



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİNDE
ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ**

Gülsüm ÇİÇEK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK**

**II. DANIŞMAN
Arş. Gör. Dr. Esin AKYÜZ**

**Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

İSTANBUL-2022

Bu çalışma 5 Ocak 2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr. Aslı Baysal
İstanbul Aydın Üniversitesi
Sağık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

Doç.Dr SALİHA ESİN ÇELİK
istanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede 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.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve karşılaştığım problemlerin çözümünde desteğini esirgemeyen, danışman hocam Prof.Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e,

Yardımlarından dolayı, ikinci tez danışmanın olan Arş. Gör. Dr. Esin AKYÜZ'e,

Laboratuvar çalışması sırasında sorularıma içtenlikle cevap veren çalışmalarında bana çok yardımcı olan Öğr. Gör. Ayşe Nur ÖNEM'e ve yüksek kimyager Mehmet KILINÇER'e.

Desteklerini hissettiğim Feyza Nur EKŞİ ve Rabia Nur BULDUK'a,

Bugüne kadar bana emeği geçen bütün hocalarıma,

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıkları ile çalışma azmimi artıran, değerli babama, anneme ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Ocak 2022

Gülsüm ÇİÇEK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ	1
1.1. PROBLEM TESPİTİ	2
1.2. TEZİN AMACI	2
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ	4
2.2. HATA VE BELİRSİZLİK	5
2.3. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN HESAPLANMASINA DAİR YAKLAŞIMLAR ...	6
2.3.1. Aşağıdan Yukarı (Bottom-up) Yaklaşımı	6
2.3.1.1. Ölçülen Büyüklüğün Belirlenmesi	6
2.3.1.2. Belirsizlik Kaynaklarının Belirlenmesi	7
2.3.1.3. Belirsizlik Kaynaklarının Tanımlanması	9
2.3.1.4. Bileşik Belirsizlik	13
2.3.1.5. Genişletilmiş Belirsizlik	14
2.4. ANTİOKSİDANLAR	14
2.4.1. HAT Esaslı Yöntemler	15
2.4.1.1. ORAC Yöntemi	16
2.4.1.2. TRAP Yöntemi	16
2.4.1.3. Krosin Beyazlatma Yöntemi	16
2.4.2. ET Esaslı Yöntemler	16
2.4.2.1. ABTS/TEAC Yöntemi	17

2.4.2.2. FRAP Yöntemi	17
2.4.2.3. CUPRAC Yöntemi	18
2.4.2.4. DPPH Yöntemi	19
2.5. LİTERATÜR ÇALIŞMASI	20
3. MALZEME VE YÖNTEM	21
3.1. KULLANILAN MALZEMELER	21
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	21
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	21
3.2. KULLANILAN YÖNTEM	22
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	22
3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması	22
3.2.2.1. CUPRAC Yöntemi	22
3.2.2.2. DPPH Yöntemi	23
3.2.3. TAC Yöntemlerinin Gerçek Örneğe Uygulanması	23
3.2.3.1. CUPRAC Yönteminin Elma Suyu Örneğine Uygulanması	23
3.2.3.2. DPPH Yönteminin Elma Suyu Örneğine Uygulanması	24
3.2.4. CUPRAC ve DPPH Yöntemlerinin Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanması	24
3.2.4.1. CUPRAC Yöntemi için Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanması	24
3.2.4.2. DPPH Yöntemi için Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanması	24
4. BULGULAR	26
4.1. CUPRAC VE DPPH YÖNTEMLERİNDE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	26
4.1.1. Referans Standart Çözeltisi Troloks (C_{TR}) ile İlgili Belirsizlik, u_{sr}	27
4.1.1.1. Mikropipet Hacmindeki Belirsizlik, u_{sr1}	27
4.1.1.2. Balon joje Hacmindeki Belirsizlik, u_{sr2}	29
4.1.1.3. Referans Standart Çözeltisi Troloks'un Son Konsantrasyonundaki Belirsizlik, u_{sr3}	30
4.1.2. Kalibrasyon Eğrisi İle İlgili Belirsizlik, u_{cr}	31
4.1.3. Kesinlikle İle İlgili Belirsizlik, u_{pr}	33
4.1.4. Geri Kazanımla İle İlgili Belirsizlik, u_{rr}	38
4.1.5. pH İle İlgili Belirsizlik, u_{pH}	39
4.1.6. Sıcaklıkla İle İlgili Belirsizlik, $u_{r(T)}$	40

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	41
KAYNAKLAR	45



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Balık kılçığı (fishbone) diyagram örneği	8
Şekil 2.2: Normal dağılım	12
Şekil 2.3: Dikdörtgen dağılım	12
Şekil 2.4: Üçgen dağılım	13
Şekil 2.5: CUPRAC reaktifi ile antioksidan arasındaki reaksiyonun moleküler gösterimi	18
Şekil 2.6: DPPH reaktifi ile antioksidan arasındaki reaksiyonun moleküler gösterimi	19
Şekil 4.1: CUPRAC ve DPPH yöntemlerine göre TAC ölçümünde potansiyel belirsizlik kaynaklarının belirlenmesinde fishbone diyagramı	26
Şekil 4.2: Troloks standartının DPPH ve CUPRAC yöntemlerine göre kalibrasyon eğrileri	31
Şekil 4.3: var (Xo): Xo ile ilgili varyans formülü	32
Şekil 5.1: CUPRAC yönteminin belirsizlik diyagramı	43
Şekil 5.2: DPPH yönteminin belirsizlik diyagramı	43

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 4.1: Standart çözeltisi troloksun konsantrasyonu ile ilgili belirsizliklerin katkıları	30
Tablo 4.2: CUPRAC yöntemi ile elma sularında TAC değerleri	33
Tablo 4.3: DPPH yöntemi ile elma suyunda TAC değerleri	34
Tablo 4.4: CUPRAC metodu kullanarak elma suyu sonuçlarının istatistikleri, tek yönlü ANOVA	37
Tablo 4.5: DPPH metodu kullanarak elma suyu sonuçlarının istatistikleri, tek yönlü ANOVA ...	38
Tablo 4.6: CUPRAC yöntemi ile geri kazanım değerleri	39
Tablo 4.7: DPPH yöntemi ile geri kazanım değerleri.....	39
Tablo 5.1: Eurachem klavuzuna göre spektrofotometrik CUPRAC-TAC ölçümlerindeki bireysel ve genişletilmiş belirsizlikler	42
Tablo 5.2: Eurachem klavuzuna göre spektrofotometrik DPPH-TAC ölçümlerindeki bireysel ve genişletilmiş belirsizlikler	42

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
s, α	: Standart sapma
$u(x)$	: Belirsizlik
n	: Ölçüm sayısı
k	: Kapasite faktörü
u_c	: Standart sapma
U	: Genişletilmiş belirsizlik
C_{TR}	: Troloks konsantrasyonu
A	: Absorbans
$\cdot OH$	: Hidroksil radikali
m	: Kütle, miktar
p	: Safılık
v	: Hacim
C_{exp}	: Ölçüm sonucu bulunan değer
$C_{tab.}$	: Tablo değeri
Nc	: Neokuproin
ΔA	: Absorbans farkı

Kısaltmalar	Açıklama
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
TR	: Troloks
TAA	: Toplam antioksidan aktivite
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
ET	: Elektron transferi
HAT	: Hidrojen atom transferi
$ORAC$	: Oksijen radikal absorbans kapasitesi
$TRAP$	: Toplam radikal tutma parametresi

FRAP	: Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal söndürücü kapasite
AAPH	: 2,2'-Azobis (2-aminopropan) dihidroklorit
ABTS	: 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
VIM	: Uluslararası metroloji sözlüğü (<i>eng.</i> International vocabulary of metrology)
GUM	: Ölçüm belirsizliği ifade klavuzu (<i>eng.</i> Guide to the expression of uncertainty in measurement)
AOX, AOXH	: Antioksidan
AOC	: Antioksidan kapasite



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE YÖNTEMLERİNDE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ

Gülsüm ÇİÇEK

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

II. Danışman: Arş. Gör. Dr. Esin AKYÜZ

Ölçüm belirsizliği, bir analiz sonucunun dağılım seviyesini göstermek için kullanılan bir kalite göstergesidir. Belirsizlik tahmininin temel ilkesinde, yöntem doğrulaması sırasında prosedürde bulunan tüm olası hataların ilk tanımlanmasını içerir. Ardından bireysel hata bileşenlerinin nicelleştirilmesini ve tüm bileşenlerin toplamını içerir. İstenilen güven seviyesinde, genişletilmiş belirsizlik hesaplanır.

Çalışmanın amacı, bir yerel ticari elma suyunda CUPRAC ve DPPH yöntemlerini kullanarak toplam antioksidan kapasitesindeki (TAC) belirsizliğin hesaplanmasıdır. Tekrarlanabilirlik, geri kazanım, kalibrasyon eğrisi, standart troluks (TR) çözeltisinin konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve redoks faktörü gibi belirsizlikler bireysel kaynaklar olarak dikkate alınmıştır. Standart belirsizlik, toplam standart C_{TR} için $u_r C_{TR} = 0.0184$ olarak hesaplanmıştır. CUPRAC ve DPPH yöntemleri uygulanarak elde edilen genişletilmiş belirsizlikler, %95 güven seviyesinde ($k=2$) sırasıyla $\pm 0.0218 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ve $\pm 0.0204 \mu\text{mol.L}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Ocak 2022, 59 sayfa.

Anahtar kelimeler: Belirsizlik Parametreleri, Ölçüm Belirsizliği, Toplam Antioksidan Kapasite, CUPRAC Yöntemi, DPPH Yöntemi.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

MEASUREMENT UNCERTAINTY IN SOME TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY METHODS

Gülsüm ÇİÇEK

İstanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Co-Supervisor: Arş. Gör. Dr. Esin AKYZ

The measurement uncertainty is a quality indicator used to demonstrate the distribution level of an analysis result. In the basic principle of the estimate of uncertainty, the first identification of all possible errors in the procedure during the method verification. Then contains the quantification of individual error components and the sum of all components. Extended uncertainty is calculated at the confidence level of trust.

The aim of the study is to calculate uncertainty in total antioxidant capacity (TAC) using CUPRAC and DPPH methods in a local commercial apple juice. The uncertainties such as reproducibility, recovery, calibration curve, the concentration of standard trolox (TR) solution, pH, temperature and redox factor were taken into consideration as individual resources. The total standard C_{TR} of the standard uncertainty is calculated as $u_r C_{TR} = 0.0184$. The extended uncertainties with respect to the CUPRAC and DPPH methods have been found in 95% confidence level ($k=2$), as $\pm 0.0218 \mu\text{mol.L}^{-1}$ and $\pm 0.0204 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively.

Ocak 2022, 59 pages.

Keywords: Uncertainty Parameters, Measurement Uncertainty, Total Antioxidant Capacity, CUPRAC Method, DPPH Method.

1. GİRİŞ

Aerobik metabolizmanın bir yan ürünü olarak üretilen reaktif oksijen/azot türleri (ROS/RNS), biyolojik ve biyokimyasal işlemlerde, hücre sinyali transdüksiyonu ve homeostazında kilit bir rol oynar. Çevresel basınç altında, ROS seviyelerindeki önemli bir artış, oksidatif strese ve/veya DNA temelli kanser tümör büyümesine, mutajenik değişikliklere yada nörolojik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabilir [1; 2]. Oksidatif stres, bir organizmada moleküler hasara ve redoks sinyalinin kesilmesine neden olan oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik durumudur ve sağlıklı beslenme düzenleri nedeniyle birçok metabolik bozuklukla ilişkilendirilmiş ve antioksidan alımının uygun şekilde artırarak azaltılabilir olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, oksidatif stresi düzenlemek hücre ve doku homeostazını korumak, inflamasyonu ve kronik metabolik hastalıkların önlenmesi için sağlıklı bir diyet yönteminin uygulanması oldukça önemlidir. Gıda antioksidanları bu önemli hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır, buna bağlı olarak toplam antioksidan aktivite/kapasite (TAA/TAC) gibi ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. TAC analizleri genel olarak, elektron transferi (ET) ve hidrojen atomu transferi (HAT) esaslı olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemlerden başlıcaları; peroksil radikalının süpürmesi (ORAC, TRAP), metal iyonun indirgenmesi (FRAP, CUPRAC) ve organik radikal süpürmesi (ABTS, DPPH) esaslı yöntemlerdir [3; 4].

