



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

OKSİDAZ AKTİVİTESİ ARTTIRILMIŞ NANO-MANGAN DİOKSİT
KULLANIMIYLA DOLAYLI ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Kader CAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Reşat APAK


Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 28.05.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı,
Analitik Kimya Programı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

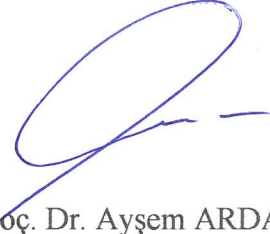
TEZ JÜRİSİ



Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



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



Doç. Dr. Ayşem ARDA
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



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 aboneli 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 32656 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygı değer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Reşat Apak'a tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan güler yüzünü ve samimiyetini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Ayşem ARDA' ya desteği ve sabrı için,

Yüksek lisans eğitimim boyunca süresince her türlü olanağı kullanmamı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Araş. Gör. Ziya CAN ve Araş. Gör. Şener SAĞLAM' a,

Sentezlen nanopartiküllerin XRD ile yapı analizi aşamasında gösterdiği katkılardan dolayı Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülin POZAN SOYLU'a,

Yüksek lisansın bana kazandırdığı, gerek tez çalışmalarımda gerekse tezimin yazım aşamasında yanımda olup hem maddi hem de manevi yardımlarını esirgemeyen, pozitif enerjileriyle hayatıma renk katan canım dostlarım Selen DURMAZEL, Batuhan YARDIMCI, ve Fatma MAMATİOĞLU' a, çalışmalarım sırasında pozitif yaklaşımlarıyla enerjilerini ve desteklerini hissettiğim Elif TURAN ve Şevval BÖLÜK' e ve diğer çalışma arkadaşlarıma

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, koşulsuz sevgi ve destekleriyle bana güç veren değerli babam Fikri CAN, annem Ayşe CAN ve canım kardeşlerim Songül CANLI, Zafer CAN, Melek ÇOBAN ve Dilek CAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 32656 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019

Kader CAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
SUMMARY	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. REAKTİF OKSİJEN/AZOT TÜRLERİ (OKSİDANLAR) VE OKSİDATİF GERİLİM	4
2.2. ANTİOKSİDANLAR	6
2.3. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI	7
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	7
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	7
2.3.1.2. Katalaz (CAT).....	8
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	8
2.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GRx).....	8
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	9
2.3.2.1. Sentetik Antioksidanlar	9
2.3.2.2. Doğal Antioksidanlar.....	11
2.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	15
2.4.1. Flavonoidler.....	15
2.4.1.1. Flavonoller	15
2.4.1.2. Flavanoller	16
2.4.1.3. Flavanonlar	17
2.4.1.4. Flavonlar	18
2.4.1.5. Antosiyanidinler.....	18
2.4.1.6. İzoflavonlar.....	19
2.4.2. Fenolik Asitler	19

2.4.3. Tiyoollü Antioksidanlar.....	20
2.4.3.1. <i>Glutasyon</i>	20
2.4.3.2. <i>Sistein</i>	21
2.4.3.2. <i>Homosistein</i>	21
2.4.3.3. <i>N-asetil sistein</i>	22
2.4.3.4. <i>Sisteamin</i>	22
2.5. FLAVONOİD BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ.....	23
2.6. FLAVONOİD BİLEŞİKLERİN PROKSİDAN AKTİVİTESİ.....	27
2.7. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE/ AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	28
2.7.1. TRAP Yöntemi.....	31
2.7.2. Krosin Ağartma Yöntemi	31
2.7.3. ORAC Yöntemi.....	31
2.7.4. DPPH Yöntemi.....	32
2.7.5. FRAP Yöntemi	32
2.7.6. ABTS/TEAC Yöntemi	33
2.7.7. Folin Ciocalteu Yöntemi	33
2.7.8. CUPRAC Yöntemi	34
2.8. NANOBİLİM VE NANOTEKNOLOJİ	34
2.8.1. Nanoyapılar ve Kimyasal Analiz.....	36
2.8.2. Nanoparçacıklar.....	38
2.9. ANTIOKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN NANOPARÇACIK ESASLI KOLORİMETRİK YÖNTEMLER.....	39
2.10. DİĞER ANTIOKSİDAN TAYİN YÖNTEMLERİ.....	43
2.11. TEZ ÇALIŞMASINA YÖN VEREN LİTERATÜR ÇALIŞMALARI.....	45
2.11.1. Enzim Benzeri Etki Gösteren MnO ₂ Nanoçubukları Kullanılarak Cıva İyonlarının Kolorimetrik Tayini	45
2.11.2. İndikatör Olarak 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) Kullanılarak Ag(I)'in Yüksek Hassasiyet Ve Seçimli Kolorimetrik Tayini.....	46
2.11.3. Peroksidaz ve Oksidaz Aktivite Olarak Bovin Serum Albumin (BSA)- Temelli MnO ₂ Nanopartikülleri.....	47
2.11.4. MnO ₂ Nanosheets Kullanarak Askorbik Asidin Kolay ve Ucuz Belirlenmesinde Reaktif Kullanılmadan Kolorimetrik Yöntemin Geliştirilmesi.....	47
2.12. SPERMAN KORELASYON KATSAYISI.....	48
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	49
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	49

3.2. KİMYASAL MADDELER	49
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	50
3.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN MANGAN DİOKSİT NANOPARTİKÜL ESASLI SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ.....	51
3.4.1. Mangan Dioksit Nanopartikül (MnO ₂ –NPs) Sentezi.....	51
3.4.2. MnO ₂ Nanopartikül Esaslı Sensör Hazırlanması	51
3.4.3. MnO ₂ Nanopartikül Esaslı Spektrofotometrik Antioksidanların Aktivite Tayin Yöntemi	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. MANGAN DİOKSİT NANOPARTİKÜL ESASLI YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN STANDART ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI	53
4.1.1. Yöntemin Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	53
4.1.1.1. MnO ₂ Nanopartiküllerin Miktarının Belirlenmesi.....	53
4.1.1.2. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi	55
4.1.1.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Belirlenmesi	55
4.1.1.4. Uygun Reaktif Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	56
4.1.1.5. Uygun Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi.....	57
4.1.1.6. Ortam pH'sının Belirlenmesi.....	58
4.1.1.7. Ortam Sıcaklığının Belirlenmesi.....	59
4.1.2. MnO ₂ NPs Temelli Sensörünün Kararlılığının Belirlenmesi	59
4.1.3. Sentezlenen Mangan Dioksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	60
4.1.3.1. SEM Analizi İle Karakterizasyonu.....	60
4.1.3.2. XRD İle Karakterizasyonu.....	61
4.1.4. MnO ₂ -NP'lerin Peroksidaz Ve Oksidaz Benzeri Aktivitelerinin Karakterizasyonu	61
4.1.5. Ortamda Bulunması Muhtemel Reaktif Türlerin Varlığının İncelenmesi.....	62
4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Trolox Antioksidan Bileşiğine Uygulanması	64
4.1.7. Geliştirilen Yönteme Uygulanan Antioksidanların Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması, Lineer Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi, Molar Absorplama Katsayılarının Bulunması, LOD ve LOQ Değerlerinin Bulunması.....	66
4.1.7.1. Katesin	66
4.1.7.2. Kuarsetin.....	67
4.1.7.3. Askorbik Asit.....	67
4.1.7.4. Kafeik Asit.....	68
4.1.7.5. Gallik Asit	68
4.1.7.6. Rutin.....	69

4.1.6.7. <i>p</i> -Kumarik Asit.....	69
4.1.7.8. Klorojenik Asit.....	70
4.1.7.9. Vanilik Asit.....	70
4.1.7.10. Ferulik Asit.....	71
4.1.7.11. Kamferol.....	71
4.1.7.12. α -Tokoferol.....	72
4.1.7.13. Glutasyon.....	72
4.1.7.14. Sistein.....	73
4.1.7.15. Sisteamin.....	74
4.1.7.16. <i>N</i> -Asetil Sistein.....	74
4.1.8. Geliştirilen Yöntemde Çalışılan Standart Antioksidan Bileşiklerinin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi.....	79
4.2. Sentetik Antioksidan Karışımların Hazırlanması Ve Geliştirilen Yönteme Uygulanarak Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Değerlerinin Bulunması.....	81
4.2.1. İkili Sentetik Antioksidan Karışımları.....	81
4.2.2. Üçlü Sentetik Antioksidan Karışımları.....	82
4.3. Standart Katkı Yöntemi İle İçecek Ve Bitki Ekstraktının Geliştirilen Yönteme Uygulanması.....	83
4.3.1. Yeşil Çay (<i>Camellia sinensis</i>) Ekstraktına Kateşin ve Troloks Standart Katkı Yönteminin Uygulanması.....	83
4.3.2. Portakal Suyuna Askorbik Asit ve Troloks Standart Katkı Yönteminin Uygulanması.....	87
4.4. Bazı Standart Antioksidan Bileşiklerde İnterferan Etkisinin İncelenmesi.....	91
4.5. Antioksidan Bileşiklerin Etkinliği Sıralaması İçin Spearman Analizi.....	91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	93
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	110

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Serbest radikal kaynakları, insan sağlığına faydaları ve zararları.	6
Şekil 2.2: BHA'nın kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2.3: BHT'nin kimyasal yapısı.	10
Şekil 2.4: TBHQ'nın kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.5: PG'nin kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.6: Askorbik asitin (C vitamini) kimyasal yapısı.	12
Şekil 2.7: β -karotenin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.8: α - tokoferolün kimyasal yapısı.	13
Şekil 2.9: Polifenollerin sınıflandırılması.	14
Şekil 2.10: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	15
Şekil 2.11: Flavonolun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.	16
Şekil 2.12: Flavanolun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.....	17
Şekil 2.13: Flavanonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.....	17
Şekil 2.14: Flavonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.....	18
Şekil 2.15: Antosiyanidin genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.	19
Şekil 2.16: İzoflavonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.	19
Şekil 2.17: Fenolik asit bileşiklerinin genel kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.18: GSH ve GSSH'm kimyasal yapısı.	21
Şekil 2.19: Sistein ve sistin bileşiğinin kimyasal yapısı.	21
Şekil 2.20: Homosistein ve homosistin bileşiğinin kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.21: N-Asetil sistein bileşiğinin kimyasal yapısı.	22
Şekil 2.22: Sisteamin bileşiğinin kimyasal yapısı.....	23

Şekil 2.23: Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerinin (R) süpürülmesinde serbest radikalin (FI-O), ikinci bir radikal ile reaksiyona girerek stabil bir kinon yapısını oluşması.....	24
Şekil 2.24: B halkasında bir orto-dihidroksi (kateşol) yapısı.....	24
Şekil 2.25: 3. ve 5. pozisyonlardaki hidroksil grupları.	25
Şekil 2.26: C halkasında 4-okso grubu ile 2,3-çift bağ konjugasyon.	25
Şekil 2.27: İz metaller için bağlama yerleri.	26
Şekil 2.28: Flavonoidlerin proksidan aktivitesi.	28
Şekil 2.29: Fe (III) –flavonoid kompleksinden Fe (II) –flavonoid kompleksi oluşumu.....	28
Şekil 2.30: ABAP'tan peroksil radikalının oluşumu.	31
Şekil 2.31: Krosinin kimyasal yapısı.	31
Şekil 2.32: ORAC yöntemindeki eğrinin altında net alan.	32
Şekil 2.33: Antioksidan aracılığıyla DPPH• radikalının indirgenmesi.	32
Şekil 2.34: Bir antioksidan varlığında FRAP tahlili için reaksiyon mekanizması.....	33
Şekil 2.35: ABTS \cdot^+ 'nin antioksidan bileşiklerle reaksiyonu.	33
Şekil 2.36: CUPRAC reaksiyonu.....	34
Şekil 2.37: Farklı boyutlarda nano- ve mikro-yapıların eldesi için muhtemel prosesler.	36
Şekil 2.38: Nanoteknolojinin boyut aralığını.	37
Şekil 2.39: Nanotüp ve nanofiberlerin kimyasal analizlerde kullanımı.....	38
Şekil 2.40: MnO ₂ nanoçubukları varlığında Hg ²⁺ tayini için önerilen yöntemin şematik gösterimi.	46
Şekil 2.41: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) ile Ag(I) için önerilen reaksiyon.....	46
Şekil 2.42: MnO ₂ NPs varlığında TMB ve OPD'nin oksidasyonunun şematik gösterimi.	47
Şekil 2.43: Artan AA konsantrasyonu varlığında MnO ₂ nanosheets çözeltinin renk şiddetinde doğrusal bir şekilde azalmasının grafik gösterimi.	48
Şekil 4.1: 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon ve 0,15 ml 1x10 ⁻² M TMB varlığında değişen MnO ₂ NP'lerin miktarına karşı (0,01, 0,015, 0,02, 0,04 ve 0,1 g) elde edilen absorbans değerlerine ait optimizasyon grafiği.	54

