sahip, pozitif yüklü bir indol türevi bileşiğin C=C çift bağı ile birbirine konjuge olarak bağlanmasıyla elde edilmiştir (Şekil 2.15).



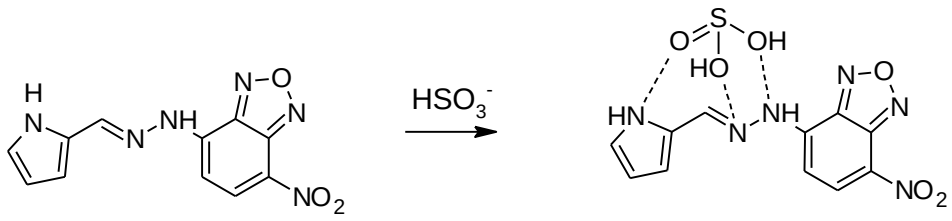
Şekil 2.15: Probe 1'in bisülfitle gerçekleşen katılma reaksiyonu.

Granül şeker, kristal şeker, kırmızı ve beyaz şarap örneklerinde yapılan çalışmalarda tayin edilen bisülfit miktarı şekerler için ortalama 2,30 µM; şaraplar için 0,43 µM civarındadır.

- Xie ve diğ. [85] çeşitli alkol ürünlerdeki bisülfit miktarlarını ölçmek için florometrik bir prob geliştirmişlerdir.

7-nitrobenz-2-okza-l,3-diazol (NBD) kromoforuna dayalı bisülfit için yeni bir flüoresan açma probu (bileşik 1) geliştirilmiştir. Çeşitli anyonlara karşı algılama davranışı, absorpsiyon ve floresans teknikleri ile araştırıldı. Bu prob, sulu asetonitril çözeltilerinde seçici, açmalı bir floresan tepkisi ve bisülite karşı oranmetrik kolorimetrik tepkisi göstermektedir. Prob 1'in bisülfit'e karşı muhtemel tanıma mekanizması, MS spektrum analizi ile gösterildi ve DFT hesaplamaları Prob, iyi geri kazanımlara sahip gerçek yaşam örneklerinde bisülfitin belirlenmesinde kullanıldı.

Prob, gerçek örneklerde bisülfit içeriğini incelemek için kullanılmıştır. Bir süpermarketten alınan beyaz şarap, kırmızı şarap ve bira, deiyonize su ile 10 kat seyreltildi ve standart ekleme ve geri kazanma yöntemleri ile analiz edildi. Bu numunelerde iyi geri kazanımlarla birlikte. beyaz şarap, kırmızı şarap ve bira bisülfit içeriği sırasıyla 6.2, 13.7 ve 7.1 µM olmuştur [85].



Şekil 2.16: Probun bisülfit ile katılma reaksiyonu

Yapılan çalışma sonucu bulunan değerler 10 μM bisülfit ekleme yöntemi ile beyaz şarapta 16.8 μM, kırmızı şarapta 23.2 μM birada ise 17.7 μM olarak ölçülmüştür (pH: 7.4, λ_{em}: 537 nm).

Kullanılan probların LOD (limit of detection) değerleri kıyaslanırsa; turn on yanıt veren 1.0–50.0 μM doğrusal aralığında 0.20 μM olarak belirlenmiştir. Turn off yanıt veren probların aynı doğrusal aralıktaki LOD değeri 1,72 μM olarak görülmüştür [86].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, sentez esnasında maddelerin karıştırılması ve ısıtma işleminin gerçekleştirildiği Heidolph marka manyetik karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde Mettler Toledo pH-metre, floresans ölçümlerinde Varian Cary Eclipse model spektroflorometre ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu kuartz küvet, sentezlenen bileşiğin kütlesinin tespiti için Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap marka spektrometre, mikrodalga ektraksiyon için Milestone ETHOS ONE, Shelton, CT, USA mikrodalga ekstraksiyon cihazı, distile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 distile su sistemi kullanılmıştır.

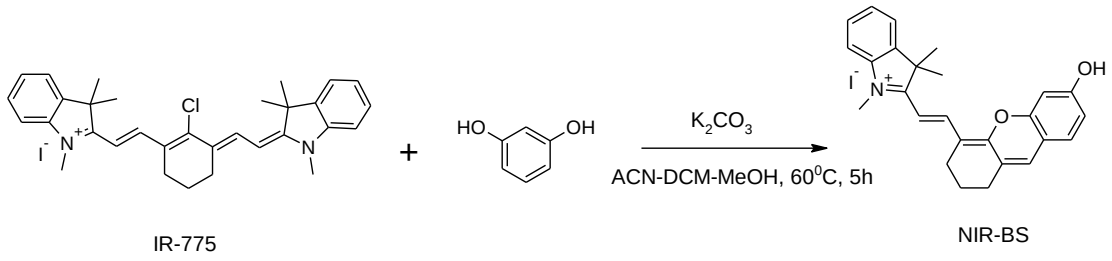
3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler: sodyum bisülfit ($NaHSO_3$), distile su, etil alkol (EtOH), sodyum siyanür (NaCN), sodyum klorür (NaCl), potasyum bromür (KBr), sodum nitrat ($NaNO_3$), sodyum sülfat (Na_2SO_4), sodyum sülfit (Na_2SO_3), sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3$), 5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), metil alkol (MeOH), HCl, NaOH, potasyum karbonat (K_2CO_3) şeklindedir. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.3. BİSÜLFİT İÇİN GELİŞTİRİLEN PROBUN SENTEZİ VE MEKANİZMASI

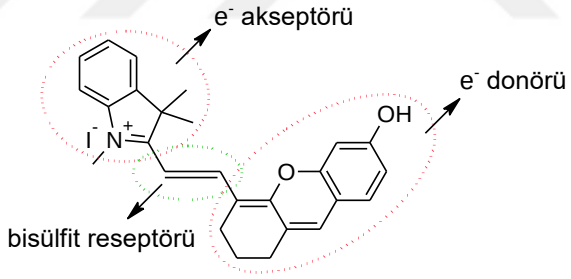
Probun Sentezlenmesi:

NIR-BS bileşiği, literatürde bildirilen prosedüre göre sentezlenmiştir [76,77]. Rezorsinol (550 mg, 5 mmol) ve potasyum karbonat (K_2CO_3, 690 mg, 5 mmol) 20 ml asetonitril içerisinde N_2 atmosferi altında ve oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmıştır. Daha sonra asetonitril-diklorometan-MeOH çözücü karışımı içerisinde önceden çözülmüş olan IR-775 (1,37 gr, 2,25 mmol) şırınga yoluyla karışıma ilave edilip reaksiyon karışımı, 5 saat boyunca 60 °C'de ısıtılmıştır. Karışım süzülüp solvent evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Kolon kromatografisi CH_2Cl_2-MeOH ürün saflaştırılmıştır. Sonuçta, mavi-yeşil renkli katı NIR-BS bileşiği elde edilmiştir. Verim % 63, 725 mg, e.n. 188-190 °C şeklindedir.

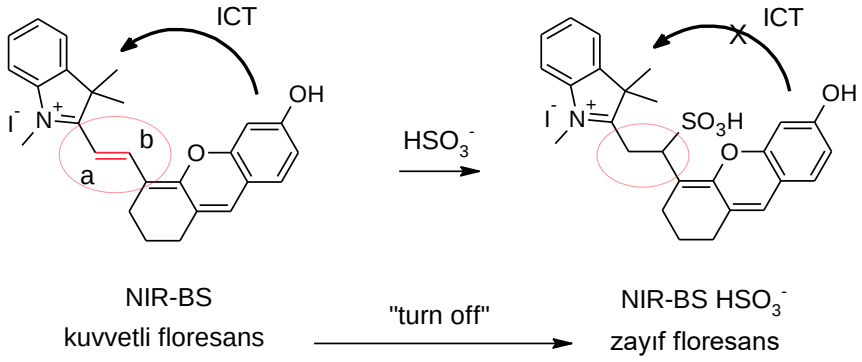


Şekil 3.1: NIR-BS probunun sentez mekanizması.

Bu çalışmada bisülfit iyonlarının tespiti için "Micheal katılması" olarak bilinen ve HSO_3^- iyonlarının C=C çift bağına nükleofilik katılmasını içeren için yeni bir NIR floresan prob geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan prob molekülün yapısını oluşturan hemisiyanin akseptör molekül olarak, etilen grubu HSO_3^- reseptörü ve ksanten türevi bileşik ise hem boyarmadde hem de donör olarak görev yapmaktadır. Biyolojik örneklerde yüksek doku hücrelerinden kaynaklanan otofloresans ile girişim oluşmaması, düşük enerjili floresans sağlanması, sitotoksik etkisinin bulunmaması gibi bir takım üstün özelliklerinden dolayı NIR floresan molekül olarak NIR-BS kullanılarak HSO_3^-'in hızlı ve seçimli tayini için yeni bir spektroflorometrik yöntem geliştirilmiştir [78-80].



Şekil 3. 2: NIR-BS molekülünün yapısını oluşturan kısımların özellikleri.



Şekil 3.3: NIR-BS ve HSO_3^- arasında gerçekleşen reaksiyon mekanizması.