Bu çalışmada kullanılan yöntemlerden biri olan CUPRAC yöntemi, plazma antioksidanları, gıda polifenoller, flavonoidler, C ve E vitaminleri için basit ve geniş alanda uygulanabilir bir TAC belirleme yöntemidir ve bu yöntemde kromojenik bir oksidan olarak Cu(II)-Nc reaktifi kullanılmaktadır [5]. Bu reaktif, stabil, ucuz, kolay temin edilebilir ve hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara karşı duyarlıdır. CUPRAC yönteminde bir antioksidan bileşik varlığında bis(neokuproin) bakır(II) ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{+2}$) katyonun 450 nm’de maksimum absorbans

veren turuncu-sarı renkli bis(neokuproin) bakır(I) ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$) indirgenmesi ölçülür [6]. Test kapsamında, tercih edilen DPPH yöntemi, doğal ekstraktların TAC'ının ölçülmesi, antioksidan molekülünün serbest radikal süpürme potansiyelinin değerlendirilmesi ve saf bileşiklerin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için kolay ve standart kolorimetrik yöntemlerden biridir [7; 8]. DPPH, koyu mor bir renk ve 515-520 nm dalgaboyu aralığında güçlü bir absorban bandı sunan stabil bir serbest radikaldir. Antioksidan bileşiklerin varlığında, DPPH, antioksidan süpürücü molekülden bir elektron veya hidrojen atomunu kabul edebilir. İndirgenmiş DPPH formu soluk sarı renktedir ve antioksidan bileşik varlığında spektrofotometrik olarak renk değişimini inceleyerek antioksidan kapasiteyi belirlemek mümkündür [9].

Belirsizlik, ölçüm büyüklüğüne atfedilme olasılığı olan değerler ile bir ölçüm sonucu veya bir test sonucu ile birlikte verilen değerleri içeren bir aralıktır. 20. yüzyılın başlarında ortaya çıkan ölçüm belirsizliğinin paradigması, belirsizliğin dezavantaj olmadığını, ölçüm sonucunda bir parçası olduğunu iddia etmektedir. Ölçüm belirsizliği terimi, sonucun gerçek değeri ve sonucu etkileyen faktörler hakkındaki bilgileri kapsar. Ölçümün belirsizliğini tahmin etmek için sistematik ve rastgele hatalar belirlenmeli ve her bir ana bileşenin ölçüm belirsizliği üzerindeki etkisi uygun yöntemlerle tespit edilmelidir. Ölçüm belirsizliği, elde edilen bir sonucun nicel bir göstergesidir. Diğer bir ifadeyle, sonucun gerçek değeri hangi ölçüde temsil ettiğini gösterir [10; 11].

1.1. PROBLEM TESPİTİ

Yapılan literatür çalışmalarında ölçüm belirsizliği ile ilgili olarak antioksidan yöntemleri alanlarında sınırlı sayıda yayın olması.

1.2. TEZİN AMACI

Bu çalışmada TAC yöntemlerinde, ölçüm belirsizliğinin hesaplanmasındaki parametrelerin belirlenmesi ve bu parametrelerin bireysel bileşenlerindeki standart belirsizliğinin

hesaplanması hedeflenmiştir. Bu nedenden dolayı, CUPRAC ve DPPH yöntemlerinin uygulanarak elma suyundaki TAC'ın ölçüm belirsizliğinin belirlenmesi amaçlamaktadır. CUPRAC ve DPPH yöntemlerinin her ikisi de: ölçüm prosedürünün basit, hızlı ve ucuz olması ve geniş alanda uygulanan yöntemler olması nedenleriyle bu tez kapsamında seçilmiştir.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ

Ölçüm belirsizliği, ölçülen miktar ile ilişkili olarak saptanabilecek olasılıkların dağılımını göstermektedir (kimyasal analizde genelde, ölçüm bir analitin konsantrasyonudur. Ancak, kimyasal analizde diğer miktarları ölçmek için de, örneğin renk, pH vb., "ölçüm" genel terimi kullanılmaktadır.) Bu nedenle ölçüm sonucu verilirken ölçülen veya hesaplanan değerin belirsizliği de birlikte verilmelidir. Uluslararası Metroloji Sözlüğüne (International vocabulary of metrology, VIM) göre ölçüm belirsizliği, bilginin kullanımına bağlı olarak ölçülene atfedilen miktar değerlerinin dağılımını karakterize eden bir parametredir. Ölçüm Belirsizliği İfade Kılavuzu'na (The Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, GUM) göre ise ölçüm sonucu ile birlikte raporlanan ve ölçüm sonucuna atfedilebilecek olasılıkların dağılımını gösteren bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Benzer şekilde ölçülen bir büyüklüğün değerini kapsayan aralık olarak da tanımlanan istatistiksel bir parametre şeklinde ifade edilmektedir. Parametre, standart sapma veya bir güven aralığı genişliği olabilir. Ölçüm belirsizliği birçok bileşenden oluştuğu gibi bu bileşenlerden bazıları, ölçüm sonuçlarının istatistiksel dağılımından değerlendirilir ve standart sapma ile karakterize edilir. Standart sapma ile de karakterize edilebilecek diğer bileşenler, tecrübe ve diğer bilgilere göre varsayımsal olasılık dağılımları ile değerlendirilir. Genel kullanımda belirsizlik kelimesi “şüphe” ile ilgilidir. Ölçüm belirsizliği, bir ölçümün geçerliliği hakkında şüphe duymaz. Aksine, belirsizlik bilgisi, bir ölçüm sonucunun geçerliliğine daha fazla güven artması anlamına gelir [10; 12; 13]. Ölçüm belirsizliği, her ölçüm sonucu ile beraber verilmesi gereken bir parametredir. Analizin güven düzeyini yansıtır. Böylece sonucu kullanarak ölçümün kalitesi hakkında bilgi verir, sonucun gerçek değeri ne ölçüde temsil ettiğini gösterir. Laboratuvarlar, kendi koşullarında tüm belirsizlik kaynaklarını sistematik olarak inceleyip, belirsizlik değerlerini ölçüm sonucu ile birlikte rapor etmelidir. Ölçülen her

büyüklik değeri ölçümden ölçüme farklı bulunabilir. Bulunan ölçüm sonucu, yaklaşık veya tahmini bir değerdir. Ölçüm belirsizliği analizlerin analitik hassasiyetini ve analizin tekrar yapıldığında beklenen değişikliğin kantitatif tahminini sağlar. Dolayısıyla ölçüm işlemi, ölçüm sonucunun belirli bir güven aralığında ölçüm belirsizliği ile beraber verildiğinde tamamlanmış olur. Ölçüm belirsizliğini ifade etmek için iki sayı gereklidir. Bunlardan biri aralık değeri de güven seviyesidir. Ölçüm sonucu $(x) \pm$ genişletilmiş ölçüm belirsizliği (U) olarak rapor edilmelidir [14; 15].

$$x \pm U \quad (2.1)$$

Bileşik belirsizliği hesaplamadan önce tüm belirsizlik katkıları standart belirsizlikler olarak yani standart sapmalar olarak ifade edilmelidir. Bunun için de belirsizlik türünün hangi dağılıma ait olduğuna karar verilmelidir.

2.2. HATA VE BELİRSİZLİK

Hata ve belirsizlik birbirinden farklı terimlerdir. Hata, bireysel bir sonuç ile ölçümün gerçek değeri arasındaki fark olarak tanımlanır. Diğer bir ifade ile hata, ölçülen değer ile ölçümün gerçek değeri arasındaki farktır. Bu nedenle, hata, teorik veya gözlemlenen tek bir değerdir ve prensip olarak, saptanan hata değeri ölçülen sonuca düzeltilmiş şekilde uygulanabilir. Ayrıca farkı açıklamak için, ölçüm değerine çok yakın olarak düzeltilen analiz sonucunda hata ihmal edilebilir. Belirsizlik, ölçüm sonucu hakkındaki şüphenin bir miktarıdır. Öte yandan belirsizlik bir aralık verir. Genel olarak, belirsizliğin değeri bir ölçüm sonucunu düzeltmek için kullanılamaz. Ölçüm sonucundaki belirsizlik, ne hatayı temsil eder, ne de düzeltildikten sonra kalan hata olarak yorumlanmamalıdır [15; 16].

2.3. ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN HESAPLANMASINA DAİR YAKLAŞIMLAR

Ölçüm belirsizliği hesaplanmasında *aşağıdan yukarı* ve *yukarıdan aşağı* olmak üzere iki ana yaklaşım söz konusudur. GUM'a göre uyarlanmış olan Eurachem rehberi *aşağıdan yukarı* yaklaşımına göre belirsizlik hesaplaması yapmaktadır. Bu yaklaşımda her bir potansiyel belirsizlik kaynağı belirlenir, somut bir hale getirilir ve ölçüm kapsamlı bir şekilde incelenir. İstatistiksel dağılım kurallarının kullanıldığı bu yaklaşımda son olarak belirlenen belirsizliklerden birleşik belirsizlik ve güven seviyesine göre genişletilmiş belirsizlik değeri elde edilir. Yukarıdan aşağı yaklaşımında ise yöntem validasyonu, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası veriler gibi mevcut laboratuvar test performans bilgilerinin kullanıldığı bir yöntem izlenmektedir [10; 17].

2.3.1. Aşağıdan Yukarı (Bottom-up) Yaklaşımı

Bu aşama Eurachem/CITAC ve GUM klavuzlarından yararlanılarak yazılmıştır [10; 11; 18]. Aşağıdan yukarı yaklaşımında ölçüm belirsizliğini hesaplama basamakları şu sırayla gerçekleşmektedir:

- Ölçülen büyüklüğün belirlenmesi,
- Belirsizlik kaynaklarının belirlenmesi,
- Belirsizlik kaynaklarının tanımlanması,
- Birleşik standart belirsizlik (u_c)'in hesaplanması,
- Genişletilmiş belirsizlik (U)'in hesaplanması,

2.3.1.1. Ölçülen Büyüklüğün Belirlenmesi

Ölçüm, bir niceliğin değerini deneysel olarak elde etme sürecidir. İlk önce belirsizlik tahmini yapılacak olan ölçüm belirlenmelidir. Bu işlem, belirsizlik analizinin sınırlarının belirlenmesini kolaylaştırır.

Ölçümün belirlenmesi için;

- Kullanılacak ölçüm yöntemi veya prosedür,
- Ölçüm yapılan değer,
- Kullanılacak ekipman,
- Hesaplama yöntemi seçilir.

2.3.1.2. Belirsizlik Kaynaklarının Belirlenmesi

Ölçme belirsizliği, ölçülen değerlerin belirli bir olasılıkta ortalama değer etrafında dağıldığı aralık olarak da tanımlanır. Belirsizlik bir rakam olarak ya da mutlak veya göreceli olarak da verilebilir. Ölçüm sonucunda verilen belirsizlik ifadesi, ölçülen değerin kesin olarak bilinmemesinden kaynaklanır. Ölçüm sonucu tüm bilinen hataların sistematik hataları ele alındıktan sonra bile, rastgele hatalar içerir ve sistematik hatalar düzeltilse de hala ölçülen değerin bir tahminidir. Pratikte, sonuçtaki belirsizlik birçok olası kaynaktan doğabilir.