Şekil 4.2: 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon ve 0,15 ml 1×10^{-2} M TMB varlığında değişen MnO_2 NP'lerin miktarına karşı (0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 ve 0,4 mL) elde edilen absorbands değerlerine ait optimizasyon grafiği.....	54
Şekil 4.3: Geliştirilen yönteme tampon sisteminin etkisi.....	55
Şekil 4.4: 0,1 mL süspans MnO ₂ -NPs çözeltisi ve 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB varlığında değişen tampon konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbandslarına ait optimizasyon grafiği.....	56
Şekil 4.5: 0,1 mL süspans MnO ₂ -NPs çözeltisi ve 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon varlığında değişen TMB konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbandslara ait optimizasyon grafiği.....	56
Şekil 4.6: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltisinde MnO_2 NP'lerin 1×10^{-2} M TMB okside etmesi için gerekli reaksiyon süresine karşı elde edilen absorbandslara ait optimizasyon grafiği.....	57
Şekil 4.7: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltisinde TMB katyonu ile antioksidanlar arasındaki redox tepkimesinin termodinamik olarak dengeye gelmesi için gerekli reaksiyon süresine karşı elde edilen absorbandslara ait optimizasyon grafiği.....	58
Şekil 4.8: Geliştirilen yönteme pH'ın etkisi.....	58
Şekil 4.9: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltisine sıcaklığın etkisi.....	59
Şekil 4.10: Mangan dioksit nanopartikül temelli sensörün gün içi (a) ve günler arası (b) spektrumları.....	60
Şekil 4.11: MnO_2 NP'lerin SEM görüntüleri.....	60
Şekil 4.12: Sentezlenen nanopartiküllerin XRD görüntüsü.....	61
Şekil 4.13: 1:2 oranında seyreltilmiş TMB- MnO_2 NPs, TBM- MnO_2 tozu ve TBM çözeltilerine ait spektrumlar ($\lambda_{max} = 650$ nm).....	62
Şekil 4.14: NBT ve NBT- MnO_2 NPs çözeltilerinin spektrumları.....	63
Şekil 4.15: Salisilat probu- MnO_2 NPs çözeltilerinin spektrumları.....	64
Şekil 4.16: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisinde farklı konsantrasyonlarda bulunan Trolox bileşiğinin absorbandsında meydana gelen azalmanın (ΔA) görünür alan bölgesindeki spektrumu.....	65
Şekil 4.17: Geliştirilen yönteme uygulanan antioksidan bileşiklerin görünür alan bölgesindeki spektrumu ($\lambda_{max} = 650$ nm).....	76
Şekil 4.18: Geliştirilen yönteme uygulanan antioksidan bileşiklerin görünür alan bölgesindeki spektrumu ($\lambda_{max} = 650$ nm).....	77

Şekil 4.19: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktındaki Kateşin bileşiğinin kalibrasyon grafiği.....	84
Şekil 4.20: 1:36 yeşilçay içerisindeki Kateşin bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650$ nm).	84
Şekil 4.21: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktındaki Trolox bileşiğinin kalibrasyon grafiği.....	86
Şekil 4.22: 1:36 yeşilçay içerisindeki Trolox bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları($\lambda_{max} = 650$ nm).	86
Şekil 4.23: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyunda Askorbik asit bileşiğinin kalibrasyon grafiği.....	88
Şekil 4.24: 1 :10 portakal suyu içerisindeki Askorbik asit bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650$ nm).....	88
Şekil 4.25: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyunda Askorbik asit bileşiğinin kalibrasyon grafiği.....	89
Şekil 4.26: 10 portakal suyu içerisindeki Trolox bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650$ nm).	90
Şekil 5.1: Antioksidan bileşiklerin aktivite ölçümü için geliştirilen yöntemin şematik gösterimi.	96

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Nanoyapıların tipik boyutları.	36
Tablo 4.1: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Trolox bileşiğinin molar konsantrasyon ve absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi (c: molar konsantrasyon ve ΔA : absorbands farkı).....	65
Tablo 4.2: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kateşin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	66
Tablo 4.3: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kuarsetin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	67
Tablo 4.4: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Askorbik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	67
Tablo 4.5: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kafeik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	68
Tablo 4.6: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Gallik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	68
Tablo 4.7: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Rutin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	69
Tablo 4.8: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki p-Kumarik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	69
Tablo 4.9: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Klorojenik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	70
Tablo 4.10: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Vanilik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	70

Tablo 4.11: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Ferulik asit bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	71
Tablo 4.12: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kamferol bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	71
Tablo 4.13: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki α -Tokoferol bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	72
Tablo 4.14: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Glutasyon bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	72
Tablo 4.15: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Sistein bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	73
Tablo 4.16: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Sisteamin bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.....	74
Tablo 4.17: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki N-Asetil sistein bileşiminin artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) arasındaki kalibrasyon grafiği.....	74
Tablo 4.18: Geliştirilen yöntemeye uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.....	78
Tablo 4.19: Geliştirilen yöntemeye uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.....	79
Tablo 4.20: Antioksidan bileşiklerinin geliştirilen yöntemeye, CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemine göre TEAC değerleri.....	80
Tablo 4.21: İkili sentetik antioksidan karşımlarının teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri.....	81
Tablo 4.22: Üçlü sentetik antioksidan karşımlarının teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri.....	82
Tablo 4.23: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktına Kateşin bileşiminin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.....	83

Tablo 4.24: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktına Trolox bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.....	85
Tablo 4.25: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyuna Askorbik asit bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.....	87
Tablo 4.26: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyuna Trolox bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.....	89
Tablo 4.27: Yeşil çay (<i>Camellia sinensis</i>) ve portakal suyunun Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite.....	90
Tablo 4.28: Geliştirilen yönteme interferan maddelerin etkisi ve % hata.	91
Tablo 4.29: Geliştirilen yöntem ile spektrofotometrik ABTS/ persülfat yönteminde elde edilen sonuçların kıyaslanmasında Spearman korelasyon katsayısının belirlenmesi.	92

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

λ_{\max}	: Maksimum dalga boyu
ΔA	: Absorbans farkı
r	: Lineer korelasyon katsayısı
ϵ	: Molar absorplama katsayısı
C	: Derişim

Kısaltmalar

Açıklama

MnO ₂ NPs	: Mangan dioksit nanopartikül
UV	: Ultraviolet (mor ötesi)
SEM	: Tarama elektron mikroskobu (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
XRD	: X ışını toz kırınımı (X-ray powder diffraction)
LOD	: Dedeksiyon limiti (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin limiti (Limit of Quantitation)
TMB	: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin
NBT	: Nitroblue tetrazolyum
ROS	: Reaktif oksijen türü
RNS	: Reaktif azot türleri
HAT	: Hidrojen Atomu Transfer
ET	: Elektron Transfer
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TR	: Trolox
CT	: Kateşin
QR	: Kuarsetin
AA	: Askorbik asit
FA	: Ferulik asit
CGA	: Klorojenik asit
CFA	: Kafeik asit
GA	: Gallik asit

RT	: Rutin
p-KA	: p-kumarik asit
TOC	: Tokoferol
GSH	: Glutatyon
CYS	: Sistein
CYS-NH₂	: Sisteamin
NAC	: N-Asetil sistein
VA	: Vanilik asit



ÖZET

OKSİDAZ AKTİVİTESİ ARTTIRILMIŞ NANO-MANGAN DİOKSİT KULLANIMIYLA DOLAYLI ANTİOKSİDAN AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kader CAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Reşat APAK

Serbest radikaller kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, bağışıklık sistemi azalması, beyin fonksiyon bozukluğu gibi pek çok hastalıklara neden olacak potansiyele sahip olmaları nedeniyle son yıllarda sık araştırılan bir konu haline gelmiştir. Günümüzde bir çok doku hasarı ve hastalıklara neden olan bu serbest radikallerin stabilize edilmesinde veya devre dışı bırakılmasında görev alan antioksidanlar büyük bir öneme sahiptir. Son yıllarda toplam antioksidan aktivite/kapasite tayini için birkaç yeni analitik yaklaşım denenmiştir ve genel olarak antioksidanların tayininde düşük maliyetleri, kolay kullanımları, analitin hızlı tayin edilebilmesi ve yüksek hassasiyet gibi avantajları nedeniyle nanoparçacık temelli sensörler kullanılmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında antioksidan bileşiklerin dolaylı aktivite ölçümü için mangan dioksit nanopartikül temelli spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin prensibi; mangan dioksit nanopartiküller ile kromofor bir reaktif olan 3,3',5,5'-

Tetrametilbenzidin (TMB) arasında havaya açık ortamda meydana gelen redoks tepkimesi sonucu oluşan TMB⁺ katyonunun (nano prob) hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar varlığında renk şiddetinde (λ_{\max} = 650 nm) meydana gelen azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır. Mangan dioksit nanopartiküller kolay, hızlı ve ucuz bir şekilde sentezlenebilmektedir. Geliştirilen yöntemin güvenilirliği ve hassasiyetini tanımlayan lineerlik, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım parametreleri test edilerek yöntemin validasyonu yapılmıştır. Geliştirilen yöntem ile çalışılan antioksidanların gözlenebilirlik sınırları (LOD) 1.23×10^{-9} mol L⁻¹ ile 1.71×10^{-7} mol L⁻¹ değerleri arasında, tayin sınırları (LOQ) ise 3.73×10^{-8} mol L⁻¹ ile 5.18×10^{-7} mol L⁻¹ değerleri arasındadır. Geliştirilen yöntemde çeşitli antioksidan bileşiklerin (C ve E vitaminleri, polifenolik bileşikler ve tiyollü antioksidanlar) troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri hesaplanılarak elde edilen sonuçlar orijinal ABTS yöntemi sonuçlarıyla Spearman korelasyon testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Hazırlanan ikili ve üçlü sentetik karışımlara geliştirilen nano prob uygulanarak teorik olarak beklenen aktivite değerleri ile deneysel olarak bulunan değerler (mM TR) değerlendirilmiştir. Son olarak yeşil çay ve portakal suyu örneklerine saf antioksidan bileşiklerin uygun konsantrasyonlarda standart katkıları yapılarak geliştirilen yöntem ile antioksidan miktar tayinleri yapılmıştır.

Mayıs 2019, 131 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mangan dioksit nanopartikül, antioksidan aktivite, kolorimetrik sensor

SUMMARY

MEASUREMENT OF INDIRECT ANTIOXIDANT ACTIVITY USING NANO- MANGANESE DIOXIDE WITH ENHANCED OXIDASE ACTIVITY

M.Sc. THESIS

Kader CAN

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Reşat APAK

Free radicals have become the subject of many investigations in recent years, as they have the potential to cause many diseases such as cancer, cardiovascular disease, cataract, immune system reduction, and brain dysfunction. Nowadays, antioxidants that are involved in stabilizing or disabling these free radicals, which cause many tissue damage and diseases, are of great importance. In recent years, several new analytical approaches have been tried for total antioxidant activity / capacity determination and nanoparticle based sensors have been used in the determination of antioxidants in general due to their low costs, easy usage, rapid determination of analyte and high precision. For this reason, a manganese dioxide nanoparticle based spectrophotometric method was developed for the indirect activity measurement of antioxidant compounds. The developed method is based on the measurement of the decrease in the color intensity ($\lambda_{\max}= 650 \text{ nm}$) of TMB^+ cation

(nano probe) in the presence of hydrophilic and lyophilic antioxidants. TMB⁺ cation is obtained via redox reaction between manganese dioxide particles and a chromophore reactant: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) under pen air. Manganese dioxide nanoparticles can be synthesized easily, quickly and cheaply. The linearity, repeatability and recovery parameters that define the reliability and precision of the developed method were tested and the method was validated. Limit of detection (LOD) thresholds of the antioxidants worked with the developed method were in the range of 1.23×10^{-9} mol L⁻¹ and 1.71×10^{-7} mol L⁻¹ and their limit of quantitation (LOQ) thresholds are in the range of 3.73×10^{-8} mol L⁻¹ and 5.18×10^{-7} mol L⁻¹. In the developed method, the results of various antioxidant compounds (C and E vitamins, polyphenolic compounds and thiol antioxidants) as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values were calculated and the results were compared with those of the original ABTS method using the Spearman rank correlation test. The developed nano probe was applied to the binary and ternary synthetic mixtures and the experimental and theoretical activity values (mM TR) were evaluated. Finally, the antioxidant amount was determined by the method developed by standard addition of the pure antioxidant compounds in appropriate concentrations to the green tea and orange juice samples.