3.4. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Molekül ağırlığı 104,06 g/mol olan $NaHSO_3$'ten 5,23 mg alındı ve 50 ml balon jojede distile su kullanılarak 1,0 mM derişimde stok çalışma çözeltisi hazırlandı. Çalışma örnekleri, stok çözeltinin 10 kez distile su ile seyreltilmesiyle elde edildi. Molekül ağırlığı 511,39 g/mol olan NIR-BS, 1,0 mM olacak şekilde 2,55 mg tartım alınıp EtOH ile 5,0 ml'ye tamamlandı. 50 ml balon jojede EtOH ile hacime tamamlanarak 0.1 mM derişimde probun çalışma çözeltisi hazırlandı. İnterferans denemesi için bazı anyon ve katyonlara ait tüm çözeltiler, 1,0 mM derişimde olacak şekilde 50 ml balon jojede distile su kullanılarak hazırlandı. DTNB, 1,0 mM olacak şekilde 1 mL EtOH ile çözüldükten sonra pH 8,0 0,1 M tris tamponuyla 25,0 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.5. ÖRNEK HAZIRLANMASI

Kayısı ekstraktları: Malatya yöresine ait iki farklı kayısı türü, mikrodalga ekstraksiyon sistemi (Milesotne ETHOS ONE, Shelton, CT, USA) ile ekstrakte edilmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon, teflon (PTFE) kaplarda, fiber optik sıcaklık kontrol sistemi ve kapalı fırın sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Herbir kayısı örneğinden 0,5 g tartım alınarak üzerine 10 ml %80 MeOH çözeltisi (v/v) ilave edildi. Teflon kaplara hazırlanan bu karışımın içerisine manyetik karıştırcı konulup simetrik olarak cihaz içerisine yerleştirildi. Ekstraksiyon işlemi sırasında 500 W güç uygulanarak 3 dk çalışma sıcaklığı olan 80 ºC'ye ulaşıldı. Bunu takip eden 3 dakika içerisinde sıcaklık 80 ºC'de sabit tutuldu ve son 5 dakikada içerisinde soğumaya bırakılarak ekstraksiyon işlemi 11 dakikada tamamlandı. Elde edilen tüm kayısı ekstreleri, 0.45 µm membran filtreden süzülüp analiz edilinceye kadar +4 ºC'de saklanmıştır [87].

Marketten alınan farklı markalarda iki farklı türde kırmızı şarap ve beyaz şarap, EtOH ile 1:100 oranında seyreltilerek geliştirilen florometrik yöntem ve referans DTNB yöntemine göre analiz edilmiştir.

3.6. GELİŞTİRİLEN FLOROMETRİK YÖNTEM

Referans çözelti olarak hazırlanmış olan 0.1 mM NIR-BS prob çözeltisinden 1 ml alınıp toplam hacim 4 ml olacak şekilde EtOH ile son hacme tamamlanmıştır. HSO_3^- tayini için geliştirilen florometrik yönteme göre son hacmi 4 ml olan reaksiyon karışımı: 1 ml NIR-BS (0,1 mM) + x ml HSO_3^- (0,1 mM) + (3-x) ml Et-OH şeklindedir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 1 dk

süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra bu inkübasyon çözeltilerinin 720 nm emisyon dalgaboyundaki intensite değerleri ölçülmüştür (λ_{eks}= 685 nm). Ortam pH'sı 6-6,5 aralığında olup reaksiyon çok hızlı gerçekleştiği için optimum bekleme süresi 1 dk olarak belirlenmiştir. Florometrik yönteme göre $\Delta I(I_{prob}-I_{örnek})$ ile konsantrasyon arasında kalibrasyon grafiği çizilmiştir. İlgili grafikten elde edilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak bazı gıda ve içeceklerin HSO_3^- içerikleri tayin edilmiştir.

3.7. DTNB REFERANS YÖNTEMİ

Referans yöntem olarak, Sadegh ve diğ. [85] yapmış oldukları çalışma esas alınmıştır. İlgili yöntemde referans çözelti: 2 ml tampon (pH 8.0) + 8 ml H_2O şeklindedir. HSO_3^- tayini için seçilen referans DTNB yöntemine göre son hacmi 10 ml olan stok çözelti: 2 ml tris tamponu (pH 8; 0,1 M) + x ml HSO_3^- (0.1 mM) + (8-x) ml H_2O şeklindedir. Stok çözeltiden 3 ml alınıp üzerine 0,02 ml DTNB (1,0 mM) reaktifi eklenmiştir. Reaksiyon karışımları, oda koşullarında 2 dk bekletilerek 412 nm'de UV-Vis spektrofotmetresinde referansa karşı örneklerin absorbans değerleri ölçülmüştür. Spektrofotometrik yönteme göre absorbans ile konsantrasyon arasında kalibrasyon grafiği çizilmiştir. İlgili grafikten elde edilen kalibrasyon doğrusu kullanılarak bazı gıda ve içeceklerin HSO_3^- içerikleri referans yönteme göre tayin edilmiştir [88].

4. BULGULAR

4.1. NIR-BS PROBU İLE FLOROMETRİK BİSÜLFİT TAYİNİ

4.1.1. Florometrik Bisülfit Tayin Yönteminin Optimizasyonu

NIR-BS problu florometrik yöntemle HSO_3^- için eksitasyon dalgaboyu 685 nm, emisyon dalgaboyu (λ_{em}) ise 720 nm olarak belirlenmiştir. NIR-BS probu ile HSO_3^- arasındaki Michael katılma reaksiyonu çok hızlı bir şekilde gerçekleştiğinden optimal reaksiyon süresi 1 dk olarak belirlenmiştir. HSO_3^- için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak florometrik yönteme göre kalibrasyon doğru denklemi ve korelasyon katsayısı (Tablo 4.1), emisyon spektrumu (Şekil 4.1) ve ilgili kalibrasyon grafiği (Şekil 4.2) aşağıda verilmiştir.

Blank : 1 ml NIR-BS (0,1 mM) + 3 ml EtOH (başlangıç intensitesi (I): 210,62)

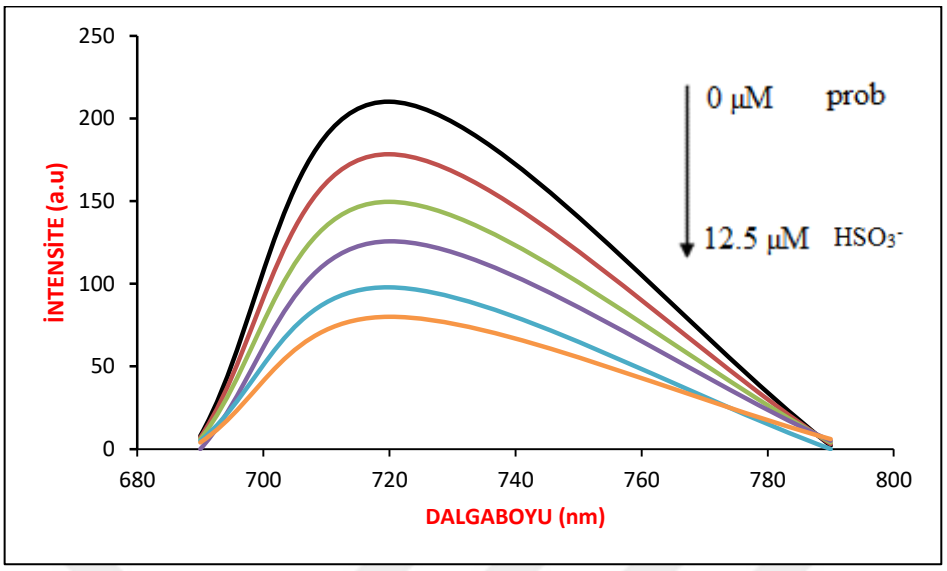
Örnekler : 1 ml NIR-BS (0,1 mM) + x ml HSO_3^- (0,1 mM) + (3-x) ml Et-OH; V_t = 4 ml

Tablo 4.1: Bisülfitin konsantrasyon (c)-intensite (I) değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm) ve doğru denklemi.

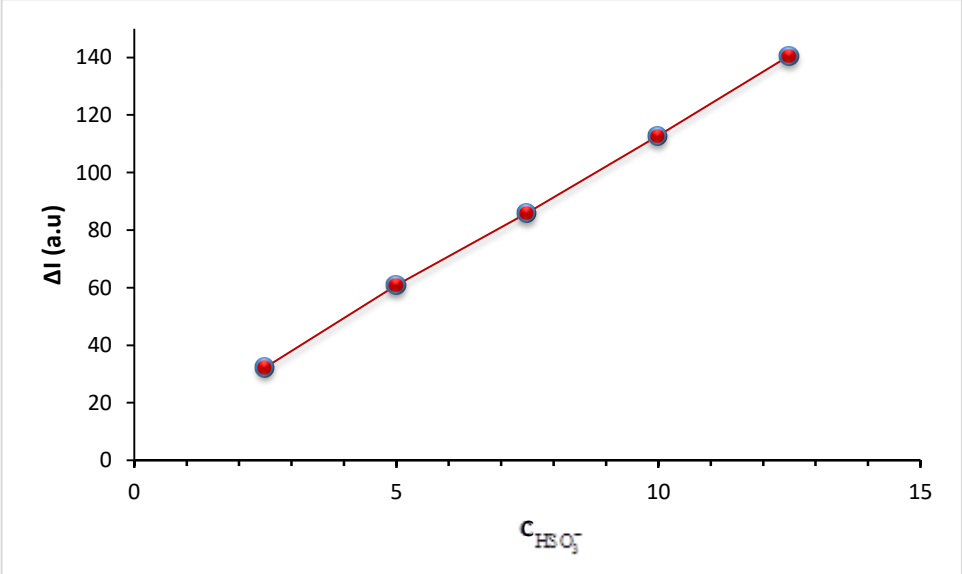
$C_{HSO_3^-}$ (μM)	I	ΔI
2.5	178.32	32,3
5	149.55	61,70
7.5	125.66	84,96
10	112.38	98,24
12.5	102.65	107,97

Doğru denklemi: $y=10.81\, c_{HSO_3^-} + 3.28$; r=0,998

I_{NIR-BS}= 210,62



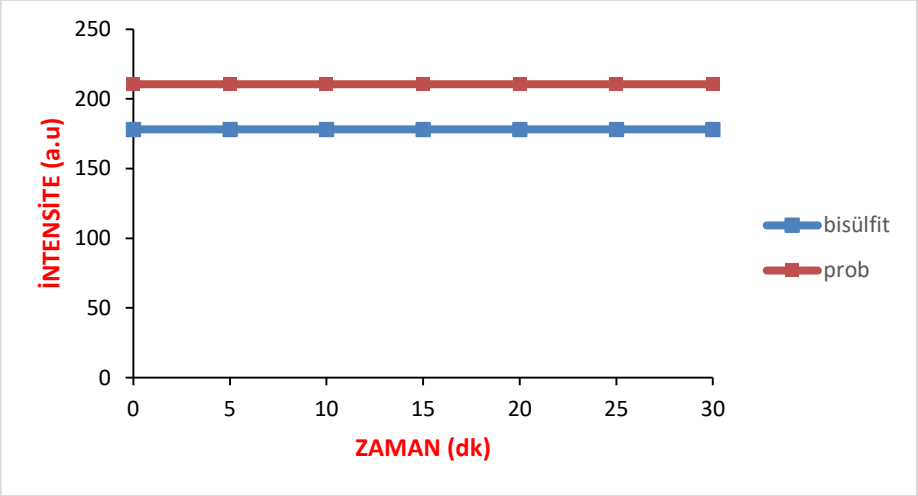
Şekil 4.1: HSO_3^- (0-12,5 µM) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).