Bunlardan bazıları aşağıdaki gibidir;

- Ölçülen değerin tanımlanmasındaki eksiklik,
- Matriks etkisi,
- Aynı koşullarda tekrarlanan ölçümlerde, ölçülen değerlerin farklılıklar göstermesi,
- Hazırlanan standart ve referans malzemelerin değerlerinin tam olarak bilinmemesi,
- Kütle ve hacim ekipmanlarındaki belirsizlikler,
- Ekipman kalibrasyonu,
- Tekrarlanan ölçümlerde farklı sonuçlar elde edilmesi,
- Örnek analizinin sonuçlarının yorumlanması.

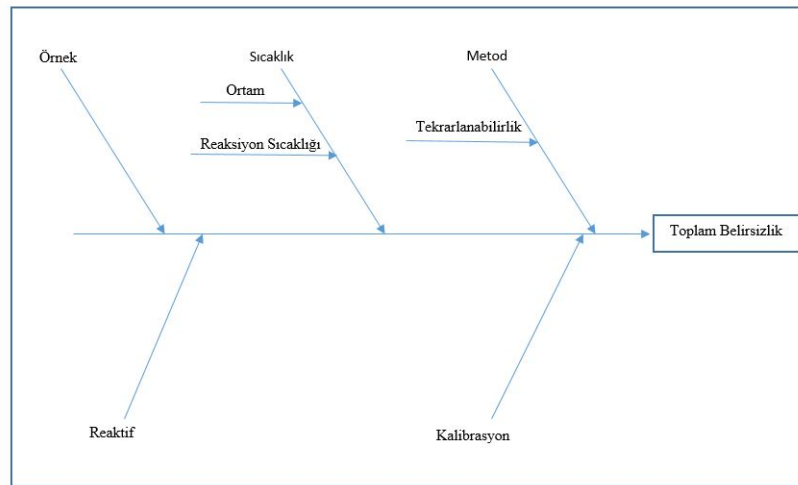
Belirsizlik kaynakları tanımladıktan sonra bunları ölçmek için veri toplanması ve analiz edilmesi gerekir. Kimyasal analizler gerçekleştirilirken kullanılan ekipmana ilişkin

belirsizliği ilk olarak tahmin edilmesi gerekir. Örneğin, belirli bir derişimde numune hazırlanmasında analitik terazi, balon joje ve pipet kullanılıyorsa, numune hazırlanması sürecinde belirsizliği tahmin etmeden önce kullanılan bu ekipmanların belirsizlikleri bilinmelidir.

Belirsizlik kaynaklarının belirlenmesi için;

- Analiz yöntemi ve ölçüm süreci değerlendirilir,
- Ekipman, referans standartlar ve reaktifler değerlendirilir,
- Minimum gerekli belirsizlik kaynakları tanımlanır,
- Çeşitli bilgi kaynakları araştırılır,
- Bir uzmana danışılır.

Kaynaklar belirlenirken yöntemi etkileyecek tüm parametreler eklenmelidir. Belirsizlik kaynaklarının ana birimleri, belirsizlik hesabında kullanılan tüm bileşenlerdir. Bu bileşenleri etkileyen tüm alt bileşenler de belirsizlik kaynağı olarak tanımlanmalıdır. Bu kaynakları belirlemek için balık kılçığı (fishbone) (Şekil 2.1) diyagramı kullanılmaktadır.



Şekil 2.1: Balık kılçığı (fishbone) diyagram örneği

2.3.1.3. Belirsizlik Kaynaklarının Tanımlanması

Tüm belirsizlik kaynakları belirlenip nicelleştirildikten sonra her biri uygun bir belirsizlik türü ve olasılık dağılımı ile karakterize edilmelidir.

- Her bir belirsizlik kaynağı bir sınıflandırmaya atanır: Tip A veya Tip B,
- Her belirsizlik bileşeni bir olasılık dağılımına atanır.

A) Belirsizlik Tipleri

A tipi belirsizlik ve B tipi belirsizlik olmak üzere iki tip belirsizlik vardır.

1. A Tipi Belirsizlik

VIM'e göre A Tipi belirsizlik, tanımlanmış ölçüm koşulları altında elde edilen ölçülen büyüklük değerlerinin istatistiksel analiziyle ölçüm belirsizliğinin bir bileşeninin değerlendirilmesidir.

A tipi belirsizlik, ortalamanın standart sapmasıdır. Tekrarlanan okumadan oluşan bir dizi ortalama ve tahmini standart sapma hesaplanır. Tekrarlanan ölçüm sonuçlarından rastgele hata sebebiyle aynı sonuçlar elde edilemez ancak birbirine yakın sonuçlar elde edilebilir. Bu sonuçların aritmetik ortalama değerinden farkları ölçüm belirsizliğini vermektedir. Elde edilen ölçüm sonuçları birbirine ne kadar yakınsa ölçüm belirsizliği de o derece küçüktür.

$$u(x) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2.2)$$

s:standart sapma n:ölçüm sayısı u(x):ölçüm belirsizliği

2. B Tipi Belirsizlik

VIM'e göre B Tipi belirsizlik, A Tipi ölçüm belirsizliği değerlendirmesi dışındaki yöntemlerle belirlenen bir ölçüm belirsizliği bileşeninin değerlendirilmesidir. B tipi belirsizlik, ölçümde kullanılan enstrümanlar ile ilişkilidir. B tipi belirsizlik;

- Önceki ölçüm verileri,
- Davranış ve özellikleri hakkında deneyim veya genel bilgi,
- İlgili materyaller ve aletler,
- Üreticinin özellikleri,
- Kalibrasyonda verilen veriler,
- El kitaplarından alınan referans verilerine atanan belirsizliklerdir.

B tipi belirsizlik istatistiksel olmayan prosedürlerle elde edilir ve bu belirsizlik sınıfında onaylı bir referans materyalin sayısal değerleri veya kalibrasyon sertifikasından sağlanan veriler kullanılır. Ayrıca mesleki deneyimler sonucu ya da daha önceden hesaplanan bir belirsizlik değeri operatör tarafından bir belirsizlik hesabına eklenebilir, tip B belirsizliği olarak değerlendirilir ve ilgili standart sapma standart belirsizliğe ($u(x)$) dönüştürülür. Bunun için operatör elde ettiği bu bilginin hangi istatistiksel dağılıma sahip olması gerektiğini ve standart belirsizliğe dönüştürürken seçilen olasılık dağılımına göre hesaplamaya katmalıdır.

B) İstatistiksel Dağılım Türleri (Olasılık Dağılımı)

Olasılık dağılımı seçimi önemli bir adımdır, çünkü seçilen olasılık dağılımı bir sonraki adımda belirsizlik kaynağının nasıl standart sapmaya dönüştürüleceğini belirleyecektir. En çok kullanılan olasılık dağılımları, normal (yani Gauss), üçgen ve dikdörtgen dağılımlarıdır.

1. Normal (Gauss) Dağılım

Normal dağılım, aritmetik ortalama ve standart sapma ile ifade edilir. Bu dağılım (–) sonsuz ve (+) sonsuz arasında tanımlanır ve tepe noktası aritmetik ortalama etrafında ortalandığı, standart sapmaya göre dağıldığı ve simetrik çan şeklinde bir grafik olarak rastgele değişkenlerin dağılımını temsil eden fonksiyondur (Şekil2.2). Bu dağılım türü, A Tipi verileri değerlendirmek için çok sık kullanılan olasılık dağılımıdır. A Tipi verilerin ne olduğunu hatırlarsak, kararlılık testi ve tekrarlanabilirlik gibi deneysel testlerden toplanan verilerdir. Bu dağılım aşağıdaki koşullarda kullanılır;

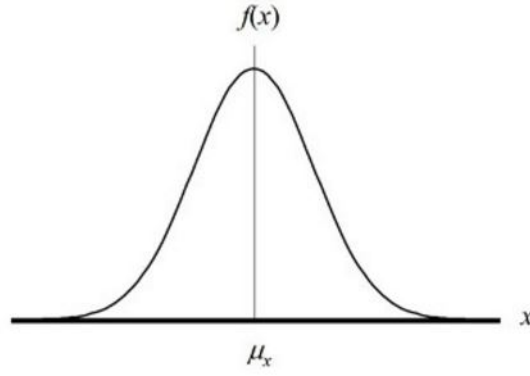
- Kaynağı bilinen,
- Belirsizlik, dağılım türünün ne olduğu belirtilmeden standart sapma, bağıl standart sapma veya varyasyon katsayısı şeklinde verilmiş ise,
- Ölçüm belirsizliği, güven aralığı verildiğinde.

Normal dağılımda belirsizlik hesaplanmasında kapasite (k) faktörü kullanılarak standart belirsizlik hesaplanır.

$$u(x) = \frac{a}{k} \quad (2.3)$$

a:standart sapma k:kapasite faktörü.

Örneğin; bir spesifikasyon, bir denge okumasının %95 güven seviyesinde ± 0.2 mg içinde olduğu belirtiliyorsa normal dağılım kullanılır. Çünkü güven seviyesi ve belirsizlik belirtilmiştir. Standart tabloda %95 güven seviyesine denk gelen kapasite faktörü 2'dir. Bu durumda standart belirsizlik $0.2/2=0.1$ şeklinde hesaplanır.

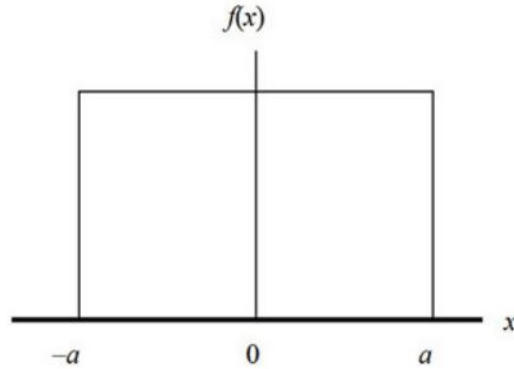


Şekil 2.2: Normal dağılım

2. Dikdörtgen (Tekdüze) Dağılım

Sürekli bir düzgün dağılım ve sabit olasılığı olan bir fonksiyondur. Dikdörtgen bir dağılımda, tüm sonuçların gerçekleşme olasılığı eşittir. Asıl dağılım formu bilinmiyorsa dikdörtgen dağılım varsayılan dağılımdır. Dikdörtgen dağılımda sertifika ve ürün spesifikasyonu belirtilmeden, güven aralığı olmadan verilen limitlerde ($x \pm a$), analiz sonucundaki değerler ortalamadan uzaksa ve kaynağı bilinmeyen bütün belirsizliklerde bu dağılım kullanılmaktadır. Bu dağılımda standart belirsizliği aşağıdaki eşitlikten hesaplanır;

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (2.4)$$



Şekil 2.3: Dikdörtgen dağılım

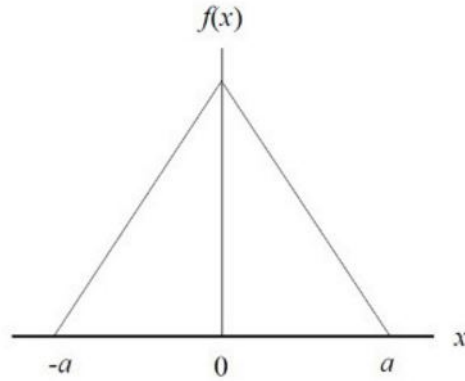
Örneğin; 10 mL’lik bir balon joje ± 0.2 mL’ye göre sertifikalandırılmış ise standart belirsizlik $0.2 / \sqrt{3} = 0.12$ mL şeklinde hesaplanır.

3. Üçgen Dağılım

Bilinen bir minimum, maksimum ve tahmini merkezi değeri temsil eden bir fonksiyondur. Üçgen dağılım, veri toplamının zor veya pahalı olduğu durumlarda yaygın olarak kullanılır. Değerlerin (sertifikada verilen değer) uç noktalara kıyasla ortalamaya yakın olma olasılığının daha yüksek olduğu dağılım formudur. Herhangi bir bilginin olmadığı, kaynağı tahmin edilebilen durumlarda kullanılır ve aşağıdaki eşitlikten hesaplanır;

$$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (2.5)$$

Örneğin; ± 0.2 mL olarak sertifikalandırılmış 10 ml’lik bir balon jojenin iç kontroller yapıldığında genelde ortalamaya yakın değerler olduğunu gözlenmiş. Bu durumda standart belirsizlik $0.2 / \sqrt{6} = 0.08$ mL şeklinde hesaplanır.