May 2019, 131 pages.

Keywords: Manganese dioxide nanoparticles, antioxidant activity, colorimetric sensor

1. GİRİŞ

Aerobik organizmalarda normal oksijen metabolizması sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikaller, dış orbitalin de bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olup son derece reaktif olan atom ya da moleküllerdir. Çevre kirliliği, radyasyon, kirli sular, pestisitler ve canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi birçok etmen kaçınılmaz olarak serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Diplock, 1998). Serbest radikaller, dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron (ları) bulunan yüksek oranda reaktif atomlar veya moleküllerdir (Chandrasekaran ve diğ. 2017) Hücreler sürekli olarak serbest radikalleri ve metabolik işlemlerin bir parçası olarak reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir (Leeuwenburgh ve Heinecke, 2001). ROS serbest radikalleri ve radikal olmayan türleri içerir. Serbest radikaller eşleşmemiş bir elektron taşır ve kararsız ve reaktiftir. Bunlar arasında hidroksil radikali olan süperoksit, nitrik oksit ve en reaktif ve toksik ROS bulunur. Radikal olmayan oksidanlar, çeşitli kimyasal reaksiyonlar yoluyla dokularda serbest radikaller oluşturan hidrojen peroksit, singlet oksijen ve ozonu içerir (Borek, 1993).

Oksidatif gerilim, söz konusu reaktif oksijen/azot türlerinin (ROS/RNS) lipid, protein, DNA gibi biyolojik makromoleküllerin oksidatif modifikasyonu sonucu doku hasarına yol açarak organizmanın antioksidatif savunmasını bastıran ve birçok hastalığın temeli olan hücrel ölümü hızlandıran patolojik bir durumdur (Apak ve diğ. 2016 a). ROS ve RNS, insanlar için vücut içi dengeyi (homeostaz) ve sağlığı korumak açısından gereklidir, ancak kontrolsüz ve fazla ROS/RNS, kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma dahil çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli rol oynar (Apak ve diğ. 2016). İnsan organizması aşırı ROS ve RNS seviyelerini dengelemek ve oksidatif gerilimi gidermek için 'antioksidatif savunma sistemleri' olarak adlandırılan savunma sistemleri geliştirmiştir. Antioksidan savunma sistemleri; serbest radikallerin ilk üretiminin engellenmesi, oksidanları daha az toksik bileşiklere dönüştürme, ikincil toksik metabolitlerin üretiminin bloke edilmesi, ikincil oksidanların zincir yayılımının engellenmesi, serbest radikallerin neden olduğu moleküler yaralanma gibi birçok işlevi vardır. Çeşitli hastalıklara yol açabilen oksidatif gerilim ile mücadele etmenin en önemli yollarından biri de radikal süpürücü bileşiklerce zengin gıdaların mevcut olduğu bir beslenmedir. Birçok çalışma meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oluşumunu engellediğini belirtmiştir.

Gıda numunelerinde antioksidan kapasite ve total fenolik içeriğini değerlendirmek için son yıllarda birkaç yeni analitik yaklaşım denenmiştir. Son zamanlarda, genel olarak araştırma kaynaklarının kullanımını modernleştirmek amacıyla duyarlı, hızlı, kolay, nispeten ucuz cihaz gerektiren ve küçük hacimlerle çalışmaya imkan sağlayan yöntemlere özel ilgi gösterilmektedir. Bu bakımdan nanoyapılar birkaç polifenolik bileşik sensöründe ve algılama stratejisinde kullanılmıştır. Farklı bilimsel makaleler ve incelemeler (Del Carlo ve diğ. 2008; Hayat ve diğ. 2014; Pérez-López ve diğ. 2011; Alarcon-Angeles ve diğ. 2016; Zhu ve diğ. 2015; Wang ve diğ. 2017), bu malzemelerin avantajlarını ve iyileştirmelerini vurgulayan bu nano-temelli yaklaşımın kullanımını ortaya koymuştur. Nanoyapılar ve işlevselleştirilmiş nanoyapılar, daha yüksek hassasiyet, kararlılık ve seçicilik sergileyen biyoalgılama performansını geliştirmek için katalitik araçlar, immobilizasyon platformları ve optik veya elektroaktif sensörler olarak kullanılmaktadır (Pérez-López ve diğ. 2011). Gıda antioksidanları için prob olarak kullanılan nanoparçacıkların çoğu uygulamaları altın (Au), gümüş (Ag), magnetit (Fe_3O_4) titanya (TiO_2) ve mangan dioksit (MnO_2) nanoparçacıkları ve kuantum dotların (QD) kullanımı ile ilişkilidir.

Literatürde metal oksit nanopartikül esaslı ile antioksidan aktivite tayini için spektrofotometrik tayin yöntemleri mevcuttur ancak bu yöntemlerin tayin hassasiyeti düşüktür ve hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidan tayini için seçimli değildir. Bu bağlamda geliştirilecek nanopartikül temelli antioksidan tayin yönteminin bu açığı kapatmada son derece önemli olacağı düşünülmektedir.

Literatürlerdeki mevcut olan bu eksikleri gidermek amacıyla antioksidan aktivite ölçümü için hızlı, maliyeti düşük ve kolay uygulanabilir mangan dioksit nanopartikül temelli bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Antioksidanların aktivite ölçümü için geliştirilen yöntemin tayin prensibi, sentezlenmiş mangan dioksit nanopartiküller ve kromofor bir reaktif olan 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) arasında meydana gelen redoks tepkimesi sonucu oluşan mavi renkli TMB katyonunun (nano prob) hidrofilik, lipofilik ve tiyollu antioksidanların varlığında mavi renginin azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Sentezlenen mangan dioksit nanopartiküllerin TMB substratı varlığında ortamda H_2O_2 olmaksızın peroksidaz ve oksidaz benzeri aktivite sergiledikleri kanıtlanmıştır.

Geliştirilen yöntemde standart antioksidan bileşiklerin kalibrasyon doğruları oluşturulup sentetik bir antioksidan olan troloks (TR) eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) belirlenmiştir. Kullanılan bileşiklerden ikili ve üçlü sentetik karışım çözeltileri hazırlanarak bu sentetik karışımların beklenen ve bulunan antioksidan kapasiteleri mM TR ekivalenti cinsinden hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın bir diğer aşamasında ise hazırlanan yeşil çay ekstraktına ve portakal suyuna standart antioksidan bileşiklerin katkısı yapılarak saf antioksidan bileşiklerle gerçek matriks karışımlar arasında kimyasal olarak sinerjik etkileşim olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada geliştirilen yöntemde antioksidan özellik göstermeyen bileşiklerin interferen etkisi incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. REAKTİF OKSİJEN/AZOT TÜRLERİ (OKSİDANLAR) VE OKSİDATİF GERİLİM

Oksijen, hücre metabolizması ve canlılığının sürdürülebilmesi için vazgeçilmez öneme sahip olması yanında aynı zamanda paramanyetik özelliklerinden dolayı büyük tehlike arz eden son derecede reaktif bir atomdur. Oksijenin sahip olduğu bu özellikler, yüksek reaktiviteye sahip kısmen oksitlenmiş ara maddelerin oluşumunu teşvik eder. Stabil nötr moleküllerde, elektronlar maksimum doğal stabilite olarak bilinen ilgili moleküler orbitallerinde eşleştirilir. Bu nedenle, bir yörüngede eşlenmemiş elektronlar varsa, yüksek oranda reaktif, elektron eksikliğini gidermek için herhangi bir molekülden bir elektronu yakalama eğiliminde olan moleküler türler üretilir. Triplet oksijenin iki serbest elektronu olduğu için ana serbest radikaldir. Biyolojik sistemlerde triplet oksijenin reaksiyon hızı yavaştır. Fakat metabolik olarak hücre sel bileşenlerle reaksiyona girebilen bir veya daha fazla reaktif ara maddeye dönüşmesi nedeniyle toksik hale gelebilir. Bu metabolik aktivasyon biyolojik sistemlerde tercih edilir, çünkü elektron taşıma zincirinde O_2 'nin H_2O 'ye indirgenmesi, bir elektronun serbest radikal veya ROS oluşturmak üzere transferi ile gerçekleşir (Valko ve diğ. 2007).

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren bağımsız varoluş yeteneğine sahip herhangi bir tür olarak tanımlanabilir. Eşleşmemiş bir elektron, kendisi tarafından atomik veya moleküler bir yörüngeyi işgal eden elektrondur. Canlı sistemlerde bazıları iyi, bazıları kötü ve bazıları hem iyi hem de kötü olmak üzere birçok serbest radikal bulunur. Bu serbest radikaller, tek bir elektron eklenmesi gibi çeşitli yollarla radikalik olmayan türlere dönüşebilir. (Halliwell, 2006). Serbest radikaller eşleşmemiş elektrona sahip olduğundan diğer bileşiklerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler ve bu nedenle genel olarak 'reaktif türler' olarak adlandırılırlar (Genestra, 2007).

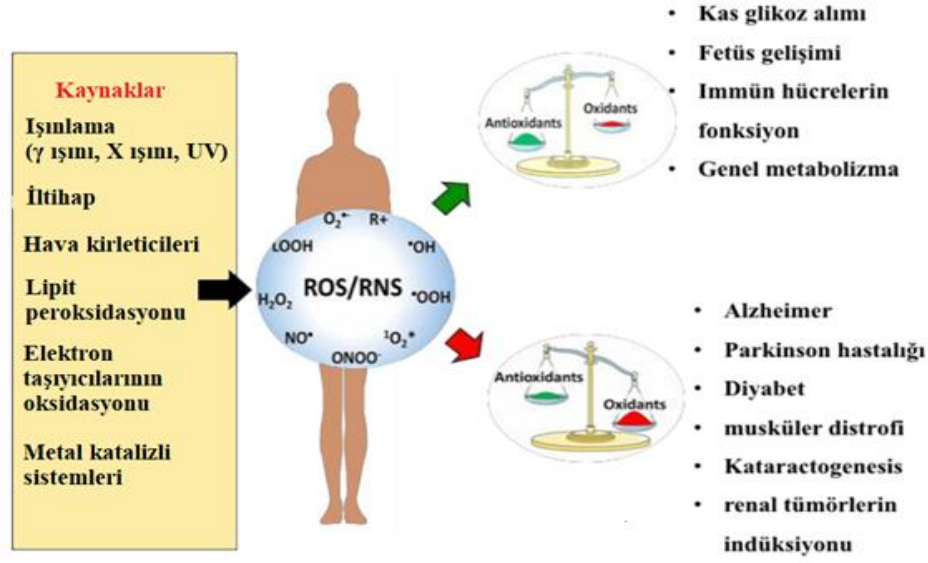
Biyolojik sistemdeki serbest radikaller, ultraviyole ışınlarının varlığında dolayı güneş radyasyonu gibi dışsal faktörler tarafından üretilebilir. Ultraviyole radyasyonu, moleküllerde bağların homolitik parçalanmasına neden olur. Serbest radikaller ayrıca bir hastalık sırasında ortaya çıkabilirler. Örneğin, bir kalp krizinde kalp kasına oksijen ve glikoz beslemesi askıya alındığında birçok serbest radikal üretilir. Serbest radikal oluşumunu teşvik eden diğer bir

eksojen faktör ise kimyasal zehirlenmedir. Organizma, kimyasal zehirlenmede toksik maddelerin daha az tehlikeli maddelere dönüştürmek için serbest radikal salınımını teşvik eder. Yiyeceklerde katkı maddelerinin, pestisitlerin, vb. varlığı da bir serbest radikal kaynağı olabilir (Pryor, 1976).