Şekil 4.2: HSO_3^-'in florometrik yöntemle elde edilen kalibrasyon eğrisi.

4.1.2. İnkübasyon Süresi

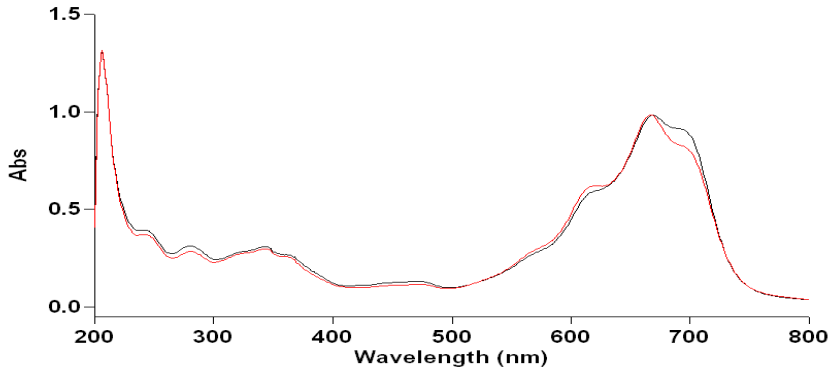
NIR-BS prob (0,1 mM) ve NIR-BS + HSO_3^- (2,5 µM) çözeltilerinin intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm) 30 dk süresince izlenerek inkübasyon için optimal süre 1 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: NIR-BS probunun tek başına ve HSO_3^- katkılı intensite değerlerinin (λ_{em}=720 nm) inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi.

4.1.3. UV-Görünür Alan Absorpsiyon Spektrumları

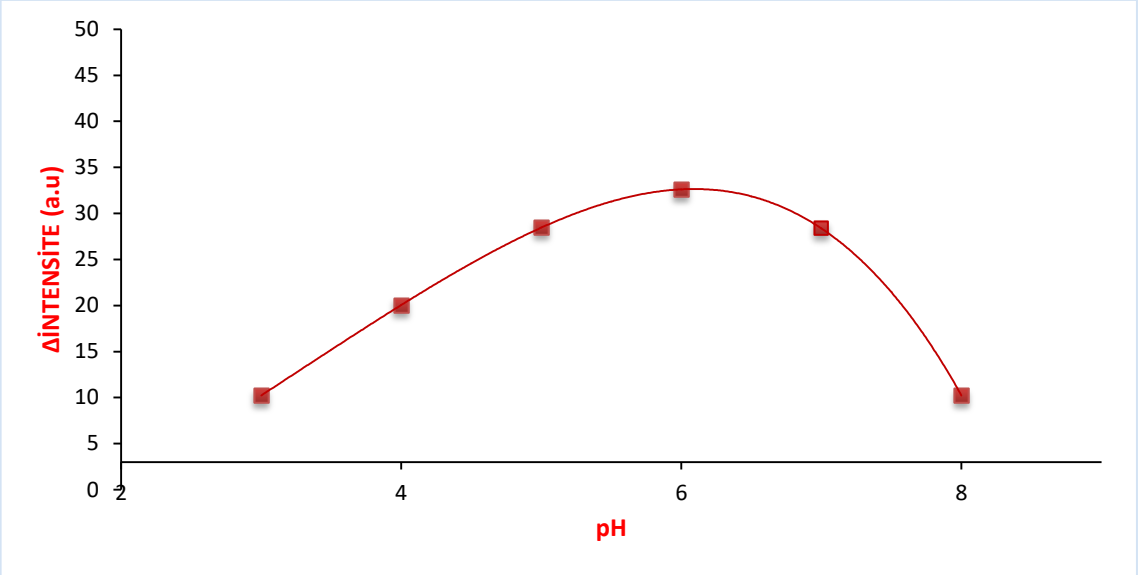
NIR-BS probunun (0.1 mM) tek başına ve HSO_3^- katkılı (2,5 µM) çözeltilerinin UV-görünür alan spektrumları Şekil 4.'te verilmiştir. NIR-BS probunun emisyon dalgaboyu olan 720 nm'de absorpsiyon pikinde HSO_3^- ilavesiyle değişim (absorpsiyon azalması) gözlenmiştir.



Şekil 4.4: NIR-BS probunun tek başına ve HSO_3^- katkılı UV-görünür alan spektrumları.

4.1.4. pH Etkisi

NIR-BS (0.1 mM) + HSO_3^- (2,5 µM) çözeltisinin farklı pH değerlerindeki (3-8) intensite değerleri izlenerek (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm) maksimum floresans intensitesinin elde edildiği pH 6,0 yeni geliştirilen florojenik yöntemde optimal pH olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).

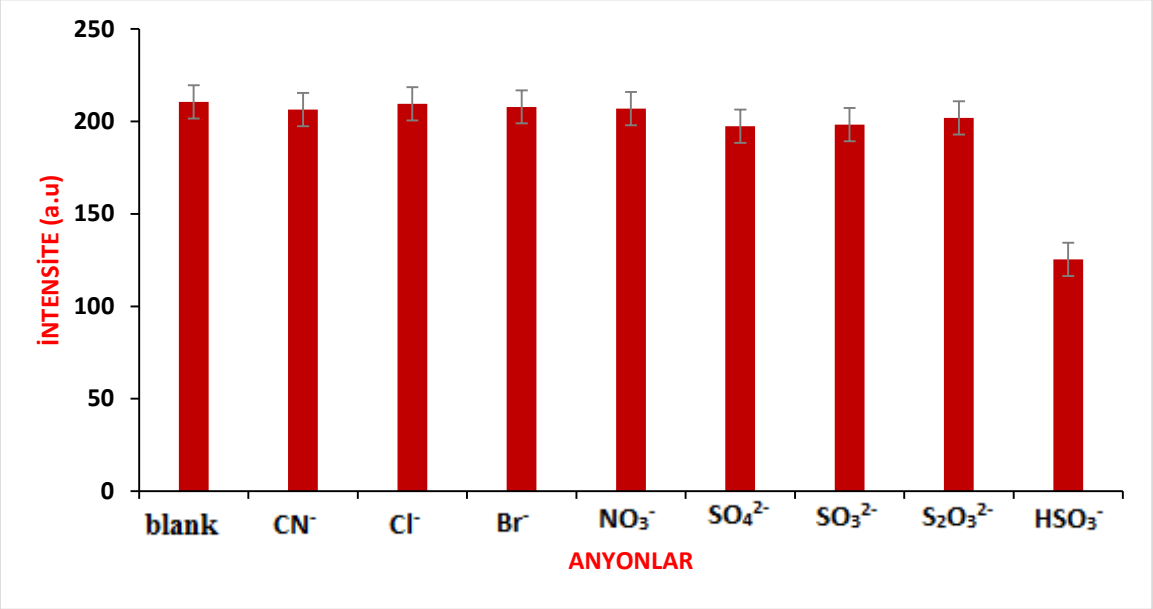


Şekil 4.5: NIR-BS + NIR-BS + HSO_3^- çözeltisinin intensite değerlerinin (λ_{em}=720 nm) pH'ya bağlı olarak değişimi.

4.1.5. İnterferans Etkisi

NIR-BS probunun seçimliliğini göstermek amacıyla bazı anyon (başlangıç konsantrasyonu 1,0 mM; asetat (CH_3COO^-), siyanür (CN^-), florür (F^-), klorür (Cl^-), bromür (Br^-), nitrat (NO_3^-), karbonat (CO_3^{2-}), sülfat (SO_4^{2-}), sülfit (SO_3^{2-}) ve tiyosülfat ($S_2O_3^{2-}$)) ve bazı biyotiyoller (başlangıç konsantrasyonu 1,0 mM; glutatyon (GSH), sistein (Cys), homosistein (HCy) ve N-asetil sistein (NAC) yeni geliştirilen florojenik yöntemle analiz edilmiştir. İlgili tüm anyon ve biyotiyollerin NIR-BS probuna ilavesi sonucunda elde edilen floresans intensiteleri Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çalışma Prosedürü: 1 ml NIR-BS (0,1 mM) + 1 ml anyon/tiyol bileşikleri (1,0 mM) + 2 ml EtOH (V_T: 4 ml)



Şekil 4.6: Bazı anyonların ve biyotiyollerin (1,0 mM) ve HSO_3^-'in karşılaştırmalı olarak florometrik yöntemle elde edilen intensite değerleri (λ_{em}=720 nm).