Şekil 2.4: Üçgen dağılım

2.3.1.4. Bileşik Belirsizlik

Bir ölçüm sonucu için toplam belirsizlik, bileşik standart belirsizlik olarak ifade edilir ve u_c ile gösterilir. Toplam belirsizlik, tüm belirsizlik bileşenlerini birleştirerek elde edilen toplam

varyansın pozitif kareköküne eşit bir standart sapmadır.

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2}$$

(2.6)

u_1^2, u_2^2, u_3^2 : bireysel belirsizlikler

Birleşik belirsizlikten önce tüm belirsizlik katkıları standart belirsizlikler olarak yani standart sapmalar olarak ifade edilmelidir.

2.3.1.5. Genişletilmiş Belirsizlik

Genişletilmiş belirsizlik U ile gösterilir. Genişletilmiş belirsizlik, ölçümün değerinin daha yüksek bir güven seviyesine sahip olduğuna inanıldığı bir aralık sağlar. U, u_c 'nin kapasite faktörü (k) ile çarpılması ile elde edilir.

$$U(x) = k \times u_c$$

(2.7)

Genelde %95 güven seviyesi tercih edilir. %95 güven seviyesine ait kapasite faktörü 2'dir.

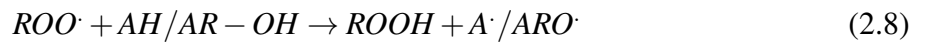
2.4. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanın genel tanımı; bir antioksidan (AOX), istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eden veya geciktiren bir madde olarak ya da oksitlenebilir bir substratın önemli ölçüde geciktiren veya bu substratın oksidasyonunu önleyen madde olarak tanımlanır.

Antioksidanlar, nispeten küçük konsantrasyonda bile oksidasyon sürecinde inhibitör olarak kullanılır ve böylece vücutta fizyolojik olarak çeşitli rollerde yer alırlar. Hem bitkilerde hem de hayvanlarda hastalıkların önlenmesi ve vücut savunma sisteminde önemli bir role sahiptir. Bugünün sosyal yaşamında yetersiz beslenmek, bağımlılık yapan alışkanlıklar (çoğunlukla tütün ve alkol kullanımı gibi) ve çevre kirliliğinin artması kronik oksidatif strese neden olmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikalleri süpürür ve *in vivo* oksidasyon zincirlerini durdururlar. Bu yüzden doğada çevresel ve fizyolojik stres, yaşlanma ve kansere karşı kullanılırlar [19–21]. Antioksidan yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılır. Bunlardan bir elektron transfer esaslı (ET) ve hidrojen atom transfer esaslı (HAT) olmak üzere iki başlık altında incelenen sınıflandırma şeklidir.

2.4.1. HAT Esaslı Yöntemler

Hidrojen esaslı (HAT) yöntemlerde, antioksidan bileşiği, reaktif oksijen/azot türlerine hidrojen atomu vererek reaktif türlerin süpürmesi ölçülür. HAT esaslı yöntemin reaksiyon mekanizması aşağıdaki (2.8) gibidir.



HAT reaksiyonunda antioksidanlar (AH / AR-OH) bir reaktif türe (ROO·) hidrojen atomu transferi ile reaktif türe göre daha stabil olan (A· ve ARO·) radikale dönüşürler. HAT yöntemlerinde, hem prob hem de antioksidan bileşiği reaktif tür ile reaksiyona girer [5; 6].

HAT esaslı yöntemlerin bazıları;

- ORAC Yöntemi,
- TRAP Yöntemi,
- Krosin Beyazlatma Yöntemi.

2.4.1.1. ORAC Yöntemi

Oksijen radikal absorbands kapasitesi (ORAC) yöntemi, daha çok gıda antioksidan kapasite ölçümlerinde kullanılmaktadır. ORAC analizinde, beta-fikokserin okside olabilen protein substratı ve 2,2-azobis(2-aminopropan) diklorit(AAPH) ise peroksil radikali veya $\text{Cu}_2^+ - \text{H}_2\text{O}_2$ hidroksil radikal üreticileri olarak kullanılır.

ORAC yönteminde, AAPH'ın uyarılması ile peroksil radikallerine karşı antioksidanın süpürülmesi ölçülür. Yöntemde, floresan probu olarak florescein kullanılmakta, florescein ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon neticesinde floresceinin floresansında düşüş gözlenmekte ve düşüşe bağlı olarak TAC hesaplanmaktadır [22].

2.4.1.2. TRAP Yöntemi

Toplam radikal tutma parametresi (TRAP) yönteminde, peroksil radikali AAPH'den üretilir, plazmaya ya da seruma AAPH eklenir ve oksidasyon reaksiyonu sürecinde tükenen oksijen miktarı ölçülür [23].

2.4.1.3. Krosin Beyazlatma Yöntemi

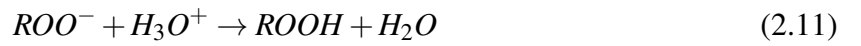
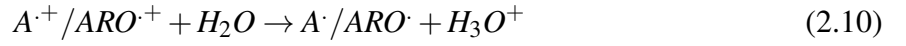
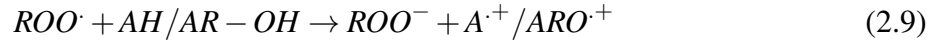
Peroksil radikallerinin (AAPH bileşiğinden elde edilen) krosin'in oksidasyonuna dayanmaktadır. Peroksil radikalleri ile krosin arasındaki oksidasyon reaksiyonunda antioksidan yokluğundaki ve varlığındaki hızı ölçülür [24].

2.4.2. ET Esaslı Yöntemler

Elektron transferi yönteminde reaksiyon, prob (oksidan) ve antioksidan arasında gerçekleşir. Metalik iyonlar, karbonil grupları ve serbest radikalleri azaltmak için antioksidanın elektron aktarmasını esas alır. Diğer bir ifadeyle prob, antioksidandan elektron alır ve prob da renk değişimi gözlenir. Renk değişikliği derecesi (belirli bir dalgaboyunda absorbandsın artması veya azalması) numunedeki antioksidanların konsantrasyonu ile ilgilidir.

Elektron transferi reaksiyonu;

Prob (oksidan) + e⁻(antioksidan) → İndirgenmiş prob + Oksitlenmiş antioksidan



ET esaslı yöntemlerin reaksiyonları HAT esaslı yöntemli reaksiyonlara göre daha yavaş gerçekleşir ve ayrıca ET yöntemleri solvent ve pH bağımlıdır [5; 25].

ET esaslı yöntemlerin bazıları;

- ABTS/TEAC Yöntemi,
- FRAP Yöntemi,
- CUPRAC Yöntemi,
- DPPH Yöntemi.

2.4.2.1. ABTS/TEAC Yöntemi

ABTS yöntemi aynı zamanda troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) yöntemi olarak da bilinir. Bu yöntemde ABTS^{·+} absorbansının AOX tarafından azaltılması ölçülmektedir. Genellikle ABTS yöntemi gıda örneklerinin AOC belirlenmesi için kullanılır [24; 26].

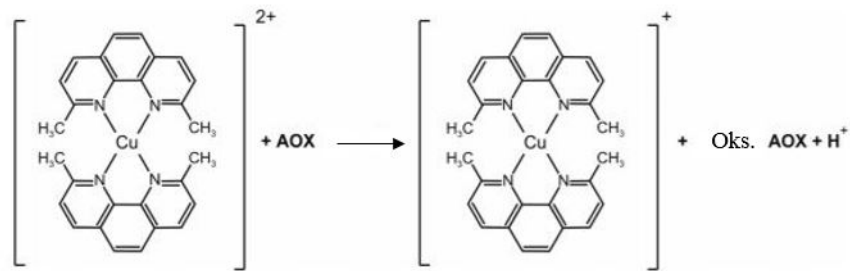
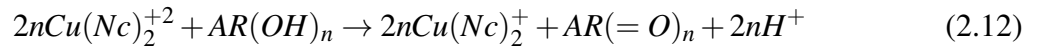
2.4.2.2. FRAP Yöntemi

FRAP yönteminde, antioksidanların elektron vermesi sarı ferrik tripiridiltriazin kompleksinden (Fe³⁺-TPTZ) mavi demir kompleksinin (Fe²⁺-TPTZ) oluşmasına neden olur. Oluşan renkli çözelti spektrofotometrede 595 nm dalgaboyunda ölçülür. Bu yöntemin

dezavantajlarından biri, Fe^{2+} iyi bilinen bir "prooksidan" olmasıdır. H_2O_2 ile tepkimeye girerek en zararlı serbest radikal olan hidroksil radikalini ($\cdot OH$) üretmesidir [4].

2.4.2.3. CUPRAC Yöntemi

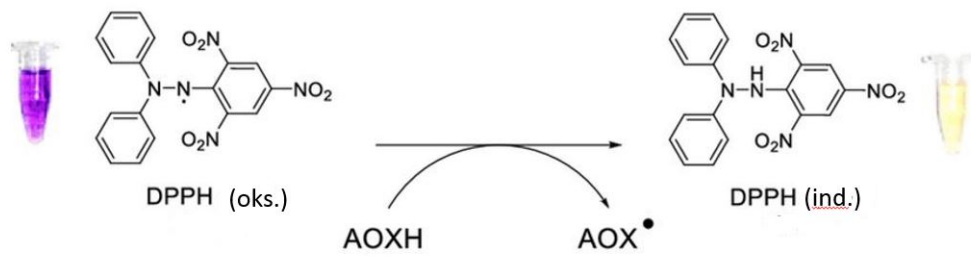
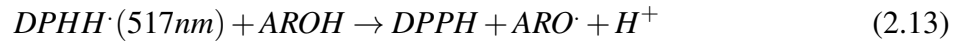
Bu yöntem temel olarak 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin Nc)'in $Cu(II)$ ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin ($Cu(II)-Nc$), 450 nm dalgaboyunda maksimum absorptans veren bakır(I)-neokuproin ($Cu(I)-Nc$) kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır. CUPRAC yönteminin TAC analizindeki diğer ET yöntemlerinden ayıran avantajı pH'ın kolay ayarlanabilmesi (diğer ET esaslı yöntemler olan, alkali pH kullanıldığı Folin, asidik pH kullanıldığı FRAP yöntemine göre), stabil olması, basit, maliyetinin düşük olması ve hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir olmasıdır [4; 27]. Bakır(II)-neokuproin reaktifi ile antioksidan arasındaki reaksiyon;



Şekil 2.5: CUPRAC reaktifi ile antioksidan arasındaki reaksiyonun moleküler gösterimi [28]

2.4.2.4. DPPH Yöntemi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), aromatik halkalarda delokalize olması nedeniyle sabit bir radikaldır. DPPH diğer radikalleri kolayca tutabilir ancak dimerize edemez. DPPH yöntemi doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde temel olarak antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu (515-520 nm’de) absorbansın azalmasına neden olur. Absorbansta azalma doğrusal olarak antioksidan konsantrasyonuna bağlıdır. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilmesine dayanmaktadır. DPPH yöntemi basit, hızlı ve birçok örneğin radikal süpürme aktivitesinin takibi için farklı örneklerin çözünürlüklerine elverişli bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Fakat ışığa, oksijene ve kirliliğe olan hassasiyeti bu yöntemin kullanımında belli oranda kısıtlamalara sebebiyet verebilmektedir [22; 29]. DPPH radikali ile antioksidan arasındaki reaksiyon Şekil 2.6’da görülmektedir.