Antioksidan bileşiklerin reaksiyon mekanizmaları, serbest radikallerin reaktivitesi ve kimyasal yapısı ile bu reaktif türlerin bulunduğu ortam ile yakından ilgilidir. Bu nedenle, hem öncüler hem de serbest radikalleri içeren reaktif oksijen türlerini (ROS) ve daha az derecede reaktif azot türlerini (RNS) tanımlamak çok önemlidir (Salazar ve diğ. 2008).

Reaktif oksijen türleri, oksijen içeren radikal türler [süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$) ve ($RO\cdot$)] ve hipokloröz asit ($HOCl$), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi kolaylıkla radikale dönüşebilir bazı radikalik olmayan türler için sıklıkla kullanılan ortak bir terimdir. Reaktif azot türleri ise nitrik oksit radikali ($\cdot NO$), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$), azot dioksit radikali ($\cdot NO_2$), diğer azot oksitler ve $O_2^{\cdot-}$, $RO\cdot$ ve $ROO\cdot$ ile $\cdot NO$ 'nun reaksiyonundan açığa çıkan ürünleri içeren ortak bir terimdir (Apak ve diğ. 2016). Reaktif azot türleri kas gevşemesi, peristalsis, trombosit agregasyonu, kan basıncı modülasyonu, immün sistem kontrolü, fagositoz, hücrel enerji üretimi ve hücre büyümesinin düzenlenmesi gibi normal hücrel işlemler sırasında küçük miktarlarda üretilir (Limón ve Gonsebatt, 2009).

Oksidatif gerilim, söz konusu reaktif oksijen/azot türlerinin (ROS/RNS) lipid, protein, DNA gibi biyolojik makromoleküllerin oksidatif modifikasyonu sonucu doku hasarına yol açarak organizmanın antioksidatif savunmasını bastıran ve birçok hastalığın temeli olan hücrel ölümü hızlandıran patolojik bir durumdur (Apak ve diğ. 2016 a). ROS ve RNS, insanlar için vücut içi dengeyi (homeostaz) ve sağlığı korumak açısından gereklidir, ancak kontrolsüz ve fazla ROS/RNS, kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma dahil çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli rol oynar (Apak ve diğ. 2016).



Şekil 2.1: Serbest radikal kaynakları, insan sağlığına faydaları ve zararları.

2.2. ANTIOKSİDANLAR

Basit bir ifadeyle antioksidan, istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarını inhibe eden veya geciktiren bir maddedir. Göreceli konsantrasyonu ne olursa olsun oksidasyona uğrayan substrat bir gıda maddesi veya bir biyolojik makromolekül (lipid, protein, DNA vb.) olabilir ve antioksidanlar, reaktif türler (ROS, RNS veya hem ROS hem RNS) tarafından bu substrat üzerinde meydana gelebilecek oksidatif dönüşümü engelleyerek geri dönüşü olmayan tehlikeyi önlerler (Apak ve diğ. 2016).

Bir bileşiğin veya antioksidan sistemin temel özelliği, üretilen radikalın dengelenmesi ve böylece insan vücudundaki oksidatif hasarın azaltılmasına yardımcı olarak bir oksidatif yayılma zincirinin önlenmesi veya saptanmasıdır (Namiki, 1990). Gordon (Gordon, 1990) bu özelliklere sahip bir antioksidan sınıflandırması yapmıştır. Bunlar; birincil (zincir reaksiyonunu kıran, serbest radikal temizleyiciler) ve ikincil veya önleyici antioksidan olmak üzere iki tanedir. İkincil antioksidan mekanizmaları, metallerin deaktivasyonunu, istenmeyen uçucu maddelerin üretimini durdurarak lipid hidroperoksitlerin inhibisyonunu, birincil antioksidanların yenilenmesini ve singlet oksijenin ortadan kaldırılmasını içerebilir.

İnsan organizması aşırı ROS ve RNS seviyelerini dengelemek ve oksidatif stresi gidermek için 'antioksidatif savunma sistemleri' olarak adlandırılan savunma sistemleri geliştirmiştir. Antioksidan savunma sistemleri; serbest radikallerin ilk üretiminin engellenmesi, oksidantları

daha az toksik bileşiklere dönüştürme, ikincil toksik metabolitlerin üretiminin bloke edilmesi, ikincil oksidanların zincir yayılımının engellenmesi, serbest radikallerin neden olduğu moleküler yaralanma gibi birçok işlevi vardır. Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşurlar (Halliwell, 2007). Bunlardan enzimatik sistemler, özellikle süperoksit dismutazlar, katalazlar, glutatyon peroksidazlar ve ROS detoksifikasyonunda oldukça etkili olduğu bilinen tiyoredoksin sistemleri dahildir. Albümin ve antioksidan proteinler dışında (tiyoller ve bazı amino asitler bakımından zengin), insan organizmasında bulunan en temel küçük molekülü enzimatik olmayan antioksidanlar glutatyon, bilirubin, östrojenik cinsiyet hormonları, ürik asit, askorbik asit, koenzim Q, melanin, melatonin, a-tokoferol ve lipoik asittir (Apak ve diğ. 2016).

2.3. ANTIOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

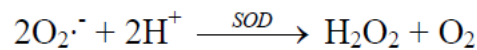
Hücrelerdeki endojen antioksidan bileşikler enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar (metabolik ve besin) olarak sınıflandırılabilirler.

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

ROS'un nötralleşmesinde doğrudan dahil olan temel enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GRx) dir. (Halliwell, 2007).

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

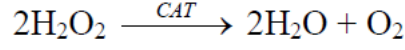
Süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürerek reaksiyonu katalizlenmesinden sorumludur.



SOD, hücredeki en önemli ve en güçlü detoksifikasyon enzimidir. SOD bir metaloenzimdir ve bu nedenle etkinliği için kofaktör olarak bir metal gerektirir. SOD tarafından kofaktör olarak gereken metal iyonunun tipine bağlı olarak, enzimin çeşitli formları vardır. (Fridovich, 1995; Dringen ve diğ. 2005).

2.3.1.2. Katalaz (CAT)

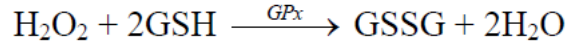
CAT, su ve moleküler oksijen üretmek için hidrojen peroksitin (H_2O_2) bozulmasını veya azalmasını katalize eder böylece SOD tarafından başlatılan detoksifikasyon işlemini tamamlar.



CAT, kofaktör olarak demir veya mangan kullanır. CAT, saniyede milyonlarca H_2O_2 molekülünü parçalamada oldukça etkilidir. CAT esas olarak peroksizomlarda bulunur ve ana işlevi, yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında oluşan H_2O_2 'yi elimine etmektir (Marklund, 1984; Chelikani ve diğ. 2004).

2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

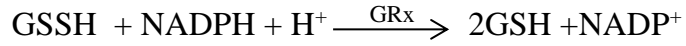
Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen glutasyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatona (GSSG) dönüştürmektedir. Glutasyon peroksidaz glutasyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücrel membranları korumaya yarar (Sheng ve diğ. 2004).



GPx, esas olarak mitokondride ve bazen de sitozolde olur (Góth ve diğ. 2004). GPx aktivitesi selenyuma bağlıdır. İnsanlarda en az sekiz enzim vardır GPx, GPx1-GPx8 (Morón ve diğ. 2012). Glutasyon peroksidazlar arasında, GPx1 en bol selenoperoksidazdır ve hemen hemen tüm hücrelerde bulunur. Enzim, lipid peroksidasyon sürecinin inhibe edilmesinde önemli bir rol oynar ve bu nedenle hücreleri oksidatif strese karşı korur (Gill ve Tuteja, 2010). Düşük GPx aktivitesi, fonksiyonel proteinlerde ve hücre zarının yağ asitlerinde oksidatif hasarına neden olur. GPx, özellikle GPx1, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın geliştirilmesinde ve önlenmesinde rol oynamaktadır.

2.3.1.4. Glutasyon Redüktaz (GRx)

Glutasyon redüktaz, GPx vasıtasıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatona (GSH) dönüşümünü katalize eder (Pektaş, 2009).



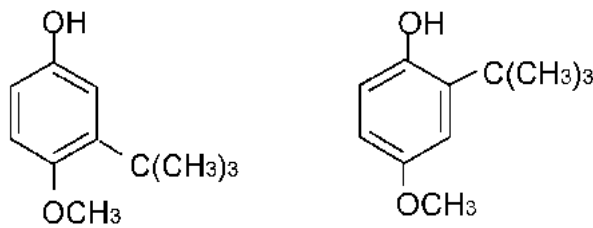
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.3.2.1. Sentetik Antioksidanlar

Şu anda gıdalarda kullanımına izin verilen sentetik fenolik antioksidanlar, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitolüen (BHT), propil gallat (PG) ve üçüncül-bütillhidrokinondur (TBHQ) (Makahleh ve diğ. 2015). Bu sentetik fenolik antioksidanlar, yağların ve lipit içeren yiyeceklerin işlenmesi ve depolanması sırasında lipid oksidasyonunun başlamasını önlemek veya geciktirmek amacıyla kasıtlı olarak eklenir ve gıda endüstrisi tarafından yaklaşık 60 yıldır kullanılmaktadır (Saad ve diğ. 2007).

2.3.2.1.1. BHA (Bütillenmiş Hidroksianisol)

BHA, bir monofenolik antioksidandır. Ticari BHA, iki izomer, 3-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%90) ve 2-terciyer-butil-4-hidroksianisol (%10) karışımı olan beyaz balmumu pulları halinde temin edilebilir (Şekil 4). BHA, yağlarda ve yağlarda çok çözünür ve suda çözünmez ve aromaların ve esans yağlarının renginin bozulmasının önlenmesinde daha etkili bir antioksidandır. BHA, özellikle tahıl ve şekerleme ürünlerinde kullanılan hindistan cevizi ve hurma çekirdeği yağlarında bulunanlar gibi kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunun kontrolünde özellikle etkilidir.



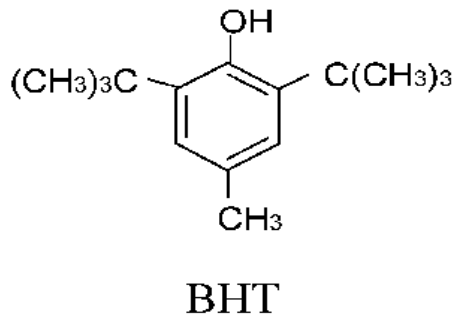
BHA

Şekil 2.2: BHA'nın kimyasal yapısı.

BHA'nın BHT, TBHQ veya PG gibi diğer antioksidanlarla sinerjistik etkisi, her bir antioksidanın katkısından beklenenden daha fazla antioksidan potansiyeline sahiptir (Nanditha ve Prabhasankar, 2008). BHA, pişmiş ve kızartılmış yiyeceklerin yanı sıra kuru tahıllarda, patates ürünlerinde, tatlı karışımlarında ve içeceklerde kullanılır (Dolatabadi ve Kashanian, 2010).

2.3.2.1.2. BHT (Bütillenmiş Hidroksitoluen)

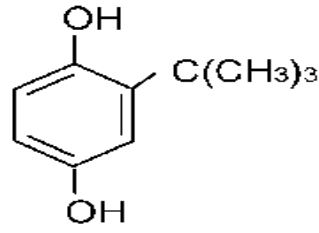
BHT ayrıca bir monofenol olup, beyaz kristal halinde bir bileşik olarak ticari olarak temin edilebilir. BHT, yağlarda ve yağlarda çözünür ve suda çözünmez ve hayvansal yağların bitkisel yağlardan oksidasyonunu baskılamasında daha etkilidir (Nanditha ve Prabhasankar, 2008). BHT, BHA ile sinerjistik olarak çalışır. 3-BHA ve BHT'nin bir kombinasyonu, soya yağı, domuz yağı ve metil oleatta tek başına kullanılanlardan daha yüksek bir antioksidan aktivite göstermiştir (Nanditha ve Prabhasankar, 2009).



Şekil 2.3: BHT'nin kimyasal yapısı.