4.2. BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE FLOROMETRİK BİSÜLFİT TAYİNİ

4.2.1. Bazı Şarap Örneklerinin Bisülfit İçeriklerinin Belirlenmesi

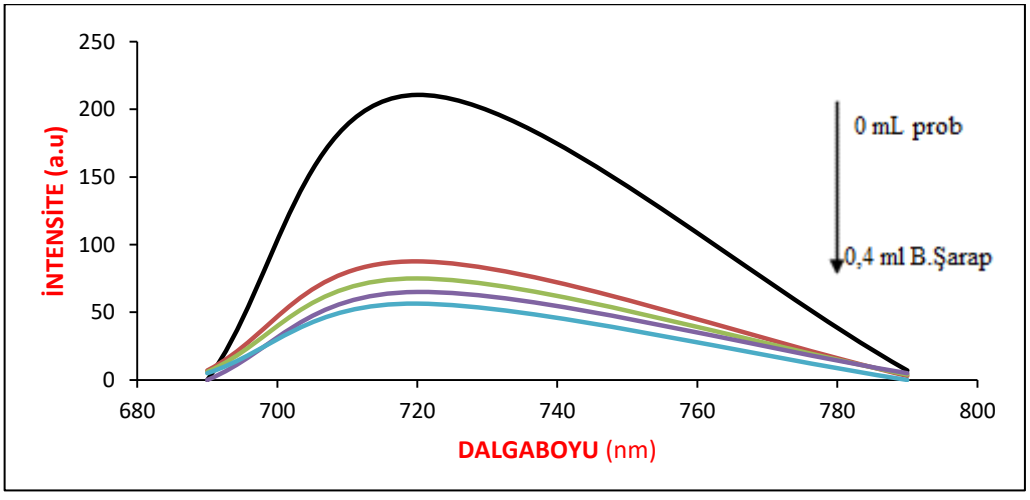
NIR esaslı florometrik yöntem, üç farklı şarap örneğine (beyaz, kırmızı öküzgözü ve kırmızı sek şarap) uygulanarak herbir şarap örneğinin HSO_3^- içeriği belirlenmiştir.

- **Beyaz Şarap**

Beyaz şarap (1:100 oranında seyreltilmiş) için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak florometrik yönteme göre elde edilen intensite değerleri (Tablo 4.2) ve ilgili emisyon spektrumu (Şekil 4.7) aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.2: Beyaz şarabın hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62).

Beyaz şarap (mL)	I	ΔI
0,1 ml	87,61	123,01
0,2 ml	75,01	135,61
0,3 ml	65,04	145,58
0,4 ml	56,41	154,21



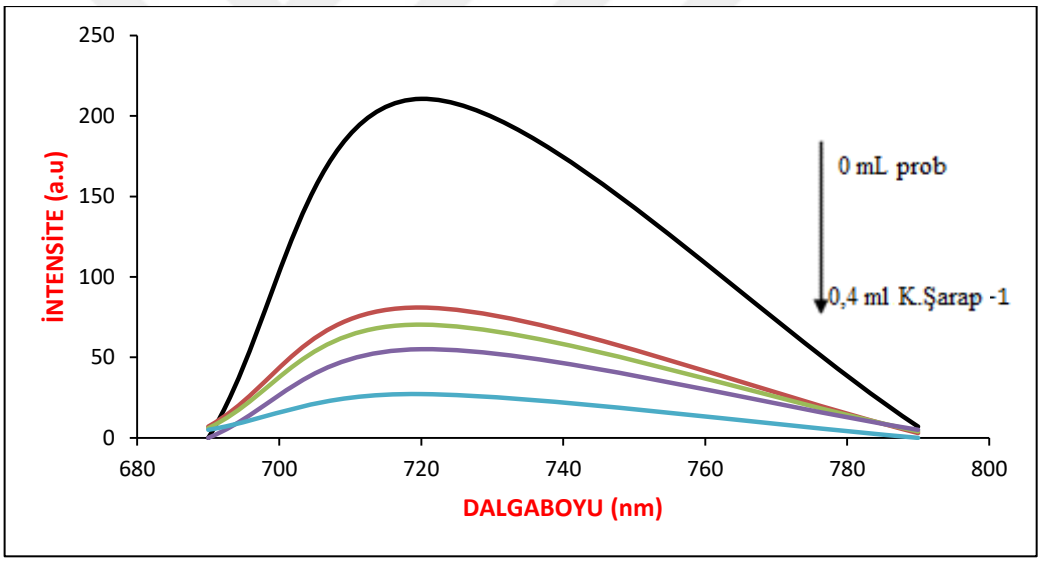
Şekil 4.7: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) beyaz şarap örneklerinin (1:100 oranında seyreltilmiş) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

- **Kırmızı Öküzgözü Şarabı**

Kırmızı öküzgözü şarabı (1:100 oranında seyreltilmiş) için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak florometrik yönteme göre elde edilen intensite değerleri (Tablo 4.3) ve ilgili emisyon spektrumu (Şekil 4.8) aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.3: Kırmızı öküzgözü şarabının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62).

Kırmızı Öküzgözü şarabı (mL)	I	ΔI
0,1 ml	80,97	129,71
0,2 ml	70,35	140,27
0,3 ml	55,08	155,54
0,4 ml	27,21	183,41



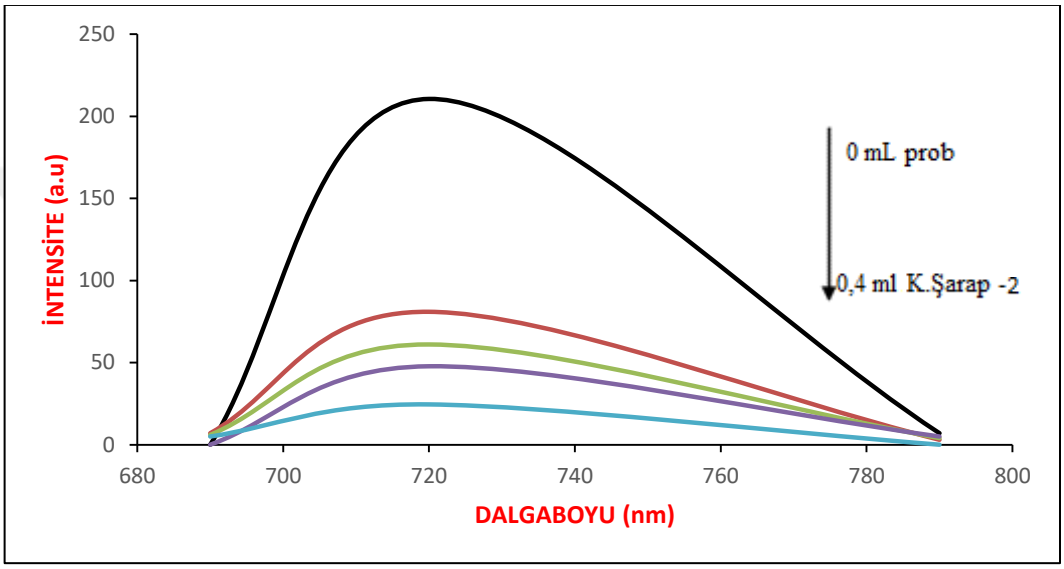
Şekil 4.8: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) kırmızı öküzgözü şarap örneklerinin (1:100 oranında seyreltilmiş) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

- **Kırmızı Sek Şarap**

Kırmızı sek şarap (1:100 oranında seyreltilmiş) için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak florometrik yönteme göre elde edilen intensite değerleri (Tablo 4.4) ve ilgili emisyon spektrumu (Şekil 4.9) aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.4: Kırmızı sek şarabın hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,62).

Kırmızı Öküzgözü şarabı (mL)	I	ΔI
0,1 ml	80,97	129,65
0,2 ml	61,06	149,56
0,3 ml	47,78	162,84
0,4 ml	24,55	186,07



Şekil 4.9: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) kırmızı sek şarap örneklerinin (1:100 oranında seyreltilmiş) varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

Çalışılan şarap örneklerine yapılan HSO_3^- katkıları sonucunda NIR esaslı florometrik yöntemle elde edilen bulgular çerçevesinde geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı incelenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Şarap örneklerine HSO_3^- katkıları ile elde edilen sonuçlar (N=3).

Beyaz şaraba HSO_3^- katkısı	$C_{katkı}$ (µM)	2,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	2,47
	SD	0,04
	%RSD	1,62
	% Geri kazanım	98,91
	$C_{katkı}$ (µM)	7,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	7,78
	SD	0,18
	%RSD	2,31
	% Geri kazanım	103,73
Kırmızı şarap-1'e HSO_3^- katkısı	$C_{katkı}$ (µM)	2,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	2,47
	SD	0,12
	%RSD	4,89
	% Geri kazanım	98,72
	$C_{katkı}$ (µM)	7,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	7,48
	SD	0,08
	%RSD	1,07
	% Geri kazanım	99,71
Kırmızı şarap-2'ye HSO_3^- katkısı	$C_{katkı}$ (µM)	2,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	2,40
	SD	0,06
	%RSD	2,50
	% Geri kazanım	96,23
	$C_{katkı}$ (µM)	7,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	7,11
	SD	0,13
	%RSD	1,83
	% Geri kazanım	94,66