Şekil 2.6: DPPH reaktifi ile antioksidan arasındaki reaksiyonun moleküler gösterimi [30]

2.5. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Enrico ve arkadaşları, CUPRAC-BCS yöntemini kullanarak insan plazmasındaki toplam antioksidan kapasite ölçümüne ilişkin belirsizlik değeri hesaplanmışlardır. Bu çalışmada, ölçüm belirsizliği için üre ve Cu(I) kullanılarak TAC değerleri tayin edilmiştir. Ölçümler, UV-Vis spektrofotometre ve oto analiz cihazları kullanarak yapılmıştır. Her iki yöntem karşılaştırıldığında en düşük belirsizlik değeri oto analiz yöntemi ile elde edilmiş ve 0.0094 olarak bulunmuştur [31].

Della ve arkadaşları, zeytin yağındaki fenolik antioksidanlarından olan bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat, oktil gallat ve dodesil gallat'ın analizi için GC-FID ve HPLC-PDA yöntemlerini kullanmıştır. Bu antioksidanlar arasında bileşik belirsizliği en büyük oktil gallat olarak hesaplanmıştır [32].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN MALZEMELER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Terazi: RADWAG marka Was 220X model terazi
- Girdap karıştırıcı: Velp scientifica
- pH metre: Hanna HI2202 model
- UV-Vis Spektrofotometre: Agilent marka Cary 100 Bio model
- Hesaplamalar için: Microsoft Excel 2016 yazılımı
- Kuvartz küvet: Isolab (3.5 mL)
- Ultra saf su: Millipore Simpak 1 Synergy 185
- Su banyosu: Memmert marka WNB 10 mode

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

- Troloks (± 6 -hidroksil-2,5,7,8-tetrametilkromat-2-karboksilik asit, TR): Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
- Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, Nc): (Sigma Aldrich, Germany),
- Bakır(II) klorür (%99): (E. Merck (Darmstadt, Germany)
- Amonyum asetat (NH_4Ac): (E. Merck (Darmstadt, Germany)
- DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Sigma Aldrich
- Etanol: Sigma Aldrich
- Elma suyu: Lokal marketten temin edilmiştir.

3.2. KULLANILAN YÖNTEM

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

CUPRAC yöntemi için;

1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi hazırlamak için bakır(II) klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 426.2 mg tartılıp 250 mL'ye su ile, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin, Nc)'den 7.5×10^{-3} M çözeltisi hazırlamak için de 156 mg tartım alındı ve 100 mL'ye etanol ile tamamlanmıştır. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu içinde, 1.0 M (pH=7.0) olacak şekilde NH_4Ac 'tan 19.27 mg tartılıp 250 mL'ye su ile tamamlanmıştır [33].

DPPH yöntemi için;

10^{-3} M'lık DPPH çözeltisi hazırlamak için 39.4 mg tartılıp, etanol ile 100 mL'ye tamamlanmıştır [34].

Troloks çözeltisinin hazırlanması;

10^{-3} M troloks çözeltisi hazırlamak için, 12.5 mg troloks tartılıp ve 50 mL'e etanol ile tamamlanmıştır. Daha sonra 2×10^{-4} M troloks çözeltisi hazırlamak için 10^{-3} M çözeltiden 2 mL alınıp 10 mL'ye etanol ile tamamlanmıştır.

3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.2.1. CUPRAC Yöntemi

Cam tüpe, 1.0 mL bakır(II) çözeltisi, 1.0 mL neokuproin çözeltisi, 1.0 mL amonyum asetat tamponu, x mL troloks çözeltisi ve (1.1-x) mL su sırasıyla eklemiştir. Böylece total hacim 4.1 mL olacak şekilde çözelti hazırlanmış ve tüpler ağzı kapalı bir şekilde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra içerisinde troloks çözeltisi bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. TR standart çözeltisinin farklı hacimlerine (farklı derişimlerine) karşı ölçülen absorbans (A) değerleri arasında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur [33].

Kalibrasyon Çözeltisi: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + x mL TR + (1.1-x) mL H₂O

Referans Çözeltisi: 1 mL Cu(II)+1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac+ 1.1 mL H₂O

$V_T=4.1$ mL

3.2.2.2. DPPH Yöntemi

Cam tüpe sırasıyla, 0.4 mL DPPH çözeltisi, x mL troloks çözeltisi ve toplam hacim 5 mL olacak şekilde (4.6-x) mL etanol eklenip karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Referans çözeltiliye karşı 517 nm dalgaboyunda absorbens değerleri ölçülmüştür. TR standart çözeltisinin farklı hacimlerine (farklı derişimlerine) karşı ölçülen absorbens değerler arasında kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur [34].

Kalibrasyon Çözeltisi: 0.4 mL DPPH + (4.6-x) mL Etanol + x mL Troloks

Referans Çözeltisi: 0.4 mL DPPH + (4.6-x) mL Etanol

$V_T=5$ mL

3.2.3. TAC Yöntemlerinin Gerçek Örneğe Uygulanması

3.2.3.1. CUPRAC Yönteminin Elma Suyu Örneğine Uygulanması

10 kat distile su ile seyreltilen elma suyundan 0.3 mL, Cu²⁺ çözeltisinden, neokuproin çözeltisinden ve NH₄Ac çözeltisinden 1'er mL ve 0.8 mL su cam tüpe eklenerek toplam hacim 4.1 mL tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti 30 dakika karanlıkta ağız kapalı şekilde bekletilmiştir. Daha sonra referans çözeltiliye karşı 450 nm dalgaboyunda okutulmuştur.

Kalibrasyon Çözeltisi: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + x mL Elma suyu + (1.1-x) mL H₂O

Referans Çözeltisi: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + 1.1 mL H₂O

$V_T=4.1$ mL

3.2.3.2. *DPPH Yönteminin Elma Suyu Örneğine Uygulanması*

Cam tüpe sırasıyla, 0.4 mL DPPH çözeltisi, 4.4 mL etanol ve 0.2 mL elma suyu eklenmiştir. 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında ağzı kapalı şekilde bekletilmiştir. Referans çözeltiye karşı 517 nm dalgaboyunda absorbans değeri ölçülmüştür.

Örnek Çözelti: 0.4 mL DPPH + (4.6-x) mL Etanol + x mL Elma suyu

Referans Çözelti: 0.4 mL DPPH + 4.6 mL Etanol

$V_T=5$ mL

3.2.4. *CUPRAC ve DPPH Yöntemlerinin Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanması*

3.2.4.1. *CUPRAC Yöntemi için Geri Kazanım Çözeltilerin Hazırlanması*

Deney tüpüne sırasıyla 1:10 oranında seyretilmiş elma suyundan 1 mL, 0.1 mL troloks ve 1'er mL Cu(II), Nc, NH₄Ac eklenip karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ağzı kapalı şekilde 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra referans çözeltiye karşı 450 nm dalgaboyunda okutulmuştur.

Standart Kat. Çöz.: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + 1 mL Elma suyu + 0.1 mL troloks

Referans Çözeltisi: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH₄Ac + 1.1 mL H₂O

3.2.4.2. *DPPH Yöntemi için Geri Kazanım Çözeltilerinin Hazırlanması*

Deney tüpüne sırasıyla, elma suyundan direk 0.1 mL, etanolden 4.3 mL, DPPH çözeltisinden 0.4 mL ve troloks dan 0.2 mL alınıp karıştırılmıştır. 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında ağzı kapalı bir şekilde bekletilmiştir. Daha sonra referans çözeltisine karşı 517 nm dalgaboyunda okutulmuştur.

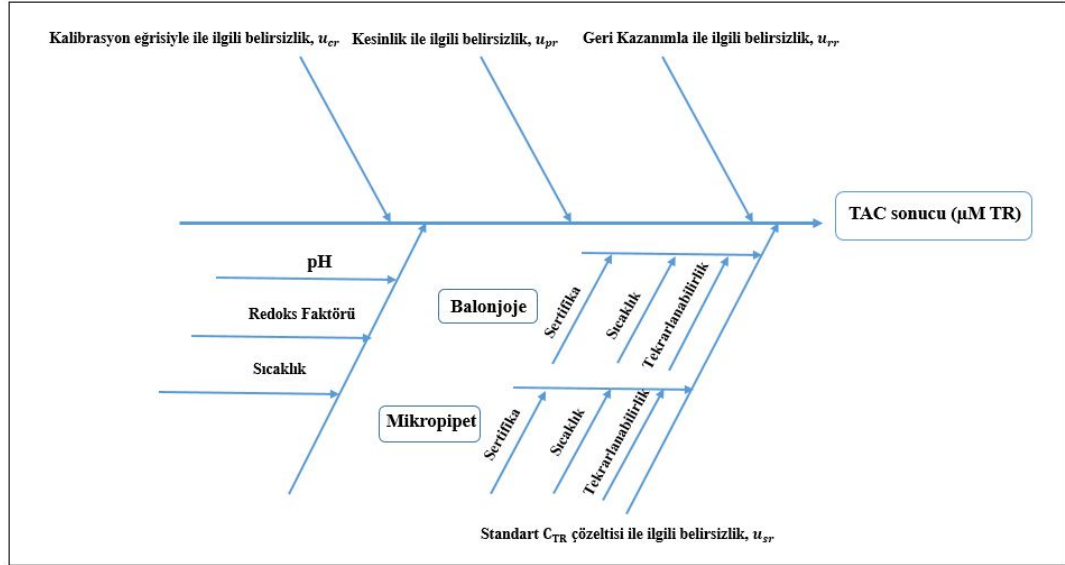
Standart Kat. Çöz.: 0.1 mL Elma suyu + 4.3 mL Etanol + 0.4 mL DPPH + 0.2 mL Troloks

Referans Çözelti: 4.6 mL Etanol + 0.4 mL DPPH

4. BULGULAR

4.1. CUPRAC VE DPPH YÖNTEMLERİNDE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Belirsizlik, analiz sonuçlarını anlamak ve analiz sonucunu daha anlamlı hale getirmek için kullanılan bir terimdir. Belirsizlik ayrıca bir çeşit bir hatadır, ancak rastgele ve sistematik hataların toplamını belirli bir güvenle seviyesinde ve aralıkta veren bir hatadır.



Şekil 4.1: CUPRAC ve DPPH yöntemlerine göre TAC ölçümünde potansiyel belirsizlik kaynaklarının belirlenmesinde fishbone diyagramı

$$TAC = 2 \times f_{sr} \times f_{cr} \times f_{pr} \times f_{rr} \times f_{pH} \times f_T \times f_{RF} \quad (4.1)$$

- f_{sr} : Standart TR konstrasyonu ilişkili belirsizlik,
- f_{cr} : Kalibrasyon eğrisi ile ilişkili belirsizlik,
- f_{pr} : Kesinlik ile ilişkili belirsizlik,
- f_{rr} : Geri kazanımla ilişkili belirsizlik,
- f_{pH} : pH ile ilişkili belirsizlik,
- f_T : Sıcaklık ile ilişkili belirsizlik (T, °C),
- f_{RF} : Analitik redoks reaksiyonunun elektronik değişimini ifade eder (RF= redoks faktörü),
- 2, Cu (II) ve troloks arasında değiştirilen elektronların sayısıdır.

4.1.1. Referans Standart Çözeltileri Troloks (C_{TR}) ile İlgili Belirsizlik, u_{sr}

Standart çözeltisi troloks'un konstrasyonuna etki eden, mikropipet ve balon joje'nin hacimleri belirsizliklerinin bir fonksiyonu olarak ifade edilir.