2.3.2.1.3. TBHQ (Tersiyer bütihidrokinon)

TBHQ (Şekil 4), doymamış bitkisel yağlar, birçok yenilebilir hayvansal yağ ve et ürünü için oldukça etkili bir koruyucudur. Demir varlığında bile renk atmasına neden olmaz ve eklendiği malzemenin lezzetini veya kokusunu değiştirmez (Kashanian ve Dolatabadi, 2009). TBHQ'daki iki para-hidroksil grubu, antioksidan aktivitesinden sorumludur (Nanditha ve Prabhasankar, 2009). TBHQ, bir yarı kinon rezonans hibriti oluşturmak için peroksil radikalleriyle reaksiyona girer. Yarı kinon radikal ara maddesi, daha kararlı ürünler oluşturmak için farklı reaksiyonlara maruz kalabilir. Bir dimer üretmek için birbirleriyle reaksiyona girebilirler veya bir kinon ve bir hidrokinon molekülü üretmek için birbirleriyle reaksiyona girebilirler veya bir yarıkinon üretmek için bir lipit peroksil radikale eklenebilirler (Shahidi ve Naczki, 2003). Yüksek dozlarda TBHQ, laboratuvar hayvanlarında mide tümörlerinin prekürsörü ve DNA'daki hasar gibi bazı olumsuz sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

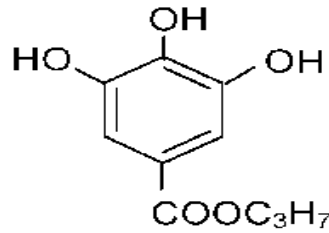


TBHQ

Şekil 2.4: TBHQ'nın kimyasal yapısı.

2.3.2.1.4. Propil Gallat (PG)

Propil gallat, gallik asidin propil alkol ile esterleştirilmesi ve ardından fazla alkolün damıtılarak ortamdan çıkarılması ile ticari olarak hazırlanır. Beyaz kristalimsi bir toz halinde temin edilebilir. Etanolde çözünür, suda çözünmez (Zurita ve diğ. 2007). Propil gallat, 1948'den bu yana kozmetik ve gıda ambalaj malzemelerini ve yağ içeren yiyecekleri stabilize etmek için, enilebilir yağlara, mayonezlere, trans yağlara, basınca duyarlı yapıştırıcılara katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Shahidi ve Naczki, 2003).



PG

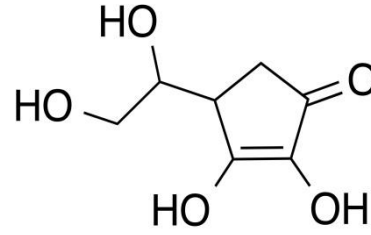
Şekil 2.5: PG'nin kimyasal yapısı.

2.3.2.2. Doğal Antioksidanlar

Bir organizma yüksek bir ROS konsantrasyonuna maruz kaldığında, endojen antioksidan sistemi tehlikeye girer ve sonuç olarak organizmanın tamamen korunmasını garanti edemez. Bu antioksidanlar açığını telafi etmek için vücut, gıda, besin takviyeleri veya farmasötik maddeler yoluyla sağlanan dışsal antioksidanları kullanabilir. En önemli ekzojen antioksidanlar arasında fenolik bileşikler karotenoidler, C vitamini, tokoferoller ve selenyum, çinko gibi bazı mineraller bulunur (MacDonald-Wicks ve diğ. 2006).

2.3.2.2.1. C Vitamini

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini, diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan süpürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır (Hudson, 1990). Askorbik asit, fizyolojik olarak önemli ROS'ların çoğu ile kimyasal olarak reaksiyona girme kabiliyetine sahiptir. Askorbik asit antioksidan reaksiyon mekanizmaları; singlet oksijenin etkisizleştirilmesine, moleküler oksijenin ortadan kaldırılmasına (Sisein, 2014; Lee, 2004) lipid peroksidasyonu sonucu oluşan peroksil radikallerine elektron vererek inaktif hale getirmesine ve serbest radikallerin hücre membranına ulaşmadan süpürülmesine dayanır (Durmaz, 2002).

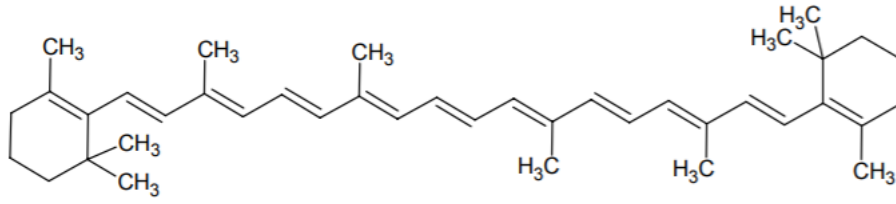


Şekil 2.6: Askorbik asitin (C vitamini) kimyasal yapısı.

2.3.2.2.2. Karotenoidler

Karotenoidler hemen hemen tüm bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunur. 700'den fazla karotenoid tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Britton, 2004). Karotenoidler karakteristik olan sarı, kırmızı ve oranj renk özelliklerini konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır (Carmen, 2007). Karotenoidlerin çoğu karakteristik bir simetrik tetraterpen iskeletine sahiptir. Genel olarak, karotenoidlerin antioksidan özellikleri, elektron bağıışı için yüksek kapasiteleri ile ilgilidir.

Karotenoidler, mükemmel peroksil radikal temizleyicileri olarak tanımlanır. Karotenoidlerin baz yapısını oluşturan çoklu doymamış zincirler bu bileşiklere lipofilik bir karakter verir. Karotenoidler, hücre zarlarının ve lipoproteinlerin peroksil radikallerine karşı korunmasında önemli bir rol oynamaktadır.



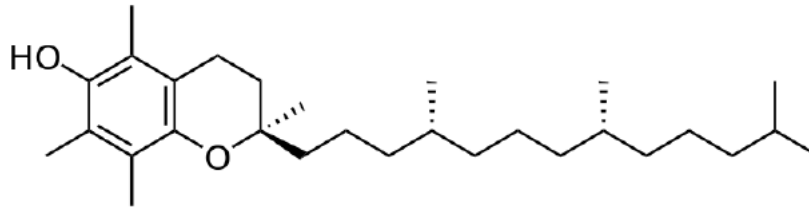
Şekil 2.7: β -karotenin kimyasal yapısı.

2.3.2.2.3. Tokoferoller

Tokoferoller ve tokotrienoller (topluca tokoller olarak bilinir), monofenolik bileşiklerdir ve besin içinde E vitamini aktivitesine sahip sekiz kromanol homolog grublarını içerir (Blekas, Tsimidu ve Bosku, 1995). Tokoferoller, kroman halkalarına bağlı metil gruplarının sayısına ve pozisyonuna bağlı olarak, α -, β -, γ - veya δ - ön eki alırlar. α -Tokoferol, E vitamininin en aktif formudur.

Tokoferoller ve tokotrienoller, antioksidan olarak lipit peroksil radikallerinin süpürmeleri ve singlet oksijeni södürmeleri olmak üzere iki ana rol oynamaktadır (Munne-Bosch ve Alegre, 2002). Tokollerin antioksidan aktivitesi, temel olarak fenolik hidrojenlerini lipit serbest radikallerine bağışlama yeteneklerinden kaynaklanmaktadır (Kamal-Eldin ve Budilarto, 2015).

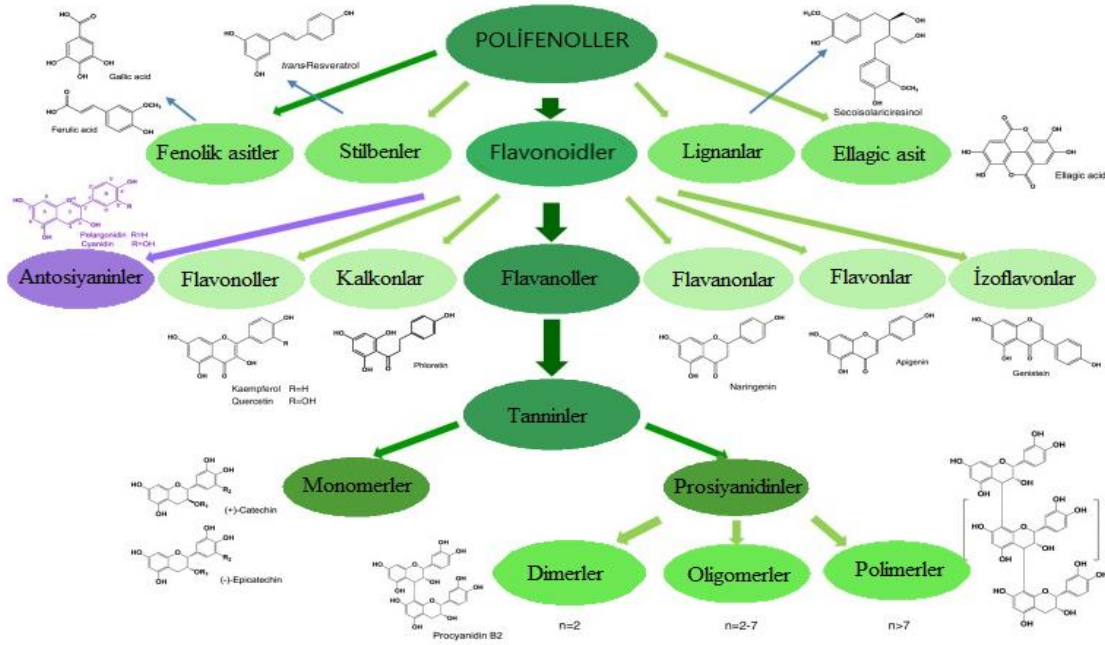
Tokoferoller, yağlı tohumlarda, yapraklarda ve bitkilerin diğer yeşil kısımlarında bulunur. α -Tokoferol esas olarak bitki hücrelerinin kloroplastlarında bulunurken, β -, γ - ve δ -homologları genellikle bu organellerin dışında bulunur. Buna karşılık, tokotrienoller bitkilerin yeşil kısımlarında bulunmaz, aksine bazı tohum ve tahılların kepek ve tohum fraksiyonlarında bulunur (Kamal-Eldin ve Appelqvist, 1996).



Şekil 2.8: α -tokoferolün kimyasal yapısı.

2.3.2.2.4. Polifenolik Bileşikler

Besin fenolikleri veya polifenoller, bitki krallığındaki en çok sayıda ve yaygın olarak dağıtılmış doğal ürün gruplarından birini oluşturur. Halen 8000'den fazla fenolik yapı bilinmektedir ve bunların arasında 4000'den fazla flavonoit tanımlanmıştır. Meyveler, sebzeler, kepekli tahıllar ve çay, çikolata ve şarap gibi diğer yiyecek ve içecek türleri, polifenollerin zengin kaynaklarıdır. Polifenollerin bitkilerde çeşitliliği ve geniş dağılımı, doğal olarak oluşan bu bileşiklerin sınıflandırılmasında farklı yollara yol açmıştır. Polifenoller kökenleri, biyolojik fonksiyonları ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmıştır (Harborne and Williams, 2000; Cheynier, 2005).



Şekil 2.9: Polifenollerin sınıflandırılması.

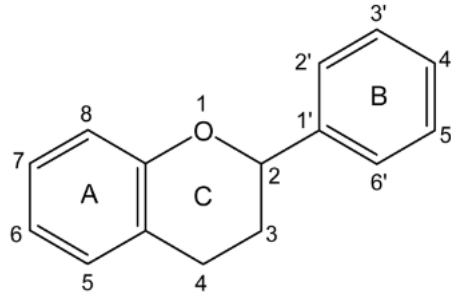
Polifenoller antioksidan olarak tanımlayabilmek için iki özelliğe sahip olması gerekir. Birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilmeli, oksidasyonu önleme veya yavaşlatma özelliğine sahip olması, ikincisi ise kendisi serbest radikallere dönüştüğüne yapısının stabil bir formda kalabilmesidir (Scalbert ve diğ. 2005).

2.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN SINIFLANDIRILMASI

2.4.1. Flavonoidler

Fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridirler (Heim ve diğ. 2002). Flavonoidler, iki C₆ ünitesinin (A halkası ve B halkası) fenolik yapıya sahip olduğu C₆-C₃-C₆ genel yapısına sahip onbeş karbon atomunu kapsayan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Hidroksilasyon modeli ve heterosiklik halka şeklinde olan C halkasında meydana gelen değişimler flavonoidleri flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (flavan-3 ol), izoflavonlar ve antosiyanidinler olarak alt gruplara ayırır. C halkasındaki farklılıklar nedeniyle, flavonoidler ayrıca antosiyanidinler, flavan-3 ol, flavonlar, flavanonlar ve flavonoller gibi farklı alt gruplara ayrılabilir.

Flavonoidlerin büyük çoğunluğu B halkasını C halkasının C₂ pozisyonuna bağlıyken, B halkasını sırasıyla C halkasının C₃ ve C₄ pozisyonuna bağlı olan izoflavonlar ve neoflavonoidler gibi bazı flavonoidler de vardır.