4.2.2. Bazı Kayısı Örneklerinin Bisülfit İçeriklerinin Belirlenmesi

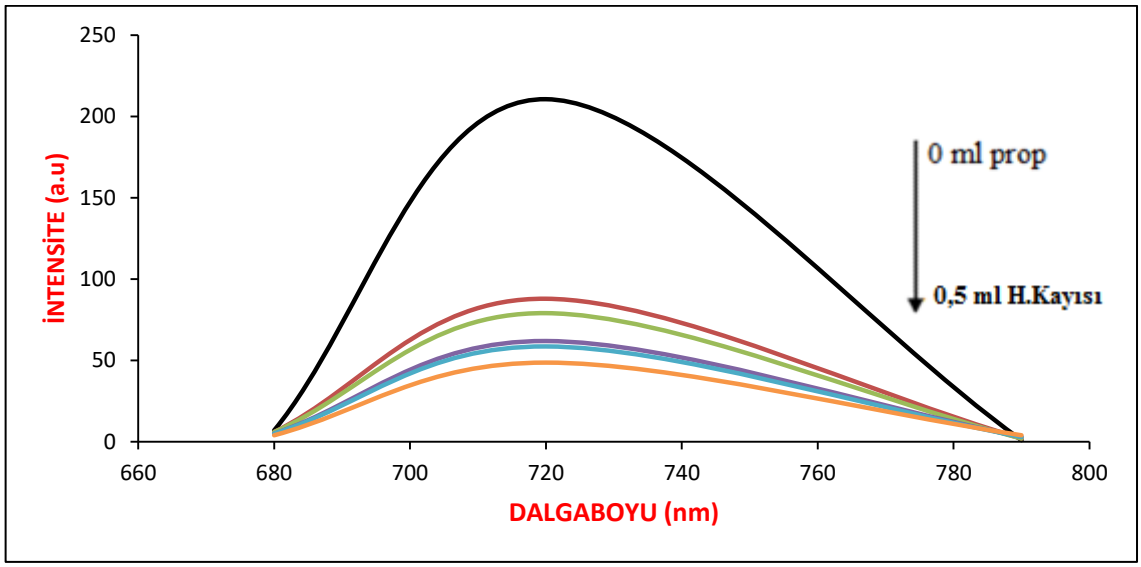
NIR esaslı florometrik yöntem, iki farklı kayısı türüne (Hasanbey ve zerdali kayısısı; 0.5 g öğütülmüş) uygulanarak herbir mikrodalga kayısı ekstraktının HSO_3^- içeriği belirlenmiştir.

- **Hasanbey Kayısısı**

Hasanbey kayısı türü için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak yeni geliştirilen florometrik yönteme göre elde edilen intensite değerleri (Tablo 4.6) ve ilgili emisyon spektrumu (Şekil 4.10) aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.6: Hasanbey kayısı ekstraktının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 211,01).

Hasanbey kayısı ekstraktı (ml)	I	ΔI
0,1 ml	87,94	123,07
0,2 ml	79,09	131,92
0,3 ml	61,94	149,07
0,4 ml	58,62	152,39
0,5 ml	48,67	162,34



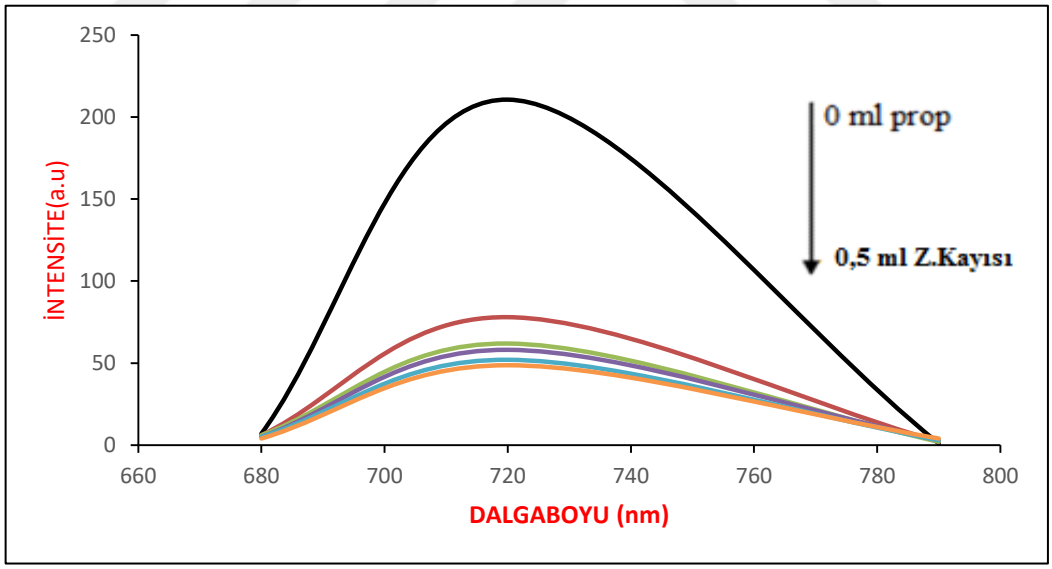
Şekil 4.10: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) Hasanbey kayısı ekstraktı varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

- **Zerdali Kayısısı**

Zerdali kayısı türü için 720 nm'deki intensite değerleri kullanılarak yeni geliştirilen florometrik yönteme göre elde edilen intensite değerleri (Tablo 4.7) ve ilgili emisyon spektrumu (Şekil 4.11) aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.7: Zerdali kayısı ekstraktının hacim-intensite değerleri (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm; I_{blank}= 210,06).

Zerdali kayısı ekstraktı (ml)	I	ΔI
0,1 ml	77,98	132,08
0,2 ml	61,90	148,16
0,3 ml	58,07	151,99
0,4 ml	51,99	158,07
0,5 ml	46,46	163,60



Şekil 4.11: Farklı hacimlerdeki (0,1-0,4 ml) Zerdali kayısı ekstraktı varlığında ve yokluğunda florojenik NIR-BS probunun emisyon spektrumu (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

Çalışılan kayısı örneklerine yapılan HSO_3^- katkıları sonucunda NIR esaslı florometrik yöntemle elde edilen bulgular çerçevesinde geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı incelenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Kayısı türlerine HSO_3^- katkıları ile elde edilen sonuçlar (N=3).

Hasanbey kayısı ekstraktına HSO_3^- katkısı	$C_{katkı}$ (µM)	2,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	2,54
	SD	0,08
	%RSD	3,15
	%Geri kazanım	101,80
	$C_{katkı}$ (µM)	7,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	8,01
	SD	0,21
	%RSD	2,62
	%Geri kazanım	106,71
Zerdali kayısı ekstraktına HSO_3^- katkısı	$C_{katkı}$ (µM)	2,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	2,46
	SD	0,11
	%RSD	4,47
	%Geri kazanım	98,45
	$C_{katkı}$ (µM)	7,50
	$C_{deneysel}$ (µM)	7,49
	SD	0,19
	%RSD	2,43
	%Geri kazanım	99,82

4.3. BAZI GIDALARDA VE İÇECEKLERDE REFERANS YÖNTEMLE BİSÜLFİT TAYİNİ

Referans yöntem olarak belirlenen DTNB yöntemiyle bazı şarap ve kayısı türlerinin HSO_3^- içeriklerini hesaplamak için bu kompleks örneklerin hacimlerine bağlı olarak reaksiyon ortamında oluşan sarı renkli TNB bileşiğinin 412 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. DTNB yöntemi, farklı konsantrasyonlarda HSO_3^- çözeltilerine uygulanarak HSO_3^- 'in kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. HSO_3^- için ilgili yöntemle elde edilen doğru denklemi:

$A= 69{,}67\, c_{HSO_3^-} + 0.38$ şeklindedir (r=0.992).

Bazı şarap türlerinin ve kayısı ekstraktlarının NIR esaslı florometrik yöntem ve DTNB yöntemleriyle elde edilen HSO_3^- içerikleri sırasıyla Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.9: NIR esaslı florometrik yöntem ve DTNB yöntemi ile bazı şarap örneklerinin HSO_3^- içerikleri.

Çalışılan Şarap Türleri	Florometrik yöntem (µM)	DTNB yöntemi (µM)
Kırmızı şarap-1	0,57 ± 0,04	0,54 ± 0,04
Kırmızı şarap-2	0,54 ± 0,05	0,52 ± 0,06
Beyaz şarap	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,03

Florometrik yöntem ve DTNB yöntemleri ANOVA testine gore karşılaştırılmıştır.
($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 0{,}43$, F_{kritik} (tablo) = 18,51, $F_{deneysel} < F_{kritik\ (tablo)}$)
Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{.95} \cdot s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).

Tablo 4.10: NIR esaslı florometrik yöntem ve DTNB yöntemi ile bazı kayısı türlerinin HSO_3^- içerikleri.

Çalışılan Kayısı Türleri	Florometrik yöntem (mg/g)	DTNB yöntemi (mg/g)
Hasanbey ekstraktı	2,52 ± 0,02	2,46 ± 0,04
Zerdali ekstraktı	2,64 ± 0,03	2,58 ± 0,02

Florometrik yöntem ve DTNB yöntemleri ANOVA testine gore karşılaştırılmıştır.
($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 1.27$, F_{kritik} (tablo) = 161,45, $F_{deneysel} < F_{kritik\ (tablo)}$)
Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{.95} \cdot s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, öncelikle HSO_3^- için yüksek seçimliliğe ve duyarlılığa sahip NIR esaslı florojenik prob (NIR-BS) sentezlenmiştir. NIR-BS probunun kapalı molekül formülü $C_{26}H_{26}NO_2I$ şeklindedir ve molekül ağırlığı 511.39 g/mol'dür. İlgili prob, daha önce literatürde NIR esaslı florojenik hücre içi pH probu olarak kullanılmıştır [ ]. Sonrasında bu probun ilk olarak kullanıldığı florometrik HSO_3^- tayin yöntemi geliştirilmiştir (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm). Geliştirilen bu yöntem, DTNB referans yöntemi ile karşılaştırmalı olarak bazı şarap ve kayısı türlerine uygulanmıştır.

NIR-BS probunun florometrik olarak (Tablo 4.1) molar emisyon (ekstinksiyon) katsayısı $1{,}08 \times 10^7$ $M^{-1}cm^{-1}$ olarak bulunmuştur (r=0,998). Lineer çalışma aralığı; 3,01-0,11 µM'dır. Geliştirilen NIR esaslı florometrik yönteme göre LOD ve LOQ değerler 0,045 ve 0,15 µM olarak hesaplanmıştır (LOD=3 s_{bl}/m ve LOQ=10 s_{bl}/m; s_{bl}: blank (referans) çözeltisinin standart sapması, m ise kalibrasyon eğrisinin eğimidir).