4.1.1.1. Mikropipet Hacmindeki Belirsizlik, u_{sr1}

Mikropipetin hacmindeki belirsizliği etkileyen faktörler;

a. Ölçüm Toleransından Gelen Belirsizlik, $u_{sr1,1}$

$$u_{sr1,1} = \frac{s}{k} \quad (4.2)$$

Mikropipetin kalibrasyon sertifikasına göre belirsizlik(s) 0.006 ve kapsama faktörü (k) 2'dir.

$$u_{sr1,1} = \frac{0.006}{2} = 0.003 \quad (4.3)$$

b. Sıcaklıktan Gelen Belirsizlik, $u_{sr1,2}$

- V: Mikropipet hacmi,
- ΔT : Sıcaklık değişimi,
- α : Su için Volumetrik Genişleşme Katsayısı, $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$

$$u_{sr1,2} = \frac{V * T * \alpha}{\sqrt{3}} \quad (4.4)$$

$$u_{sr1,2} = \frac{1 * 3 * 2 * 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.00036 \quad (4.5)$$

c. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizlik, $u_{sr1,3}$

1 mL mikropipetin standart sapması için, suyun kütle ve yoğunluğu kullanarak mikropipeti 10 seri doldurum yapılarak ölçüm sonuçları kullanılmıştır. Ölçüm sonucunun standart sapması;

$$u_{sr1,3} = 0.0019 \quad (4.6)$$

Mikropipetin hacminden gelen toplam belirsizlik;

$$u_{sr1} = \frac{\sqrt{(u_{sr1,1})^2 + (u_{sr1,2})^2 + (u_{sr1,3})^2}}{1\text{mL}} \quad (4.7)$$

$$u_{sr1} = \frac{\sqrt{(0.003)^2 + (0.00036)^2 + (0.0019)^2}}{1mL} = 0.0036 \quad (4.8)$$

4.1.1.2. Balon joje Hacmindeki Belirsizlik, u_{sr2}

Balon joje hacmindeki belirsizliği etkileyen faktörler;

a. Ölçüm Toleransından Gelen Belirsizlik, $u_{sr2,1}$

$$u_{sr2,1} = \frac{0.05}{\sqrt{6}} = 0.020 \quad (4.9)$$

0.05 balon jojenin toleransından ve $\sqrt{6}$ ise olasılık dağılımı olan üçgen dağılımdan gelmektedir.

b. Sıcaklıktan Gelen Belirsizlik, $u_{sr2,2}$

- V: Balon joje hacmi,
- ΔT : Sıcaklık değişimi,
- α : Su için Volumetrik Genişleşme Katsayısı, $2.1 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$

$$u_{sr2,2} = \frac{50 * 3 * 2 * 10^{-4}}{\sqrt{3}} = 0.018 \quad (4.10)$$

c. Tekrarlanabilirlikten Gelen Belirsizlik, $u_{sr2,3}$

50 mL balon jojenin standart sapması, suyun kütle ve yoğunluğu kullanılarak 10 kere doldurularak elde edilen ölçüm sonuçları kullanılmıştır. Ölçümün standart sapması;

$$u_{sr2,3} = 0.071 \quad (4.11)$$

Balon joje hacminden gelen belirsizlik;

$$u_{sr2} = \frac{\sqrt{(u_{sr2,1})^2 + (u_{sr2,2})^2 + (u_{sr2,3})^2}}{50mL} \quad (4.12)$$

$$u_{sr2} = \frac{\sqrt{(0.020)^2 + (0.018)^2 + (0.071)^2}}{50} = 0.0015 \quad (4.13)$$

4.1.1.3. Referans Standart Çözeltileri Troloks'un Son Konsantrasyonundaki Belirsizlik, u_{sr3}

Referans standart çözeltisi troloks'un son konsantrasyonunun hazırlanmasında, kütle, saflık ve hacminden gelen belirsizlikler birleştirilerek değerlendirildi.

Tablo 4.1: Standart çözeltisi troloksun konsantrasyonu ile ilgili belirsizliklerin katkıları

Miktar/Birim	Değer	Belirsizlik	Dağılım Faktörü	$u(x)$	$u(x)/x$
Miktar/g(m)	0.0125	-	-	$4.2 \cdot 10^{-5}$	0.0034
Saflık (p)	0.97	0.03	$\sqrt{3}$	0.0173	0.0179
Hacim/mL (v)	50	-	$\sqrt{6}$	-	0.0015

$$u_{sr3} = \sqrt{u(m)^2 + u(p)^2 + u(v)^2}$$

$$u_{sr3} = \sqrt{0.0034^2 + 0.0179^2 + 0.0015^2} = 0.0183 \quad (4.15)$$

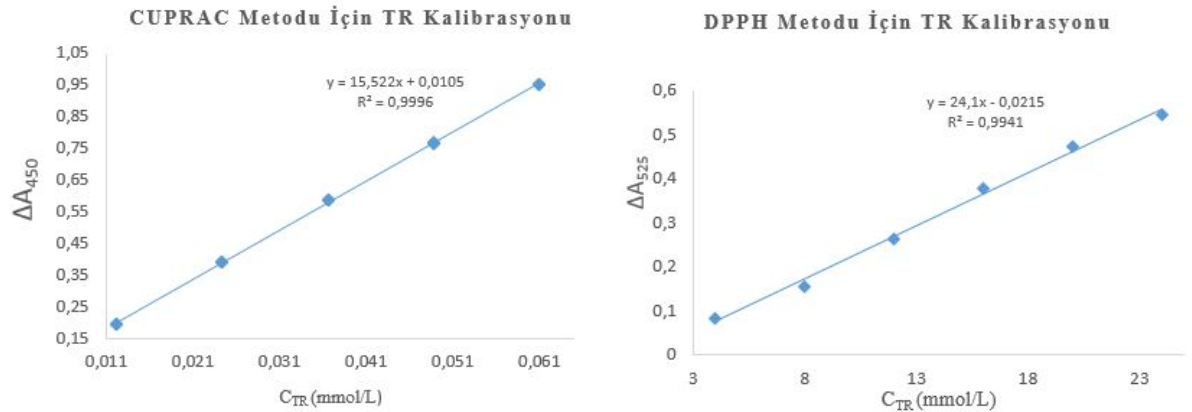
Aşağıdaki denklem, standart C_{TR} çözeltisinin belirsizliğinin hesaplanmasında kullanılan tüm belirsizlik bileşenlerini içerir.

$$u_{sr} = \sqrt{u_{sr1}^2 + u_{sr2}^2 + u_{sr3}^2} = \sqrt{(0.0036)^2 + (0.0015)^2 + (0.018)^2} = 0.0184 \quad (4.16)$$

4.1.2. Kalibrasyon Eğrisi İle İlgili Belirsizlik, u_{cr}

Bu tez çalışmasında CUPRAC yöntemi için 0.0122 ve 0.0610 mmol L^{-1} arasında beş, DPPH yöntemi içinde 4.10^{-3} ve 24.10^{-3} mmol L^{-1} arasında altı konsantrasyon çalışılmıştır, gün içi tekrarlanabilirlik için tüm konsantrasyonların her biri üçer kez, günler arası tekrarlanabilirlik için de altı gün boyunca gerçekleştirildi. Kalibrasyon eğrisi ile ilişkili ölçüm belirsizliği, Eurachem Citac [18] klavuzuna göre tahmin edildi. İlgili belirsizlik için,

$\text{var}(x_0)$: x_0 ile ilgili varyans, Şekil 4.2' deki formül kullanılarak hesaplanmıştır:



Şekil 4.2: Troloks standartının DPPH ve CUPRAC yöntemlerine göre kalibrasyon eğrileri

- $\text{var}(y_{obs})$: Gözlenen değişkenle ilgili varyans,
- b : Kalibrasyon eğrisinin eğimi,

- S: Ortalama kare sapma,
- w_i : y_i ağırlığı,
- X_i : Referans çözeltinin konsantrasyonu,
- $\bar{X}$: Kalibrasyon eğrisini oluşturan n tane derişimin ortalaması,
- X_o : Kalibrasyon denklemi kullanılarak elde edilen konsantrasyon,

$$\text{var}(X_o) = \frac{\text{var}(y_{obs})}{b^2} + \frac{s^2}{b^2} \left(\frac{1}{\sum w_i} + \frac{(X_o - \bar{X})^2}{\sum (w_i X_i^2) - \left(\frac{\sum (w_i X_i)^2}{\sum w_i} \right)} \right)$$

Şekil 4.3: var (Xo): Xo ile ilgili varyans formülü

DPPH (4.17, 4.18) ve CUPRAC (4.19, 4.20) yöntemleri için $u_r(X_o)$ değerleri;

DPPH yöntemi için;

$$u(X_o)_{DPPH} = \sqrt{\text{var}(X_o)} = 0.0000604 \text{ mmol.L}^{-1} \quad (4.17)$$

$$u_r(X_o)_{DPPH} = \frac{u(X_o)}{X_o} = 0.0024 \quad (4.18)$$

CUPRAC yöntemi için;

$$u(X_o)_{CUPRAC} = \sqrt{\text{var}(X_o)} = 0.00021 \text{ mmol.L}^{-1} \quad (4.19)$$

$$u_r(X_o)_{CUPRAC} = \frac{u(X_o)}{X_o} = 0.0048 \quad (4.20)$$

4.1.3. Kesinlikle İle İlgili Belirsizlik, u_{pr}

CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılarak elma suyunun TAC değerleri hesaplanmıştır. Elma suyunun TAC değeri, altı gün boyunca on bağımsız ölçüm analiz ederek deneysel olarak belirlendi. CUPRAC ve DPPH yöntemlerin gün içi tekrarlanabilirlik (S_r) hesaplanmıştır:

Tablo 4.2: CUPRAC yöntemi ile elma sularında TAC değerleri

Ölçüm	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	$\bar{X}^a$
1.	1819.9	1801.0	1814.5	1801.3	1803.1	1805.0	
2.	1804.1	1819.2	1798.4	1793.3	1800.5	1810.4	
3.	1801.4	1811.4	1811.8	1809.4	1797.9	1799.7	
4.	1809.4	1793.2	1795.8	1806.7	1771.8	1810.4	
5.	1817.3	1798.4	1817.2	1812.1	1792.9	1789.0	
6.	1819.9	1790.6	1814.5	1801.3	1779.7	1818.4	
7.	1793.5	1819.2	1790.4	1801.3	1808.3	1794.3	
8.	1809.4	1811.4	1817.2	177.8	1797.9	1802.3	
9.	1806.7	1801.0	1798.4	1806.7	1810.9	1807.7	
10.	1814.7	1808.8	1806.5	1793.3	1805.7	1802.3	
$\bar{X}_b$	1809.63	1805.44	1806.46	1800.53	1796.89	1803.95	1803.82
$S^2_{rj}^c$	73.57	102.14	98.68	91.91	155.54	71.61	

Tablo 4.3: DPPH yöntemi ile elma suyunda TAC değerleri

ÖLÇÜM	1.GÜN	2.GÜN	3.GÜN	4.GÜN	5.GÜN	6.GÜN	$\bar{X}^a$
1.	597.7	597.2	596.5	597.9	599.8	598.0	
2.	599.8	596.5	597.2	598.6	598.3	598.4	
3.	597.9	598.0	600.5	598.7	597.4	599.5	
4.	597.5	599.8	599.1	559.4	597.0	598.1	
5.	598.2	597.8	597.5	599.6	597.3	598.0	
6.	597.4	599.4	598.4	598.0	598.0	599.8	
7.	600.4	598.5	598.2	600.5	597.9	599.3	
8.	599.4	597.3	597.9	597.9	597.7	599.5	
9.	596.9	599.9	597.7	599.7	597.7	598.6	
10.	597.4	597.2	597.3	599..2	599.6	599.9	
$\bar{X}_b$	598.3	598.2	598.0	598.9	598.1	598.9	598.4
$S^2 r j^c$	1.418	1.418	1.267	0.746	0.899	0.5528	

- a : genel ortalaması; b : grup ortalaması; c : grup varyansı.

TAC veri serisinin varyansı homojenliği hem CUPRAC hem de DPPH yöntemi için, Cochran testi ile test edildi ve sonuçlar, varyansların homojenliğini doğrulamıştır. ((d)= 6 grup sayısı ve serbestlik derecesi (v)= n-1= 9).