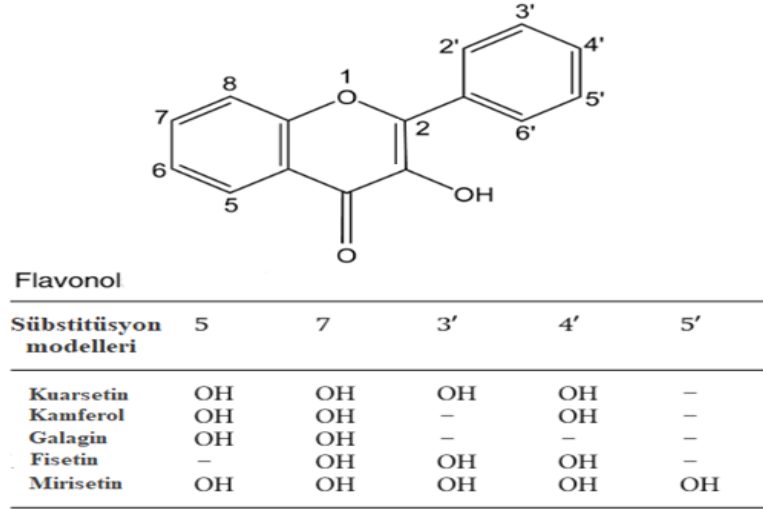


Şekil 2.10: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

2.4.1.1. Flavonoller

Flavonoller, keton grubu olan flavonoidlerdir. Proantosiyaninlerin yapı taşlarıdır. Flavonoller, çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. En çok çalışılan flavonoller kamferol, kuarsetin, mirisetin ve fisetin'tir. Flavonlarla karşılaştırıldığında flavonoller, C halkasının 3 konumunda, ayrıca glikosile edilebilecek bir hidroksil grubuna sahiptir. Flavonlar gibi, flavonoller de metilasyon ve hidroksilasyon modellerinde çok çeşitlidir ve farklı glikosilasyon modellerine bakıldığında, meyvelerde ve sebzelerde belki de en yaygın ve en büyük flavonoidler grubudur. En yaygın flavonol aglikonları, quercetin ve kaempferol, sırasıyla en az 279 ve 347 farklı glikosidik kombinasyonuna sahiptir (Laura ve diğ. 2010; Andersen and

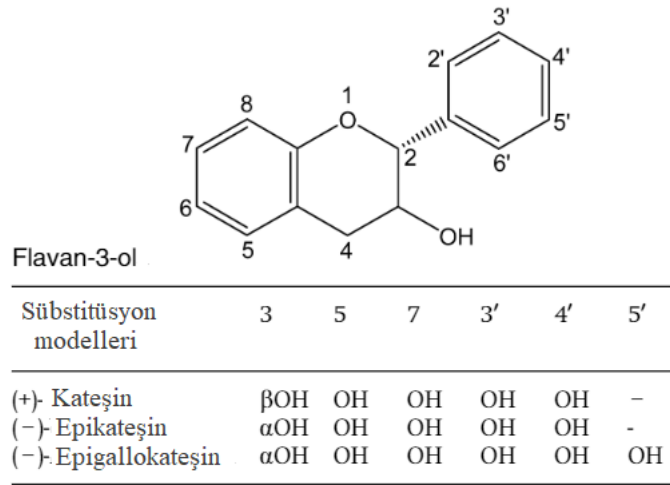
Markham, 2005). Soğan, lahana, marul, domates, elma, üzüm ve meyveler zengin flavanol kaynaklarıdır. Meyve ve sebzelerin yanı sıra çay ve kırmızı şarap da flavanol kaynağıdır.



Şekil 2.11: Flavanolun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.1.2. Flavanoller

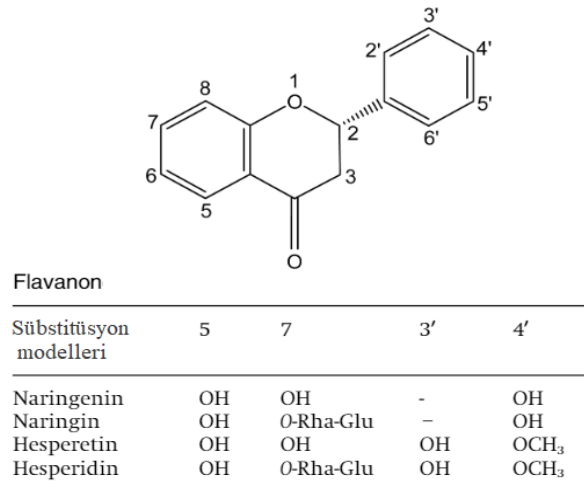
Flavanoller, C₃ atomunda bir -OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Flavanoller veya flavan-3-ol'lara genellikle kateşinler denir. Flavonoidlerin çoğundan farklı flavanollerin C halkasında C₂ ile C₃ arasında çift bağ ve C₄' deki karbonil grubu yoktur. Flavanoller, üzüm, elma ve yaban mersini gibi pek çok meyvede ve özellikle meyvelerin kabuğunda bulunur (Tsao, 2013). Monomerik flavanoller (kateşin ve epikateşin), türevleri ise çay yaprakları ve kakao çekirdeğinde (çikolata) bulunan başlıca flavonoidlerdir.



Şekil 2.12: Flavanolun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.1.3. Flavanonlar

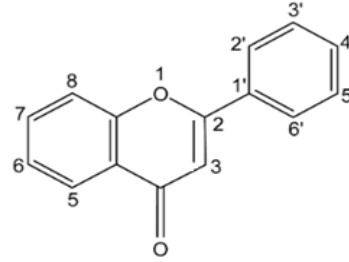
Flavanonlar, genellikle portakal, limon ve üzüm gibi tüm narenciye meyvelerinde bulunan önemli bir sınıftır. Hesperitin, naringenin ve naringin buna örnektir. Narenciye flavonoidleri, antioksidan, antienflamatuar, kan lipidini düşürücü ve kolesterol düşürücü ajanlar gibi ilginç farmakolojik etkiler gösterir. Son 15 yılda tanımlanan flavanonların ve bunların 3-hidroksi türevlerinin (dihidroflavonol olarak da adlandırılan flavanonoller) sayısı önemli ölçüde artmıştır.



Şekil 2.13: Flavanonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.1.4 Flavonlar

En önemli flavonlar; rutin, apigenin, krisin ve luteolin'dir. Rutin kuersetinin glikozidi olup kırmızı şarap ve domateste mevcuttur (Harborne ve Williams, 2000). Ayrıca maydonoz, kereviz sapı, domates kabuğu, turunçgiller ve kırmızı biber flavon kaynağıdır.

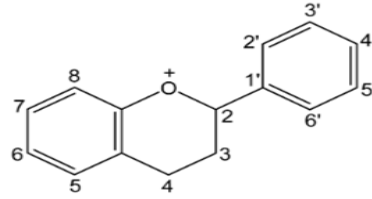


Flavon	5	7	3'	4'
Süstitüsyon modelleri				
Apigenin	OH	OH	-	OH
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Krisin	OH	OH	-	-

Şekil 2.14: Flavonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.1.5. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, çiçek yapraklarının, meyvelerin ve sebzelerin çoğunluğunun kırmızı, mavi ve mor pigmentlerinin ve siyah pirinç gibi bazı özel tahıl çeşitlerinin temel bileşenleridir. Bitkilerdeki antosiyanidinler, çoğunlukla, antosiyaninler olarak adlandırılan glikosidik formlarda bulunur. Siyanidin, delphinidin ve pelargonidin en fazla bulunan antosiyanidinlerdir. Antosiyaninlerin %90'ı siyanidin, delphinidin ve pelargonidin ve bunların metillenmiş türevlerini temel alır (Anderson ve Jordheim, 2006). Hidroksilasyona, B halkasındaki metoksilasyon modellerine ve farklı şeker birimleri ile glikosilasyona bağlı olarak toplam 500'den fazla antosiyanin bilinmektedir (McCallum ve diğ.). Antosiyaninlerin rengi pH' a bağlıdır, yani asidik olarak kırmızı ve bazik koşullarda mavidir. Bununla birlikte, aromatik halkaların hidroksilasyon derecesi, metilasyon modeli ve glikosilasyon modeli gibi diğer faktörler de antosiyanin bileşiklerinin rengini etkileyebilir. Vişne, çilek, kırmızı üzüm gibi renkli meyveler, şarap antosiyanidinler kaynaklarıdır.



Antosiyanidin

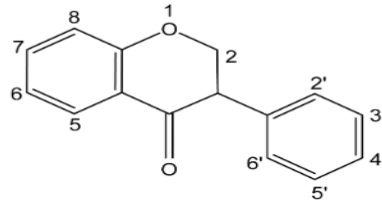
Süstitüsyon modelleri	3	5	7	3'	4'	5'
Siyanidin	OH	OH	OH	OH	OH	-
Siyanin	O-Glu	OH	OH	OH	OH	-
Peonidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	-
Delphinidin	-	OH	OH	OH	-	OH
Pelargonidin	OH	OH	OH	-	OH	-
Malvidin	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Glu: Glukosit, Rha-Glu: Rhamnoglukosil

Şekil 2.15: Antosiyanidin'in genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.1.6. İzoflavonlar

İzoflavonlar da B halkası, C halkasının C₃ pozisyonuna bağlıdır. (Şekil 2.15). İzoflavonlar arasında, daidzein, genistein ve glisitein ön plana çıkmaktadır. İzoflavonlar çoğunlukla fasulye, özellikle soya fasulyesi ve diğer baklagil ailesinde bulunurlar. Ayrıca kırmızı yoncalarda bulunurlar (Wang ve Murphy, 1994).



İzoflavon

Süstitüsyon modelleri	5	7	4'
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	O-Glu	OH
Daidzein	-	OH	OH
Daidzin	-	O-Glu	OH
Ononin	OH	O-Glu	CH ₃

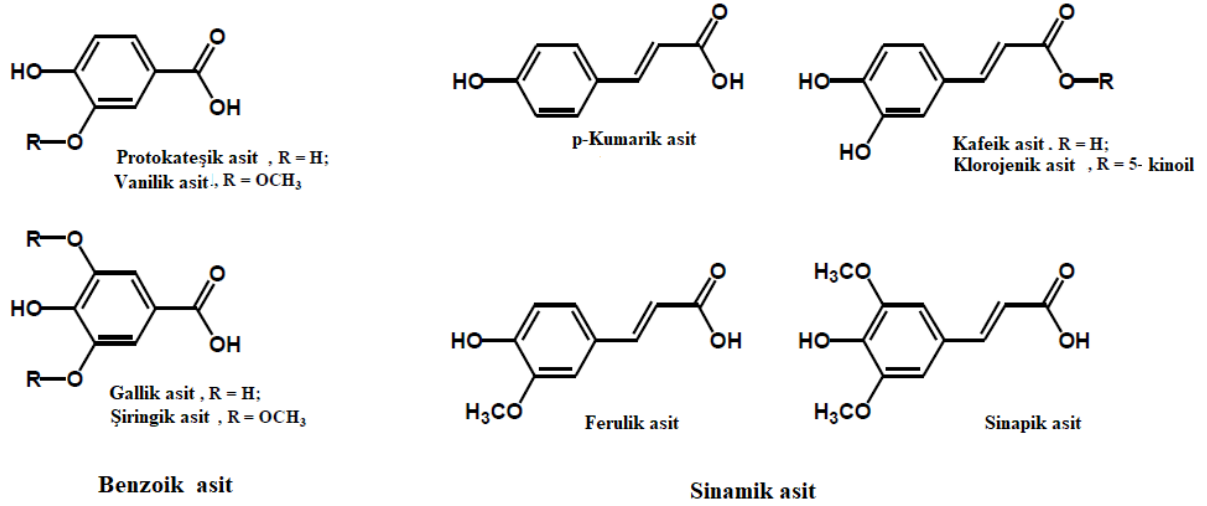
Şekil 2.16: İzoflavonun genel kimyasal yapısı ve süstitüsyon modellerine göre adları.

2.4.2. Fenolik Asitler

Fenolik asitler, benzoik asit ve sinamik asit türevleri olmak üzere iki ana tipe ayrılabilen flavonoid olmayan polifenolik bileşiklerdir. Meyveler ve sebzeler birçok serbest fenolik asit içerirken, tahıllarda ve tohumlarda fenolik asitler genellikle bağlı formdadır.

Fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösteren sinamik asit türevleri arasında; ferulik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve sinapik asit

ön plana çıkmaktadır. Benzoik asit türevlerinden ise salisilik asit, phidroksibenzoik asit, protokateşik asit, siringik asit, gallik asittir ön plana çıkmaktadır (Kim ve diğ. 2006).

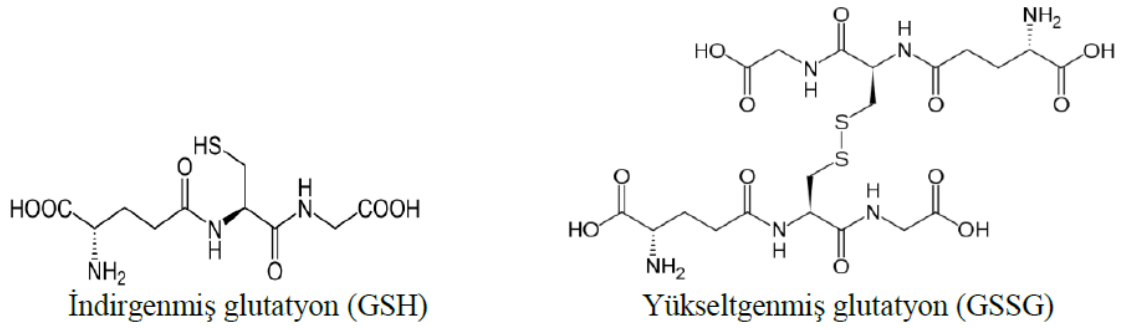


Şekil 2.17: Fenolik asit bileşiklerinin genel kimyasal yapısı.

2.4.3. Tiyollü Antioksidanlar

2.4.3.1. Glutasyon

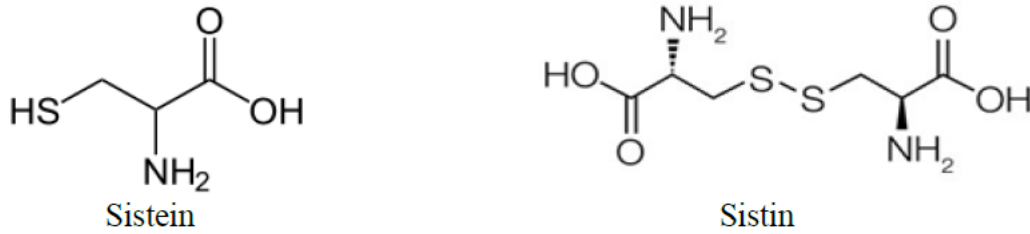
Glutasyon (GSH); glutamik asid sistein ve glisinden oluşan, intraselüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutasyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sürdürüp hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Proteinlerdeki -SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra amino asitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar. Oksidatif stres sonucunda artan ROS'un hücrelerden arındırılmasını, glutasyonun indirgenmiş formunun (GSH) yükseltgenmiş formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır (Curello ve diğ. 1987).



Şekil 2.18: GSH ve GSSH' in kimyasal yapısı.

2.4.3.2. Sistein

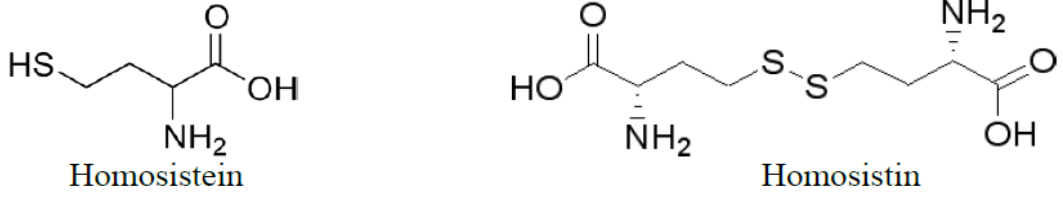
Glutatyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar açısından önemlidir. Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında önemli rolü olan GSH' ın sentetik bir ön maddesidir. Sistein, protein sentezi, detoksifikasyon ve metabolizmanın yanı sıra, birçok önemli hücrel fonksiyonda rol oynar (Nath ve Salahudeen, 1993).



Şekil 2.19: Sistein ve sistin bileşiğinin kimyasal yapısı.

2.4.3.2. Homosistein

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit), kükürt kimyası ve metabolizması üzerine yaptığı araştırma sırasında ilk kez 1932'de du Vigneaud tarafından sentezlenen bir amino asittir. Serbest bir tiyol parçası içeren ve bu nedenle fizyolojik matrisler içinde birkaç önemli role sahip olan önemli bir amino asittir. Doğrudan diyetle bulunmamasına rağmen, metiyoninin sisteine metabolizması sırasında oluşan bir ara maddedir. Temel bir amino asit olan metiyonin, vücuttaki tek homosistein kaynağıdır. Homosisteinin yükseltgenmiş hali homosistindir (Moldeus ve diğ. 1986).

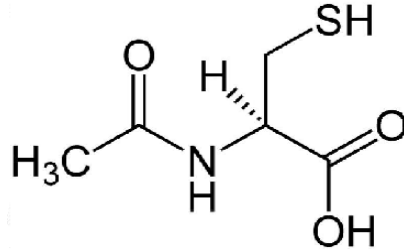


Şekil 2.20: Homosistein ve homosistin bileşiğinin kimyasal yapısı.

2.4.3.3. N-asetil sistein

N-asetil sistein, mukolitik bir ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun ön maddesidir ve etkili bir antioksidan olan glutatyon oluşumunda rol oynar. N-asetil sistein, ‘in vivo’ ve ‘in vitro’ koşullarda bir antioksidan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. N-asetil sistein, kuvvetli bir hipokloroz asit süpürücüdür. Aynı zamanda iyi bir hidroksil radikali süpürücüdür (Zafarullah ve diğ. 2003).

N-asetil sistein (NAC), özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD) tedavisinde uzun yıllardan beri yaygın bir şekilde mukolitik ilaç olarak kullanılan tiyol içeren bir bileşiktir. NAC, son zamanlarda parasetamol zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmıştır. Her iki durumda da ilacın bunları etkisizleştirdiği ve tolere ettiği görülmüştür (Cotgreave, 1997).

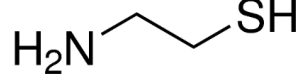


Şekil 2.21: N-Asetil sistein bileşiğinin kimyasal yapısı.

2.4.3.4. Sisteamin

Sisteamin sisteinden oluşan -SH grubu taşıyan bir biyojen amindir. Vücutta sisteine dönüşebilir ve sistein disülfid bağları halinde sistin olarak lizozomlar içerisinde depolanır. Antioksidan ve antiklastojenik etkilere sahip bir madde olup, sistinozisin tedavisinde kullanılır. Asetil CoA'nın yapısına girdiğinden hücre metabolizmasında önemli görevleri vardır. Metanobakterilerde 2-merkaptotanosülfonik asit yer almaktadır. Sisteamin somatostatin sentezini azalttığından büyümeyi teşvik etmektedir. Parasetamol zehirlenmelerinde sisteaminin kullanılmasıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca

sisteamin, oksidatif strese karşı korunmada anahtar rol oynayan glutatyon miktarını artırır (Miller ve Schlesinger, 1993).



Şekil 2.22: Sisteamin bileşiğinin kimyasal yapısı.

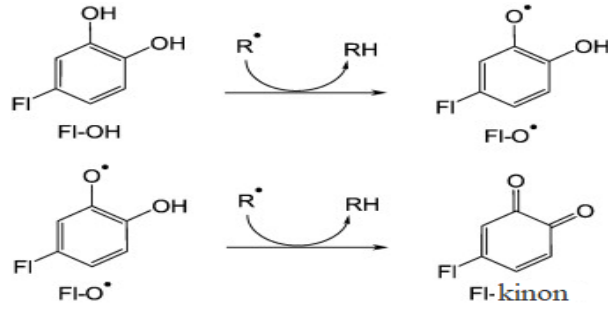
2.5. FLAVONOİD BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ

Birçok flavonoidlerin antioksidan kapasiteleri C ve E vitaminlerinden çok daha güçlüdür. Örneğin, standart şartlar altında epigallocatechin gallatin bir elektron indirme potansiyeli 550 mV, glutatyonun 920 mV, a-tokoferolün ise 480 mV' dir (Frei ve Higdon, 2003; Jovanovic ve diğ. 1996; Prior ve Cao, 2000).

Flavonoidler, serbest radikallerin yol açtığı hasarı aşağıdaki mekanizmalarla önleyebilir:

- 1) Reaktif oksijen türlerinin (ROS) doğrudan temizlenmesi,
- (2) Antioksidan enzimlerin aktivasyonu (Nijveldt ve diğ. 2001),
- (3) Metal şelatlama etkinliği (Ferrali ve diğ. 1997),
- (4) α -Tokoferil radikallerinin indirgenmesi (Hirano ve diğ. 2001),
- (5) Oksidazların inhibisyonu (Heim ve diğ. 2002),
- (6) Nitrik oksitten kaynaklanan oksidatif stresin azaltılması (Vanacker ve diğ. 1995).

Flavonoidler serbest radikalleri doğrudan hidrojen atomu vererek temizleyebilirler. Radikaller, aşağıdaki denkleme göre etkisiz hale getirilir (R: serbest bir radikal ve Fl-O: flavonoid fenoksil radikali).

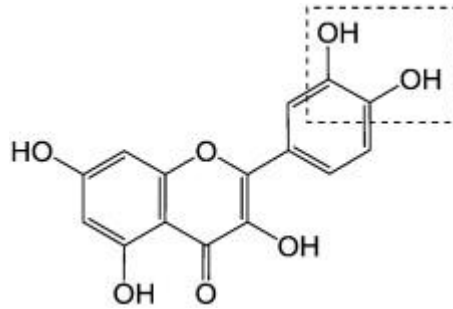


Şekil 2.23: Flavonoidlerin reaktif oksijen türlerinin (R) süpürülmesinde serbest radikalın (FI-O), ikinci bir radikal ile reaksiyona girerek stabil bir kinon yapısını oluşması.

İn vitro flavonoid antioksidan aktivitesi, fonksiyonel grupların çekirdek yapısı üzerindeki düzenlenmesine bağlıdır. Hem konfigürasyon hem de toplam hidroksil grubu sayısı, antioksidan aktivitenin mekanizmasını büyük ölçüde etkiler (Heim ve diğ. 2002). B halkası hidroksil konfigürasyonu, ROS süpürmenin en önemli belirleyicisiyken (Burda ve Oleszek, 2001) A ve C halkalarının süstitüsyonları süperoksit anyon radikal süpürme hızı sabitleri üzerinde çok az etkisi vardır.

Etkili bir radikal süpürme işlemi için gerekli olan flavonoidlerin temel yapısal özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir.

a) Elektron delokalizasyonu için B halkasında bir orto-dihidroksi (kateşol) yapısı (şekil 2.24)

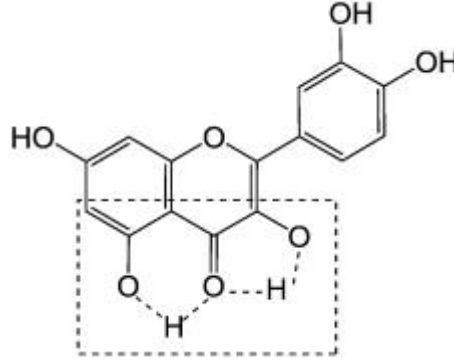


Şekil 2.24: B halkasında bir orto-dihidroksi (kateşol) yapısı.