Micheal katılması olarak da adlandırılan ve alifatik C=C çift bağlarına nükleofilik katılmayı içeren reaksiyon mekanizmasına göre, HSO_3^-, prob molekül yapısındaki hemisiyanin ve ksanten bileşiklerini birbirine bağlayan C=C çifte bağlarına katılmakta ve mevcut konjugasyonu engellemektedir. Dolayısıyla başlangıçta floresans özellik gösteren probun intensitesi, HSO_3^- konsantrasyonuna bağlı olarak azalmaktadır (Şekil 4.1).

NIR-BS probunun, HSO_3^- varlığında ve yokluğunda intensite değerleri (λ_{em}= 720 nm) belirli zaman aralıklarında izlenerek inkübasyon işlemi için uygun süre 1,0 dk olarak belirlenmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü üzere oda koşullarında inkübasyon süresince her iki çözeltinin intensite değerlerinde belirgin bir değişim görülmemektedir. NIR-BS probu HSO_3^- ile çok hızlı katılma reaksiyonu vermektedir.

Sülfüroz asidinin birinci disosiyasyonuna ilişkin pK_a değeri 1,86 ve ikinci disosiyasyonuna ilişkin pK_a değeri 7,18'dir. Dolayısıyla pH 3-7 arasında baskın tür HSO_3^- iken pH 7'nin üzerinde baskın tür SO_3^{2-} iyonudur. HSO_3^-'in pK_a değeri ile uyumlu olacak şekilde maksimum floresans intensitesinin elde edildiği pH 6,0 yeni geliştirilen florojenik yöntemde optimal pH olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).

$$SO_2 + H_2O \; f \quad SO_2 \cdot H_2O$$
$$SO_2 \cdot H_2O \; f \quad HSO_2(OH) \; f \quad HSO_3^- + H^+$$
$$HSO_3^- \; f \quad H^+ + SO_3^{2-}$$

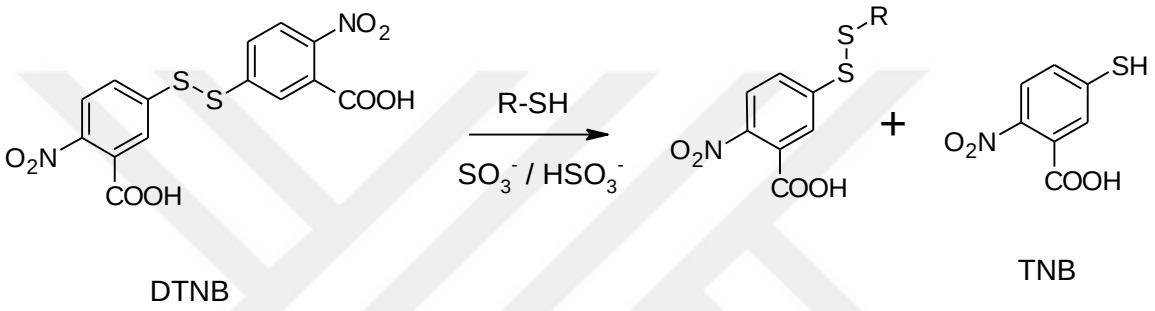
Bazı anyon ve biyotiyollerin (1,0 mM) olası interferans etkileri HSO_3^- ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.6'da görüldüğü üzere sadece kükürt içeren anyonların (SO_3^{2-} vb.) NIR-BS probu ile floresans intensitesinde çok küçük bir azalma görülmektedir. Bu durum, kükürtlü anyonların da HSO_3^- gibi benzer nükleofilik özelliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (C=C çifte bağına Michael katılma reaksiyonu). Sonuç olarak, NIR-BS probu, HSO_3^- için yüksek seçimliliğe sahiptir.

NIR esaslı florometrik yöntemin gerçek örneklere uygulanabilirliliğini göstermek amacıyla, geliştirilen yöntem üç farklı şarap örneğine (beyaz, kırmızı öküzgözü ve kırmızı sek şarap) uygulanarak herbir şarap örneğinin HSO_3^- içeriği belirlenmiştir (hacim-intensite değerleri: Tablo 4.2-4.4; ilgili emisyon spektrumları: Şekil 4.7-4.9'da verilmiştir). Benzer şekilde geliştirilen yöntem, iki farklı kayısı türüne (Hasanbey ve zerdali kayısısı) uygulanmış ve hacim-intensite değerleri: Tablo 4.6-4.7; ilgili emisyon spektrumları: Şekil 4.10-4.11'de verilmiştir (λ_{eks}=685 nm; λ_{em}=720 nm).

NIR-BS florojenik probunun kullanıldığı florometik yönteme göre, şarap örneklerinde HSO_3^- konsantrasyonu 0,36-0,57 µM aralığında; kayısı örneklerinde ise 2,52-2,64 mg/g aralığında bulunmuştur. Li [82] tarafından yapılan bir çalışmada benzer şekilde şarap içerisindeki HSO_3^- miktarını 0,54 µM olarak bulunmuştur. Sun ve diğ. [83] tarafından yapılan bir diğer çalışmada, 1:10 oranında seyreltilmiş ve içerisine 10 µM HSO_3^- katkısı yapılmış beyaz şarap örneklerindeki HSO_3^- miktarını 24,6 µM olarak rapor edilmiştir.

Geliştirilen yöntemin prezisyonu ve geri kazanımı için bazı seyreltik şarap örneklerine ve farklı iki türde kayısı ekstresine iki farklı konsantrasyon değerinde HSO_3^- standart katkısı yapılıp elde edilen bulgular sırasıyla Tablo 4.5 ve Tablo 4.8'de özetlenmiştir. Florometrik yöntemin preziyonu; test edilen konsantrasyon aralığında intensite ölçümünde %RSD (bağıl standart sapma) olarak verilmektedir ve şarap örnekleri (Tablo 4.5) için yaklaşık olarak %4.89 iken kayısı örnekleri (Tablo 4.8) için ise %4.47 şeklindedir. Diğer taraftan, yeni geliştirilen florometrik yöntemin %geri kazanımı, şarap örnekleri (Tablo 4.5) için 94,66-103,73 aralığında iken kayısı örnekleri (Tablo 4.8) için ise 98,45-106,71 aralığındadır.

Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB (5-5'-Ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit), ilk defa 1959 yılında George L. Ellman tarafından sentezlenip merkaptanların kantitatif analizinde kullanılmıştır. Ellman reaktifi, biyokimyasal örneklerde tiyollerin sayı ve konsantrasyonlarının belirlenmesinde spektrofotometrik bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Renksiz DTNB bileşiğinin alifatik tiyoller ve türev bileşikleriyle ile reaksiyonu sonucunda 412 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren sarı renkli TNB (5-tiyo-2-nitro benzoik asit) bileşiği oluşmaktadır [85]. Bu tez çalışmasında DTNB yöntemi, HSO_3^- tayini için referans yöntem olarak seçilmiştir.



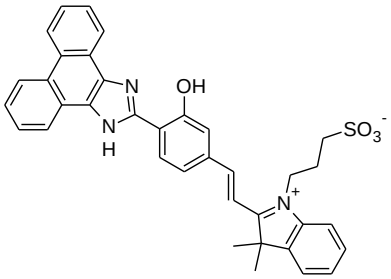
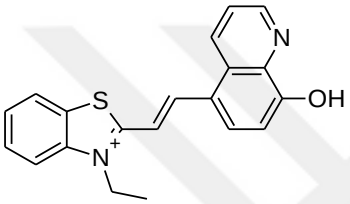
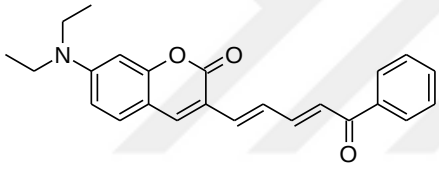
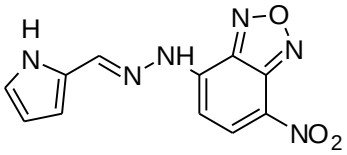
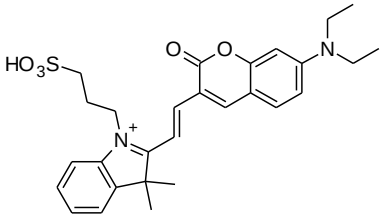
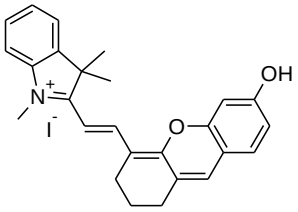
Şekil 4.17: DTNB'nin tiyol içeren bileşikler ile reaksiyonu sonucu TNB oluşumu.

DTNB reaktifinin SO_3^{2-} ile reaksiyonu sonucunda tiyollere benzer şekilde organik tiyosülfat ve TNB oluşmaktadır:

$$DTNB + SO_3^{2-} \rightarrow R\text{-}S\text{-}SO_3^- + TNB\ (\lambda_{max}=412\ nm)$$

Şarap örnekleri ve kayısı ekstreleri için islemler (gruplar)-arasında (between-treatments) (NIR esaslı florometrik ve DTNB yöntemlerine göre farklı ekstraktların HSO_3^- değerleri, sırasıyla Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir) ve artıkların (residuals) karelerinin-ortalamalarını (meansquares) içeren *F*-testinin uygulandıgı iki-yönlü varyans analizi (Analysis Of Variance (ANOVA)) [87] karşılaştırması sonucunda işlemler (gruplar) arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Diger taraftan, NIR esaslı florometrik yöntem ile DTNB yönteminden elde edilen bulgular, %95 güvenirlik düzeyinde benzerlik göstermektedir (Şarap örnekleri; P=0,05 için $F_{deneysel}$=0,43, $F_{kritik(tablo)}$ =18,51, $F_{deneysel}<F_{kritik(tablo)}$; Kayısı ekstreleri; P=0,05 için $F_{deneysel}$=1,27, $F_{kritik(tablo)}$=161,45, $F_{deneysel}<F_{kritik(tablo)}$). Sonuç olarak, geliştirilen NIR esaslı florometrik yöntem, DTNB referans yöntemine karşı valide edilmiştir. Literatürde yeralan bazı HSO_3^- problarının LOD değerleri NIR-BS probu ile karşılaştırmalı olarak Tablo 5.1'de verilmiştir.