Cochran'ın test istatistiği;

$$C_{exp} = \frac{S^2 r j_{mak.}}{\sum_{j=1}^d S^2 r j}$$

CUPRAC yöntemin uygulanması ile;

$$C_{exp} = \frac{155.54}{593.4} = 0.2621 \leq C_{tab.(v,d)}(p = 0.95\%; v = 9; d = 6) = 0.3584 \quad (4.21)$$

DPPH yönteminin uygulanması ile;

$$C_{exp} = \frac{1.418}{6.3027} = 0.2250 \leq C_{tab.(v,d)}(p = 0.95\%; v = 9; d = 6) = 0.3584 \quad (4.22)$$

- C_{exp} : Ölçüm sonucu bulunan değer,
- $C_{tab.}$: Tablo değeri,
- S^2_{rj} : Hesaplanan varyans

Gün içi tekrarlanabilirlik (S^2_r) değerleri;

$$S^2_r = 1/d \sum_{j=1}^d S^2_{rj} \quad (4.23)$$

CUPRAC yönteminin uygulanması gün içi kesinlik,

$$S^2_r = \frac{593.46}{6} = 98.91 ((\mu mol L^{-1})^2) \quad (4.24)$$

$$S_{r(CUPRAC)} = 9.95 (\mu mol L^{-1}) \quad (4.25)$$

CUPRAC yönteminin uygulanması günler arası kesinlik ($S^2_{I(T)}/(S^2_r/n)$)_{CUPRAC};

$$S^2_{I(T)}/(S^2_r/n) = 1.03 \leq F(p = 0.95\%; v_{IM} = 9; v_r = 54) = 2.386 \quad (4.26)$$

CUPRAC yöntemi için tekrarlanabilirlik varyans katsayısı (CV),

$$CV_{CUPRAC} = \frac{S_r}{\bar{X}} = 9.95/1803.82 = 0.0055 \quad (4.27)$$

DPPH yöntemi uygulanması gün içi kesinlik,

$$S_r^2 = \frac{6.3027}{6} = 1.050(\mu mol L^{-1})^2 \quad (4.28)$$

$$S_{r(DPPH)} = 1.025(\mu mol L^{-1}) \quad (4.29)$$

DPPH yönteminin uygulanması günler arası kesinlik($S^2_{I(T)}/(S^2_{r/n})_{DPPH}$);

$$S^2_{I(T)}/(S^2_{r/n}) = 0.83 \leq F(p = 0.95\%; v_{IM} = 9; v_r = 54) = 2.386 \quad (4.30)$$

DPPH yöntemi için tekrarlanabilirlik varyans katsayısı (CV),

$$CV_{DPPH} = \frac{S_r}{\bar{X}} = 1.025/598.41 = 0.0017 \quad (4.31)$$

CUPRAC ve DPPH testlerindeki kesinlikten gelen ölçüm belirsizliği,

$$u_{rep} = \frac{CV}{\sqrt{n}} \quad (4.32)$$

$$u_{rep(CUPRAC)} = \frac{0.0055}{\sqrt{3}} = 0.0032 \quad (4.33)$$

$$u_{rep(DPPH)} = \frac{0.0017}{\sqrt{3}} = 0.00098 \quad (4.34)$$

Ölçümdeki tek tek rastgele etkiler, tek yönlü ANOVA testi ile hesaplanmıştır (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.4: CUPRAC metodu kullanarak elma suyu sonuçlarının istatistikleri, tek yönlü ANOVA

ÖZET				
Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans
1	10	18096.31491	1809.63149	73.56920
2	10	18054.44498	1805.44498	102.13851
3	10	18064.62141	1806.46214	98.68004
4	10	18005.31950	1800.53195	91.91410
5	10	17968.85478	1796.88548	155.53993
6	10	18039.46597	1803.94660	71.61335

ANOVA						
Varyans Kaynak.	SS	df	MS	F	P _{value}	F _{tab.}
Grup. Arası.	1023.09736	5	204.619472	2.06876093	0.08356459	2.38606986
Grup.İçi	5341.09636	54	98.9091918			
TOTAL	6364.19372	59				

- SS:kareler toplamı, df: serbestlik derecesi, MS: karelerin Ortalaması

Tablo 4.5: DPPH metodu kullanarak elma suyu sonuçlarının istatistikleri, tek yönlü ANOVA

ÖZET						
Gruplar	Sayı	Toplam	Ortalama	Varyans	-	-
1	10	5982.851	598.2851	1.41867		
2	10	5981.715	598.1715	1.41832		
3	10	5980.475	598.0475	1.26748		
4	10	5989.627	598.9627	0.74608		
5	10	5980.992	598.0992	0.89930		
6	10	5989.212	598.9212	0.55286		

ANOVA						
Varyans Kaynak.	SS	df	MS	F	P _{value}	F _{tab.}
Grup. Arası.	8.670786	5	1.734157	1.650861	0.162417	2.38607
Grup.İçi	56.72464	54	1.050456			
Toplam	65.39542	59				

4.1.4. Geri Kazanım ile İlgili Belirsizlik, u_{rr}

Gerikazanım ile ilgili belirsizliği bulmak için, konsantrasyonu bilinen 10 TR çözeltisi ölçüldü. TR numunelerindeki CUPRAC/DPPH yöntemlerinin geri kazanımı, ölçüm konsantrasyonunun, standart katılan numunenin beklenen kısımları ile bölünmesi ile tahmin edildi.

Yöntemine ilişkili belirsizlik (u_{rr}) tarafından verilir:

$$u_{rr} = \frac{s/R_{ort}}{\sqrt{n}} \quad (4.35)$$

- s: geri kazanımın standart sapması,
- R_{ort} : ortalama kare sapma,
- n: ölçüm sayısı.

Tablo 4.6: CUPRAC yöntemi ile geri kazanım değerleri

Ölçüm	Beklenen sonuç- C_{TK} (mmol.L ⁻¹)	Elde edilen Değer(mmol.L ⁻¹)	Geri Kazanım %
1	2.44×10^{-2}	2.47×10^{-2}	101.03
2	2.44×10^{-2}	2.33×10^{-2}	95.49
3	2.44×10^{-2}	2.36×10^{-2}	96.54
4	2.44×10^{-2}	2.44×10^{-2}	99.98
5	2.44×10^{-2}	2.48×10^{-2}	101.56
6	2.44×10^{-2}	2.31×10^{-2}	94.69
8	2.44×10^{-2}	2.43×10^{-2}	99.45
9	2.44×10^{-2}	2.38×10^{-2}	97.60
10	2.44×10^{-2}	2.41×10^{-2}	98.92
Std. Sap.			2.32
% Ort.			98.33
u_{rr}			0.0075

Tablo 4.7: DPPH yöntemi ile geri kazanım değerleri

Ölçüm	Beklenen sonuç- C_{TK} (mmol.L ⁻¹)	Elde edilen Değer(mmol.L ⁻¹)	Geri Kazanım %
1	2.105×10^{-2}	2.12×10^{-2}	101.0
2	2.105×10^{-2}	2.08×10^{-2}	98.7
3	2.105×10^{-2}	2.10×10^{-2}	100.0
4	2.105×10^{-2}	2.08×10^{-2}	99.1
5	2.105×10^{-2}	2.04×10^{-2}	96.9
6	2.105×10^{-2}	2.08×10^{-2}	98.7
7	2.105×10^{-2}	2.12×10^{-2}	101.0
8	2.105×10^{-2}	2.10×10^{-2}	99.9
9	2.105×10^{-2}	2.07×10^{-2}	98.6
10	2.105×10^{-2}	2.03×10^{-2}	96.4
Std. Sap.			1.55
% Ort.			99.0
u_{rr}			0.0049

4.1.5. pH İle İlgili Belirsizlik, u_{pH}

CUPRAC amonyum asetat (pH 7) [33] tamponu esas alınmıştır. DPPH yönteminde pH 7.6 (genel pH aralığı: 5.5-8) değeri esas alınarak pH belirsizliği hesaplanmıştır. pH ile ilgili

belirsizlik için ölçüm belirsizliği aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$u_{pH} = 0.01$$

(4.37)

$$u_{r(pH(CUPRAC))} = \frac{u_{pH}}{pH} = (0.01/7) = 0.0014 \quad (4.38)$$

$$u_{r(pH(DPPH))} = \frac{u_{pH}}{pH} = (0.01/7.6) = 0.0013 \quad (4.39)$$

4.1.6. Sıcaklıkla İle İlgili Belirsizlik, $u_{r(T)}$

CUPRAC ve DPPH analizleri oda sıcaklığı şartlarında yapılmıştır. Sıcaklıkla ilişkili belirsizliği belirlemek için su banyosu kullanılmıştır. Bunun için su banyosu 25 ± 0.3 ayarlanmıştır.

$u_{r(T)}$ ile ilgili belirsizlik;

$$u_{(T)} = \frac{\Delta T}{\sqrt{6}} = 0.122 \quad (4.40)$$

$$u_{(T)} = \frac{U_{r(T)}}{\sqrt{6}} = 0.00489 \quad (4.41)$$

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, günümüzde yaygın bir kullanım alanına sahip olan valide edilmiş CUPRAC-TAC testinde ilk defa ölçüm belirsizliklerinin hesaplandı ve elde edilen bulguların bir diğer TAC yöntemi olan DPPH yöntemiyle mukayese edildi. Literatürde CUPRAC (orjinal-CURRAC) ve DPPH yöntemi için belirsizlik değerlendirmesi ile ilgili herhangi bir sistematik çalışmaya rastlanmadı.

Belirsizlik, analiz (ölçüm) sonuçlarının daha kolay anlaşılması ve analiz sonucunu daha anlamlı bir hale getirmek için kullanılan bir terimdir. Analitin gerçek değerinin içinde bulunduğu güven aralığı, bir analizde meydana gelen rastgele ve sistematik hataların toplamından hesaplanmaktadır. Bu aralığa, analizin veya işlemin belirsizliği denir. Klinik bir anlamı olan niceliklerin ölçüm belirsizliğini sağlamak esastır. Standardizasyon için uluslararası organizmalar, tıbbi laboratuvarlar alanında ölçüm kalitesinin değerlendirilmesi için kılavuzlar hazırlamıştır. Önerilen çalışma, kromojenik reaktif olarak amonyum asetat tampon ortamında iyi bir yükseltgen olan bakır(II)-neokuproini içeren CUPRAC yöntemiyle bazı meyve sularında (elma suyu vb.) TAC ölçüm belirsizliğini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Analitik Ölçümlerde Belirsizliğin Kantifiye edilmesi (Eurochem/GUIDE) klavuzu çerçevesinde, CUPRAC-TAC yönteminde ölçüm belirsizliğini iyi birleştirilmiş metrolojik veya aşağıdan (alttan) yukarıya yaklaşıma göre değerlendirme, çalışma kapsamında seçildi. Belirsizlik ölçümünde ilk aşamada CUPRAC yöntemiyle gerçek örneklerin (elma suyu vb.) TAC değerleri belirlendi ve ölçümde kullanılan denklem ortaya konuldu. Sonrasında, CUPRAC-TAC denkleminde yer alan parametrelerden gelen belirsizlikler (kalibrasyon eğrisi, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, sıcaklık, pH, referans stok çözelti konsantrasyonu, Cu(II)-Nc ile referans troloks (TR) arasındaki redoks faktörü vb.) başta olmak üzere, tüm belirsizlik kaynakları belirlendi. Sonraki aşamada, tespit edilen parametrelerin standart ölçüm belirsizlikleri hesaplandı. Sınıflandırılan her bir belirsizlik

ortak bir birime çevrildi (standart belirsizlik: $u_r(y)$). Her bir belirsizlik kaynağından gelen standart belirsizliklerin birleştirilmesiyle ölçüm sonucunun birleşik standart belirsizliği 'uc' hesaplandı. Son aşamada, seçilen bir faktörle (k) birleşik standart belirsizliği çarpıldıktan sonra, genişletilmiş belirsizlik hesaplandı. Hesaplanan standart ölçüm belirsizliklerinin, birleşik ölçüm belirsizliğine oranları bulundu.