Tablo 5.1: Literatürde HSO_3^- tayininde kullanılan bazı probların LOD değerleri.

Probun Molekül Formülü	Tespit Edilen LOD Değeri (µM)	Lineer Çalışma Aralığı (µM)	Referans
	0.21 µM	0–40	[81]
	0.68 µM	0,1-126	[82]
	0.23 µM.	0-210	[83]
	0.74 µM	0,52-215	[84]
	0.27 µM.	0,14-170	[85]
	**0,045 µM**	**3,01-0,11**	Bu tez çalışması.

Sonuç olarak, ilgili tez kapsamında ilk defa NIR esaslı florojenik prob (NIR-BS) kullanılarak HSO_3^- için yüksek duyarlılığa ve seçimliliğe sahip florometrik bir yöntem geliştirilmiştir.Geliştirilen bu yöntem, bazı şarap örneklerine ve kayısı ekstrelerine başarıyla uygulanmış ve referans yöntem olarak seçilen DTNB yöntemiyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Literatürdeki benzeri florojenik problarla mukayese edildiğinde özellikle duyarlılık açısından üstünlük getirmektedir. Geliştirilen prob, NIR esaslı olması açısından özellikle hücre içi HSO_3'in floresans veya konfokal görüntülemesinde de kolaylıkla kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

[1] Taylor, S.L., Higley, N.A. and Bush, R.K. 1986. Sulfites in foods: Uses, analytical methods, residues, fate exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity. Advances in Food Research, 30: 1-75.

[2] Wedzicha, B.L. 1992. Chemistry of sulphiting agents in food. Food Additives and Contaminants, 9: 390-97.

[3] Quattruocci, E. and Masci, V. 1992. Nutritional aspects of food preservatives. Food Additives and Contaminants, 9: 236-240.

[4] Vandevijvere, S., Temme, E., Andjelkovic, M., De Wil, M., Vinkx, C., Goeyens, L. and Van Loco, J. 2010. Estimate of intake of sulfites in the Belgian adult population. Food Additives and Contaminants, 27: 1072- 1083.

[5] Taylor, S.L. and Bush, R.K. 1986. Sulfites as food ingredients. Food Technology Journal. 47-52.

[6] Leclercq C. and Donne C. 1981. Sulfites: assessment of dietary exposure, sixtyninth meeting of the Joint FAO/WHO, Expert Committee on Food Additives (JECFA) Safety evaluation of certain food additives. Journal of Food Protection 44, 334-336.

[7] Burroughs L.F. 1975. Determining free sülfür dioxide in red wine. American Journal of Enology and Viticulture, 26: 25-29.

[8] Di Z. and Liu W., 2016. A novel rosamine-based fluorescent probe for bisulfite in aqueous solution. Environmental Research Letters, 6: 124-158

[9] Guangqin G., Wenjıe Z. , Guoyu Y. A novel fluorescent turn-on probe for bisulfite based on NBD chromophore JIN College of Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, P. R. China

[10] Green, L. F. 1976. Sulphur dioxide and food preservation-a review. Food Chemistry, 1: 103-124.

[11] Baker, G.J. and Allen, D. H. 1982. The spectrum of metabisulfite induced asthmatic reactions; their diagnosis and management. Australian and New Zealand medical Journal, 12, 213.

[12] Bush, R. , Taylor S. and Busse W., 1986. A critical evaluation of clinical trials in reactions to sulfites. Journal Allergy Clinical Immunol, 16 ,428- 473

[13] Howland C. and Simon, R. 1985. Restaurant-provoked asthma: Sulfite sensitivity . Journal Allergy Clinical Immunol. 75, 145.

[14] Hongda L. , Rapidly responsive and highly selective fluorescent probe for sülfite detection in real samples and living cells. Department of Forensic Chemistry. National Police University of China, Shenyang 110854

[15] Steve L. , Nancy A. , Bush T. , Sulfites In Foods: Uses, Analytıcal Yöntems, Resıdues, Fate, Exposure Assessment, Metabolısm, Toxıcıty, And Hypersensıtıvıty. Analyst , 63, 194-199

[16] Ripper, M. 1892. Die schweflige Saure im Weine und deren Bestimmung. Journal für Praktische Chemie 46,428- 473.

[17] Ponting, J. D., and Johnson, G. 1945. Determination of sulfur dioxide in fruits. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 17,4007-4016. 682-686.

[18] Vahl, J. M., and Converse, J. F. 1980. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: A collaborative study. Journal Association of Official Analytical Chemists , 63, 194-199.

[19] Monier-Williams, G. W. 1927. “Determination of Sulphur Dioxide in Foods.” Public Health and Medical Subjects, Great Britain Ministry of Health, London, , Rept. No. 43, 1-56

[20] Wedzicha, B. L., Lamikanra, O., Herrera, J. C., and Panahi, S . 1984. Recent developments in the understanding of the chemistry of sulphur(1V) oxospecies in dehydrated vegetables. Food Chemical 15, 141-155.

[21] Honvitz, W. (ed.) 1975. “Official Yöntems of Analysis,” , Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C. 12th Ed., pp. 336-338.

[22] Soh, N., Katayama, Y., Maeda, M., 2001, A fluorescent probe for monitoring nitric oxide production using a novel detection concept . Analyst, 126, 564-566.

[23] Wei L. , Jian H. , PR ChinaA novel mitochondria-targeted near-infrared fluorescence probe for ultrafast and ratiometric detection of SO_2 derivatives in live cells Hui Huang. Analyst 125, 489-496

[24] Nagano, T., 2010, Development of fluorescent probes for bioimagin applications. Proceedings of the Japan Academy , 86, 837-847.

[25] Warner C. , Daniels D. , Determination of free and reversibly bound sulphite in foods by reverse-phase, ion-pairing high-performance liquid chromatography 51(131), July 9, 25021-25026.

[26] Hecht, A., And Wıllıs, J., 1983, Sulfites: Preservatives That Can Go Wrong. Fda Consumer, September 11.

[27] Wedzıcha, B. L., 1984a, Sulphur Dioxide İn Foods Chemical İnteractions. Bnf Nutrition Bulletin, 9, 155-164.

[28] Green, L. F. 1976. Sulphur dioxide and food preservation-a review. Food Chemistry. 1, 103-124.

[29] Burroughs, L. F. 1975. Determining free sulfur dioxide in red wine. American Journal of Enology and Viticulture 26, 25-29.

[30] Burroughs, L. F. 1977. Kararlıity of patulin to sulfur dioxide and to yeast fermentation. Journal - Association of Official Analytical Chemists , 60, 100-103.

[31] Adachi, T., Nonogi, H., Fuke, T., Ikuzawa, M., Fujita, K., Izumi, T., Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Matsuki, Y., Suzuki, H., Toyoda, M., Ito, Y., and Iwaida, M. 1979. On the combination of sulphite with food ingredients (aldehydes, ketones, and sugars). Environmental Research Letters , 6 ,124-158

[32] Green, L. F. 1976. Sulphur dioxide and food preservation-a review. Food Chemisrty 1, 103-124.

[33] Means, G. E., and Feeney, R. E. 1971. “Chemical Modification of Proteins,” p. 152. Holden-Day, San Francisco.

[34] Thewlis, B. H., and Wade, P. 1974. An investigation into the fate of sulphites added to hard sweet biscuit doughs. Journal Science Food Agriculture , 25, 99-105.

[35] Yang. S. F. 1973. Destruction of tryptophan during the aerobic oxidation of sulfite ions. Environmental Research Letters , 6, 395-402.

[36] Schroeter, L. C. 1966. Sulfur Dioxide-Applications in Foods, Beverages, and Pharmaceuticals. Pergamon, American Journal of Enology and Viticulture, 34, 10-16.

[37] Walker, R., 1985, Sulphiting Agents İn Foods: Some Risk/Benefit Considerations. Food Additives And Comtaminants, 2, 5-24.

[38] Kaczka, E. A., Wolf, D. E., Kuehl, F. A., and Folkers, K. 1950. Vitamin BIZ: Reactions of cyanocobalamin and related compounds. Science 112, 354-355.

[39] Nir, I., Kafri, I., and Cohen, R. 1978. Effect of pelleting on the vitamin K activity of various vitamin K3 preparations in chicks , Poultry Science Journal , 57, 206-209.

[40] Shih, N. T., and Petering, D. H. 1973. Model reactions for the study of the interaction of sülfür dioxide with mammalian organisms. Biochemical and Biophysical Research Communications 55, 1319- 1325.

[41] Miiller, F., and Massey, V. 1969. Flavin-sulfite complexes and their structures , Journal Of Biological Chemistry , 244, 4007-4016.

[42] Lamikanra, 0. 1982. Sulfite-induced oxidation and browning of linolenic acid. Journal Food Science, 47, V.S.A. 77, 3715-3719. 97-160. 2025-2027, 2032.

[43] Hayatsu, H. 1976. Bisulfite modification of nucleic acids and their constituents, Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 16, 75-124.

[44] Shapiro, R., Welcher, M., Nelson, V., and DiFate, V. 1976. Reaction of uracil and thymine derivatives with sodium bisulfite. Studies on the mechanism and reduction of the adduct. Biochimica Et Biophysica Acta , 425, 115-124.

[45] Gunnison, A. F., Bresnahan, C. A., and Palmes, E. D. 1977. Comparative sulfite metabolism in the rat. rabbit, and rhesus monkey ,Toxicology and Applied Pharmacology 42, 99-109.

[46] Turchinsky, M. F., Kusova, K. S., and Budowsky, E. 1. 1974. Conversion of non-covalent interactions in nucleoproteins into covalent bonds: Bisulfite-induced formation of polynucleotideprotein crosslinks in MS2 bacteriophage virions. Febs Letters, 38, 304-308.

[47] Burroughs, L. F. 1975. Determining free sulfur dioxide in red wine. American Journal of Enology and Viticulture , 26, 25-29.

[48] Kaplan, D., McJilton, C., and Luchtel, D. 1975. Bisulfite induced lipid oxidation. Archives of Environmental Health 30, 507-509.

[49] Gilbert, J . , and McWeeny, D. J. 1976. The reactions of sulphur dioxide in dehydrated vegetables. Journal Science Food Agriculture , 27, 1145- 1146.

[50] Weingartner, K. E., Koburger, J. A., Oblinger, J. L., and Knapp, F. W. 1977. Residual bisulfite in iced Panaeus shrimp. Journal of Food Protection, 40, 234-235.

[51] Nelson, K. E. 1983. Effects of in-package sulfur dioxide generators, package liners, and temperature on decay and desiccation of table grapes. American Journal of Enology and Viticulture, 34, 10-16.

[52] Kingkate, A , , Jaengdawang, C., Chakrangkoon, P., Halilamian, C., and Toyoda, M. 1981. Residual sulfur dioxide in some Thai noodles . Journal of Food Protection 44, 334-336.

[53] Miyawaki, A., 2003, Visualization of the spatial and Dynamics of intracellular signaling, Developmental Cell , Vol 4, 295-305.

[54] Hong, H., Sun, J., Cai, W., 2009, Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases . Free Radical Biology And Medicine., 47, 684-698.

[55] Valeur, B., Leray, I., 2000, Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition . Coordination Chemistry Reviews, 205, 3-40.

[56] Kenmoku, S., Urano, Y., Kojima, H., Nagano, T., 2007, Development of a highly specific Rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis . Journal of the American Chemical Society, 129, 7313-7318.

[57] Wang H, Wu XM, Yang SX, Tian HY, Liu YG, Sun BG. A dual-site fluorescent probe for separate detection of hydrogen sulfide and bisulfite. Dyes Pigments 160: 757–764 (2019)

[58] Xiaohong C. , Hıizhen J. , Jun F. , 2013 , Reactive probe for hydrogen sülfite : Good ratiometric response and bioimaging application . Sensors and Actuators , 184 , 274 280

[59] Choi M.G , Hwang , J. , Eor , S., Chang ,S 2010 , Chromogenic and fluorogenic signaling of sülfite by selective deprotection of resorufin levulinate. Organic Letters, 12, 5624-5627

[60] Sun , Y. ,Zhong , C. , Gong , R. , Mu ,H. ,Fu E. , 2009 , A Ratiomeric Fluorescent Chemodosimeter With Selective Recognition For Sülfite İn Aqueous Solution European. Journal Of Organic Chemistry , 74,7943-7946

[61] Li H., 2015, Rapidly responsive and highly selective fluorescent probe for sulfite detection in real samples and living cells . Analytical Chimica Acta 897 102-108

[62] Yuan, L., Lin, W., Cao, Z., Long, L., Song, J., 2011, Photocontrollable analyteresponsive fluorescent probes: a photocaged copper-responsive fluorescence turnon probe, European. Journal Of Organic Chemistry , 17, 689-696.

[63] Yuan, L., Lin, W., Zheng, K., He, L., Huang, W., 2013, Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging. Chemical Society Reviews, 42, 622-661.

[64] Wang, B.L., Jiang, C., Li, K., Liu, Y.H., Xie, Y., Yu, X.Q., 2015, Molecular engineering of a dual emission near-infrared ratiometric fluorophore fort he detection of pH at the organism level. Analyst, 140, 4608-4615.

[65] Chen, H., Lin, W., Cui, H., Jiang, W., 2015, Development of uniqe xanthenecyanine fused near-infrared fluorescent fluorophores with superior chemical kararlıity for biological fluorescence imaging. European Journal Of Organic Chemistry., 21, 733-745.

[66] Guo, Z., Park, S., Yoon, J., Shin, I., 2014, Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. Chemical Society Reviews , 43, 16-29.

[67] Escobedo, J.O., Rusin, O., Lim, S., Strongin, R.M., 2010, NIR dyes for bioimaging applications. Organic Biomolecular Chemistry , 14, 64-70.

[68] Liu, W., Fan, C., Sun, R., Xu, Y.J., Ge, J.F., 2015, Near-infrared emission of dibenzoxanthenium and its application in the design of nitric oxide probes. Organic Biomolecular Chemistry, 13, 4532-4538.

[69] Han, J., Burgess, K., 2010, Fluorescent indicators for intracellular pH. Chemical Reviews, 110, 2709-2728.

[70] Shi, C., Wu, J.B., Pan, D., 2016, Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting and photodynamic therapy. Journal of Biomedical Optics., 21, 050901.

[71] Yang, X., Shi, C., Tong, R., Qian, W., Zhau, H.E., Whang, R., Zhu, G., Cheng, J., Yang, V.W., Cheng, T., Henary, M., Strekowski, L., Chung, L.W.K., 2010, Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging. Clinical Cancer Research., 16, 2833-2844.

[72] Kiyose, K., Aizawa, S., Sasaki, E., Kojima, H., Hanaoka, K., Terai, T., Urano, Y., Nagano, T., 2009, Molecular design strategies for near-infrared ratiometric fluorescent probes based on the unique spectral properties of aminocyanines. Chemistry – A European Journal, 15, 9191-9200.

[73] Wang, X., Lv, J., Yao, X., Li, Y., Huang, F., Li, M., Yang, J., Ruan, X., Tang, B., 2014, Screening and investigation of a cyanine fluorescent probe for simultaneous sensing of glutathione and cysteine under single excitation. Chemistry 50, 15439-15442.

[74] Yuan, L., Lin, W., Zhao, S., Gao, W., Chen, B., He, L., Zhu, S., 2012, A unique approach to development of near-infrared fluorescent sensors for in vivo imaging. Journal of Materials Chemistry, 134, 13510-13523.

[75] Li, Y., Wang, Y., Yang, S., Zhao, Y., Yuan, L., Zheng, J., Yang. R., 2015, Hemicyanine-based high resolution ratiometric near-infrared fluorescent probe for monitoring pH changes in vivo. Analitical Chemistry. 87, 2495-2503.

[76] Yang, Q., Jia, C., Chen, Q., Du, W., Zhang, Q., A NIR Fluorescent Probe for the Detection of Fluoride Ions and Its Application in in vivo Bioimaging. Journal of Materials Chemistry . B, 2017, 5, 2002-2009.

[77] Zhang, J., Wang, J., Liu, J., Ning, L., Zhu, X., Yu, B., Liu, X., Yao, X., Zhang, H., Near Infrared and Naked-Eye Fluorescence Probe for Direct and Highly Selective Detection of Cysteine and Its Application in Living Cells. Analitical Chemistry. 2015, 87, 4856-4863.

[78] Li, H., Yao, Q., Fan, J., Hu, C., Xu, F., Du, J., Wang, J., Peng, X., A Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of SO_2 Derivatives in Mitochondria of Living Cells. Industrial & Engineering Chemistry Research . 2016, 55, 1477-1483.

[79] Zhang, Y., Guan, L., Yu, H., Yan, Y., Du, L., Liu, Y., Sun, M., Huang, D., Wang, S., Reversible Fluorescent Probe for Selective Detection and Cell Imaging of Oxidative Stress Indicator Bisulfite. Analitical Chemistry. 2016, 88, 4426-4431.

[80] Sun, M., Yu, H., Zhang, K., Zhang, Y., Yan, Y., Huang, D., Wang, S., Determination of Gaseous Sulfur Dioxide and Its Derivatives via Fluorescence Enhancement Based on Cyanine Dye Functionalized Carbon Nanodots. Analitical Chemistry . 2014, 86, 9381-9385.

[81] Di Z. , Jun T. , Cheng C. , New phenanthroimidazole-based fluorescent probefor bisulfite and its application in living cell imaging, Journal of Luminescence, 15 September 2018, S0022-2313(18)31049-4

[82] Hongda L. , Rapidly A. , Responsive and highly selective fluorescent probe for sülfite detection in real samples and living cells Analytical Chimical Acta 897 (2015) 102-108

[83] Qian S., Weibing Z., Junhong Q. , A ratiometric fluorescence probe for selective detection of sulfite and its application in realistic samples .Talanta 162 (2017) 107–113

[84] Qiong Z., Yi Z., Shuangshuang D., Haiyan Z., Guoqiang F., A near-infrared fluorescent probe for rapid, colorimetric andratiometric detection of bisulfite in food, serum, and living cells. Sensors and Actuators B 211 (2015) 377–384

[85] Cameron S. and Ronald P. Schreck The Spectroscopic Determination of Aqueous Sulfite Using Ellman's Reagent Academy for the Advancement of Science and Technology, Hackensack, NJ 2003

[86] Baki S. Gıda maddelerinin toplam antioksidan kapasitelerin tayini için yeni bir elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi , İÜ Doktora Tezi , Mart 2016.

[87] Mıller, J.C., Mıller, J.N., Statistics for Analytical Chemists, 3rd ed., Ellis Horwood and Prentice Hall, New York and London, 1993.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	MEHMET BAYKARA
Doğum Yeri	MALATYA
Doğum Tarihi	06.05.1990
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	05385669745
E-Posta Adresi	mehmetbaykara34@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ
Bölümü	KİMYA
Mezuniyet Yılı	2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya

Makale ve Bildiriler