Tablo 5.1: Eurachem klavuzuna göre spektrofotometrik CUPRAC-TAC ölçümlerindeki bireysel ve genişletilmiş belirsizlikler

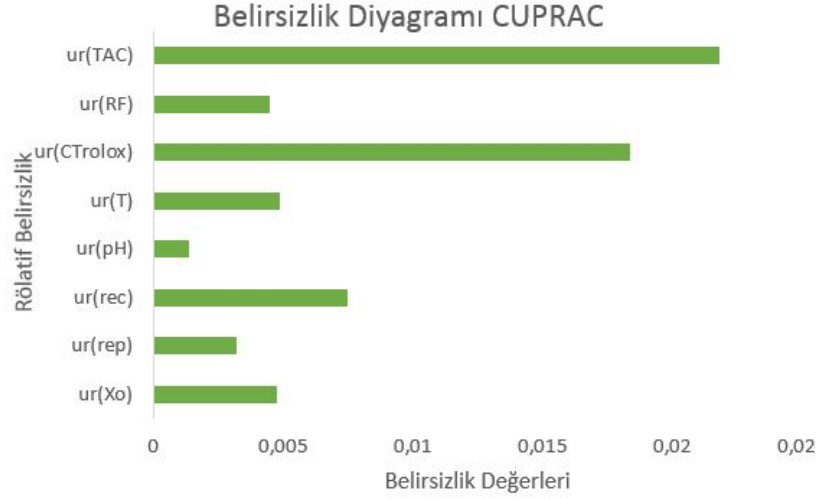
Nicelik	Rölatif Belirsizlik	Belirsizlik
X_o	$u_r(X_o)$	0.0048
f_{rep}	$u_r(rep)$	0.0032
f_{reC}	$u_r(rec)$	0.0075
f_{pH}	$u_r(pH)$	0.0014
f_T	$u_r(T)$	0.0049
$f_{CToloks}$	$u_r(C_{Toloks})$	0.0184
f_{RF}	$u_r(RF)$	0.0045
	$u_r(TAC)$	0.0218
	$U(TAC)$	79

Tablo 5.2: Eurachem klavuzuna göre spektrofotometrik DPPH-TAC ölçümlerindeki bireysel ve genişletilmiş belirsizlikler

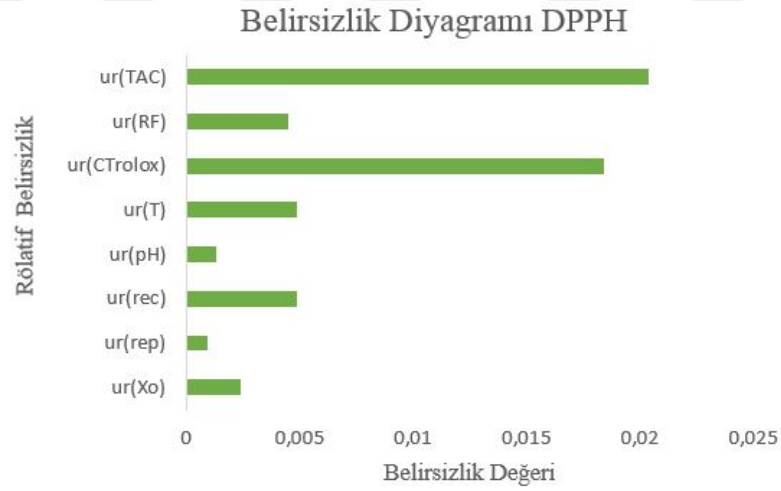
Nicelik	Rölatif Belirsizlik	Belirsizlik
X_o	$u_r(X_o)$	0.0024
f_{rep}	$u_r(rep)$	0.0009
f_{reC}	$u_r(rec)$	0.0049
f_{pH}	$u_r(pH)$	0.0013
f_T	$u_r(T)$	0.0049
$f_{CToloks}$	$u_r(C_{Toloks})$	0.0184
f_{RF}	$u_r(RF)$	0.0045
	$u_r(TAC)$	0.0204
	$U(TAC)$	24

$$u(TAC)/TAC = \sqrt{u_r(X_o)^2 + u_r(rep)^2 + u_r(rec)^2 + u_r(T)^2 + u_r(pH)^2 + u_r(C_{Toloks})^2 + u_r(RF)^2}$$

$$U(TAC) = u(TAC) * 2 \quad (5.2)$$



Şekil 5.1: CUPRAC yönteminin belirsizlik diyagramı



Şekil 5.2: DPPH yönteminin belirsizlik diyagramı

Tablo 5.1 ve 5.2’de gösterildiği gibi parametrelerin ölçülen miktarın değişkenliğine önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir. Her miktarın birleşik belirsizlik üzerindeki rölatif katkısının bir özeti, Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’teki çubuk diyagramlarında gösterilmiştir. Çubukların rölatif uzunluğu, her katkının ölçüm belirsizliğine ağırlığını göstermektedir ve bu işlemlerin ölçüm kalitesini arttırmaya yönelik daha fazla dikkatini verilmesi gerektiği anlaşıldı. CUPRAC ve

DPPH yöntemleri için elde edilen $u_r(TAC)$ değerleri Tablo 5.1 ve 5.2’de verildi. CUPRAC ve DPPH yöntemlerinden edilen kalibrasyon prosedürü kullanılarak tahmin edilen belirsizlik hesaplanmasında, ölçüm belirsizliğini en çok etkileyen standart belirsizliğin standart troloks konstrasyonu (C_{TR}) olduğu gözlemlendi. Ölçüm belirsizliğini etkileyen parametreler aşağıdan yukarı yaklaşım ile tanımlandı ve ölçüldü. (Tablo 5.1, Tablo 5.2) ve bileşik belirsizlikte oynanan rolleri de açıklığa kavuşturuldu.

Sonuçlar, en iyi çalışma koşullarının seçilmesine ve TAC ölçümü için belirsizlik kabul limitlerini tanımlamasında ve ölçülen TAC değerlerinin değişkenliğini önemli ölçüde etkileyen parametreler belirlenip birleşik belirsizlik üzerinde oynadıkları rol de açıklığa kavuşturuldu ve en iyi CUPRAC-TAC ve DPPH-TAC çalışma koşullarının seçilmesine imkan sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- [1]. Celia Andrés Juan, José Manuel Pérez de la Lastra, Francisco J Plou, and Eduardo Pérez-Lebeña. The chemistry of reactive oxygen species (ros) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (dna, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9):4642, 2021.
- [2]. Giuseppe Vitiello, Loredana Serpe, and Alfonso Blázquez-Castro. The role of reactive oxygen species in chemical and biochemical processes editorial on the research topic the role of reactive oxygen species in chemical and biochemical processes. *Frontiers in Chemistry*, 9:33, 2021.
- [3]. Shuai Jiang, Hui Liu, and Chunbao Li. Dietary regulation of oxidative stress in chronic metabolic diseases. *Foods*, 10(8):1854, 2021.
- [4]. Ayse Karadag, Beraat Ozcelik, and Samim Saner. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2(1):41–60, 2009.
- [5]. Resat Apak, Mustafa Ozyurek, Kubilay Guclu, and Esra Capanoglu. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (et)-based assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5):997–1027, 2016.
- [6]. Deepshikha Gupta. Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2):546, 2015.
- [7]. Krishnanand Mishra, Himanshu Ojha, and Nabo Kumar Chaudhury. Estimation of antiradical properties of antioxidants using dpph assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4):1036–1043, 2012.
- [8]. JuDong Yeo and Fereidoon Shahidi. Critical re-evaluation of dpph assay: Presence of pigments affects the results. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(26):7526–7529, 2019.
- [9]. Yolanda Carmona-Jiménez, M Valme García-Moreno, Jose M Igartuburu, and Carmelo Garcia Barroso. Simplification of the dpph assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food chemistry*, 165:198–204, 2014.
- [10]. Stephen LR Ellison and Alex Williams. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2012.
- [11]. The following seven organizations supported the. Guide to the expression of uncertainty in measurement. 1995.
- [12]. I Iso and BIPM OIML. Guide to the expression of uncertainty in measurement. *Geneva, Switzerland*, 122:16–17, 1995.

- [13]. Jesper Kristiansen. The guide to expression of uncertainty in measurement approach for estimating uncertainty: an appraisal. *Clinical chemistry*, 49(11):1822–1829, 2003.
- [14]. Ivo Leito, Lauri Jalukse, and Irja Helm. Estimation of measurement uncertainty in chemical analysis (analytical chemistry) course. *University of Tartu: Tartu, Estonia*, 2018.
- [15]. Stephanie A Bell. A beginner’s guide to uncertainty of measurement. 2001.
- [16]. E Richard Cohen. Error and uncertainty in physical measurements. In *Modeling Complex Data for Creating Information*, pages 55–64. Springer, 1996.
- [17]. Michael H Ramsey and Stephen LR Ellison. Reply to comments on eurachem/citac guide “measurement uncertainty arising from sampling”. *Accreditation and quality assurance*, 15(9):533–535, 2010.
- [18]. SB Rasul, A Monsur Kajal, and AH Khan. Quantifying uncertainty in analytical measurements. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(2):145–163, 2017.
- [19]. Resat Apak. Current issues in antioxidant measurement. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(33):9187–9202, 2019.
- [20]. Bronisław K Głód, Paweł M Wantusiak, Paweł Piszcz, Elwira Lewczuk, and Paweł K Zarzycki. Application of micro-tlc to the total antioxidant potential (tap) measurement. *Food chemistry*, 173:749–754, 2015.
- [21]. IS Young. Measurement of total antioxidant capacity, 2001.
- [22]. Duduku Krishnaiah, Rosalam Sarbatly, and Rajesh Nithyanandam. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3):217–233, 2011.
- [23]. Ronald L Prior, Xianli Wu, and Karen Schaich. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10):4290–4302, 2005.
- [24]. Sudhakar Singh and RP Singh. In vitro methods of assay of antioxidants: an overview. *Food reviews international*, 24(4):392–415, 2008.
- [25]. Irina Georgiana Munteanu and Constantin Apetrei. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7):3380, 2021.
- [26]. Camila Peres Rubio, Josefa Hernández-Ruiz, Silvia Martinez-Subiela, Asta TvariJonaviciute, and José Joaquin Ceron. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (tac) in dog serum: an update. *BMC veterinary research*, 12(1):1–7, 2016.
- [27]. Mustafa Özyürek, Kubilay Güçlü, and Reşat Apak. The main and modified cuprac methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4):652–664, 2011.
- [28]. Reşat Apak, Mustafa Özyürek, Kubilay Güçlü, Burcu Bekdeşer, and Mustafa Bener. The cuprac methods of antioxidant measurement for beverages. In *Processing and impact on antioxidants in beverages*, pages 235–244. Elsevier, 2014.

- [29]. Sagar B Kedare and RP Singh. Genesis and development of dpph method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4):412–422, 2011.
- [30]. Pablo Misael Arce-Amezquita, Felix Alfredo Beltrán-Morales, Gisela Alejandra Manríquez-Rivera, Mariams Elizabeth Cota-Almanza, Atenas Quian-Torres, and Rosa Guadalupe Peralta-Olachea. Nutritional value of conventional, wild and organically produced fruits and vegetables available in baja california sur markets. *Terra Latinoamericana*, 37(4):401–406, 2019.
- [31]. Enrico Prenesti, Silvia Berto, Fabio Gosmaro, Paola Fisicaro, Marco Bagnati, and Giorgio Bellomo. Measurement uncertainty evaluation of the total antioxidant capacity of human plasma tested by the cuprac-bcs method. *Measurement*, 152:107289, 2020.
- [32]. Della WM Sin, YC Wong, CY Mak, ST Sze, and WY Yao. Determination of five phenolic antioxidants in edible oils: Method validation and estimation of measurement uncertainty. *Journal of food composition and analysis*, 19(8):784–791, 2006.
- [33]. Reşat Apak, Kubilay Güçlü, Mustafa Özyürek, and Saliha Esin Karademir. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: Cuprac method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26):7970–7981, 2004.
- [34]. Concepción Sánchez-Moreno, Jose A Larrauri, and Fulgencio Saura-Calixto. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2):270–276, 1998.