B halkası hidroksil konfigürasyonu, ROS (Cao ve diğ. 1997) ve RNS (Haenen ve diğ. 1997)'nin süpürülmesinde en önemli belirleyicisidir. Örneğin, luteolinin peroksil radikal süpürme kabiliyeti büyük ölçüde kamferolü aşmaktadır. Her ikisi de aynı hidroksil konfigürasyonlarına sahiptir, ancak kamferol, B halkası kateşolünden yoksundur. Kateşol sistemlerinden yoksun olan flavonlar zayıf süpürücü olup kararsız radikaller oluştururlar B halkası üzerindeki hidroksil grupları, hidroksil, peroksil ve peroksinit radikallerine hidrojen

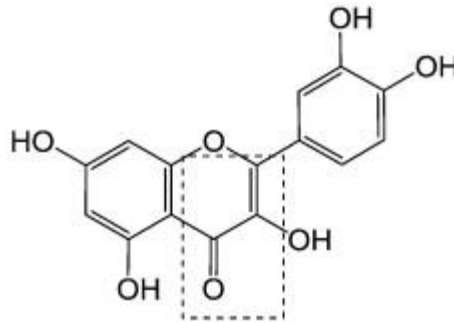
atomu veya elektronu vererek stabilize eder ve nispeten stabil bir flavonoid radikaline yol açar (Van Acker vadiğ. 1996).

b) 3 ve 5 numaralı pozisyonlardaki hidroksil grupları, okso grubuna hidrojen bağı sağlar. (şekil 2.25)



Şekil 2.25: 3. ve 5. pozisyonlardaki hidroksil grupları.

c) C halkasında 4-okso fonksiyonu ile 2,3-çift bağı konjugasyonu B halkasında elektron delokalizasyonu sağlar. (şekil 2.26)



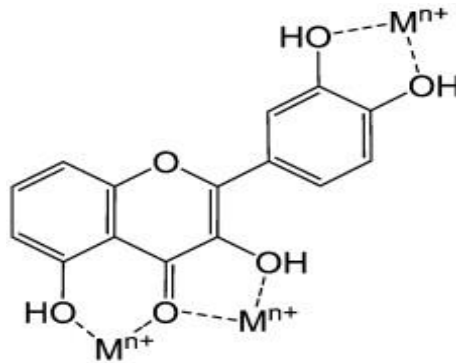
Şekil 2.26: C halkasında 4-okso grubu ile 2,3-çift bağı konjugasyonu.

Flavonoid yapısal sınıfları arasında 4-okso işleviyle birlikte doymamış bir 2-3 bağına varlığı veya yokluğu ayırt edici bir özelliktir. 2-3 doymamışlık ve 4-karbonil grubunun önemini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda 4-karbonil grubu ile birlikte 2-3 çift bağı içeren flavonoidler doymuş heterosikler ile karşılaştırıldığında doymamış heterosiklik, bir mikrozomal sistemde daha düşük %50 inhibite konsantrasyon (IC50) değerleri sergilerler. Buda 4-karbonil grubu ile birlikte 2-3 çift bağı içeren flavonoidlerin daha güçlü antioksidan aktivite sergilediğinin göstergesidir (Cholbi ve diğ. 1991).

Hidroksil radikalleri biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve en zararlı ROS'dur. Demir (II) ile hidrojen peroksit ile reaksiyonu sonucunda biyomolekülleri oksitleyebilen hidroksil radikalini üretilir (Galey, 1996). Fenton reaksiyonu olarak bilinen bu işlemde, hidroksil radikal üretimi

doğrudan bakır veya demir konsantrasyonu ile ilişkilidir (Sugihara ve diğ. 1999; Sahu ve Gray, 1997). Fenton kaynaklı oksidasyon, 3', 4'-katekol, 4-okso ve 5-OH düzenlemelerine sahip flavonoidler tarafından kuvvetle inhibe edilir. İki değerli katyonlarla şelatlama kompleksleri, 5-OH ve 4-okso grubu arasında veya 3' ve 4'-OH arasında oluşabilir (Cheng ve Breen, 2000). Polihidroksillenmiş flavonoidler hem metal şelatlama özellikleri hem de radikal temizleme kabiliyeti sayesinde, Fenton reaksiyonunun in vivo inhibitörleri olarak önemli bir yarar sağlarlar. Bu polifenollerin, metal kaynaklı olmayan oksidasyona kıyasla, metal kaynaklı oksidasyon inhibitörleri genellikle daha etkili olduğu serbest radikal hasarının flavonoid inhibisyonunda metal şelasyonunun rolünü desteklemektedir.

Kateşol grubu, 3 ve 5 numaralı pozisyonlardaki hidroksil grupları ve 4-okso grupları demir ve bakır gibi transisyon metalleri için şelatlama yeteneği sağlar. Spesifik flavonoidlerin demir ve bakır şelatladığı ve böylece serbest radikallerin gelişmesini ortadan kaldırdığı bilinmektedir. İki değerli bir katyonun şelasyonu, kompleks ROS süpürme aktivitesini koruduğu için flavonoid'i pasif hale getirmez. Pietta (Pietta, 2000), flavonoidlerin molekülündeki iz metaller için bağlanma bölgelerinin, B halkası içindeki kateşol yapısından, heterosiklik C halkasındaki 3-hidroksil ve 4-okso grupları ve C ve A halkaları arasındaki 4-okso ve 5-hidroksil grupları olduğunu ileri sürdü. B halkasındaki kateşol kısmının Cu^{2+} -kelat oluşumu için önemli olduğu ve bu nedenle metal şelasyonunun ana katkı yapan bölgesi olduğu gösterilmiştir (Brown ve diğ. 1998). Kuarsetin, özellikle, demir şelatlayıcı ve demir-dengeleyici özellikleri ile bilinmektedir.



Şekil 2.27: İz metaller için bağlama yerleri.

Hirano ve diğ. (Hirano ve diğ. 2001), flavonoidlerin, potansiyel bir prooksidant olan a-tokoferil radikaline hidrojen vericisi olarak görev yapabileceğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca

flavonoidlerin, α -tokoferil kökü ile etkileşerek, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu geciktirmek için büyük bir potansiyele sahiptirler.

Flavonoidler, ksantin oksidaz (Hanasaki ve diğ. 1994) ve protein kinaz C (Ursini ve diğ. 1994) gibi süperoksit anyonu (O_2^-) üretiminden sorumlu enzimleri inhibe eder. Cos ve diğ. (Cos ve diğ. 1998), luteolin'in ksantin oksidazın en güçlü inhibitörü olduğu bildirilen yapı-aktivite ilişkisi üzerine bir çalışma yürütmüştür. Flavonoidlerin ayrıca siklo oksijenaz, lipoksijenaz, mikrozomal sukinoksidaz ve NADH oksidazı inhibe ettiği gösterilmiştir.

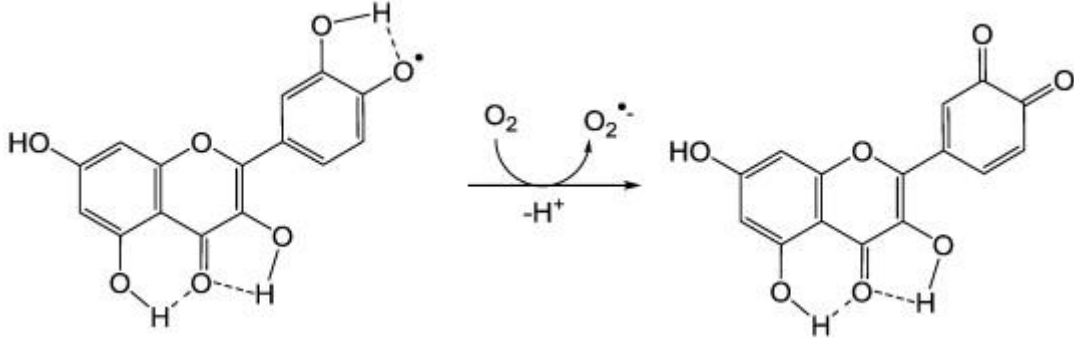
Nitrik oksit (NO), kan damarlarının genişlemesini sürdürmede önemlidir (Huk ve diğ. 1998), ancak yüksek konsantrasyonları oksidatif hasara neden olabilir. NO, NO sentazları (NOS) tarafından katalize edilen L-arginin oksidasyonu ile üretilir. Flavonoidler, çeşitli lipopolisakaritle aktive edilmiş hücre çizgileri ve kültürlerinde NO üretimini inhibe edici aktivite göstermiştir. Ancak flavonoidlerin NOS ve NO üretiminin nasıl inhibe ettiği henüz tam olarak anlaşılmadığı için bazı olasılıklar öne sürülmüştür. İlk olasılık, flavonoidlerin antioksidan özelliklerinden kaynaklanabilir. İkinci olasılık, flavonoidlerin lipopolisakarit sinyal molekülü inhibitörleri gibi davranabilmesidir (Kim ve diğ. 2005).

2.6. FLAVONOİD BİLEŞİKLERİN PROKSİDAN AKTİVİTESİ

Birçok bitki polifenolleri hem antioksidan hem de pro-oksidan aktiviteye sahiptirler. Proksidan aktivitenin, toplam hidroksil grubu sayısı ile doğru orantılı olduğu düşünülmektedir (Cao ve diğ. 1997). Hanasaki ve meslektaşları (Hanasaki ve diğ. 1994) tarafından yayınlanan bir raporda, bir dizi mono- ve dihidroksiflavonoit, tespit edilebilir bir proksidant aktivitesi göstermemişken, özellikle B halkasında çok sayıda hidroksil grubu bir Fenton sisteminde hidroksil radikallerinin üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. 2,3-çift bağ ve 4-okso flavon diziliminin, oksijen varlığında iki değerli bakır tarafından indüklenen ROS oluşumunu teşvik edebileceğine dair kanıtlar da vardır (Sun ve diğ. 2010).

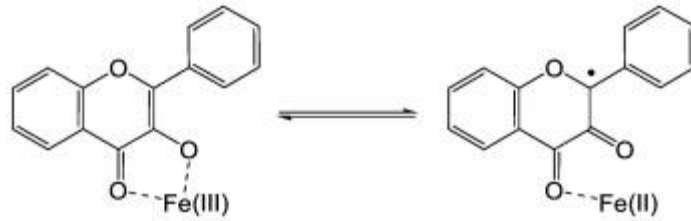
Flavonoidler tarafından süpürülen ROS'un ürünü olan flavonoid fenoksil radikallerinin (Fl-O) ömrü 200 mikrosaniyedir (Bayrakçeken ve diğ. 2003). Flavonoid fenoksil radikalleri yüksek oranda reaktifdirler ve diğer oksidasyona tabi tutulurlar. Diğer olası ürünler arasında daha stabil flavonoid kinonlar elde edilirler. Flavonoid kinonlar da reaktifdir ancak GSH, sistein veya nükleik asitler gibi nükleofillerle konjugasyon yoluyla stabilize edilebilirler (Awad ve diğ. 2002; Torres ve diğ. 2005). Flavonoidlerin istenmeyen prooksidant özelliklerinden

sorumlu olabilecek başka bir reaksiyon ise geçiş metali varlığında flavonoid fenoksil radikallerinin oksijen ile reaksiyonu sonucu kinon ve $O_2^{\cdot-}$ (Şekil 2.29), oluşturmasıdır.



Şekil 2.28: Flavonoidlerin proksidan aktivitesi.

Flavonoidlerin olası proksidant etkileri, serbest geçişli metal iyonlarının oksidasyon işlemlerine dahil olması durumunda *in vivo* olarak önemli olabilir. Polifenolik bileşikler Fe(III), Cu(II) gibi metalleri Fe(II), Cu(I) türlerine indirgeyerek serbest radikal oluştururlar ve protein ve DNA oksidatif hasarına neden olurlar (şekil 2.30). Reaktif azot türlerinin varlığında, A veya B halkası progallol konfigürasyonlarına sahip flavonoidler, DNA tek iplikçik kopmasına neden olur (El Amrani ve diğ. 2006). Yamashita ve diğ. (Yamashita ve diğ. 1999), kuarsetinin neden olduğu bölgeye özgü DNA hasarı mekanizmasını önermiştir. A veya B halkasındaki kateşol grubu, DNA'ya bağlı bir Cu (II) iyonu ile oksitlenir, bu da DNA hasarından sorumlu ROS üretebilir (Amic ve diğ. 2007).



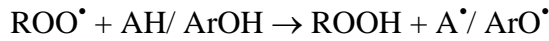
Şekil 2.29: Fe (III) –flavonoid kompleksinden Fe (II) –flavonoid kompleksi oluşumu.

2.7. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE/ AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

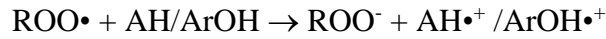
Antioksidan bileşikler ve içerdiği mekanizmaların çalışmasında, antioksidan aktivite ve kapasite kavramlarını ayırt etmek önemlidir. Bu terimler sıklıkla birbirinin yerine kullanılır. Fakat antioksidan aktivite, bir antioksidan ve bir oksidan arasındaki bir reaksiyonun hız sabitidir. Antioksidan kapasite, bir antioksidan örneği tarafından yakalanan belirli bir serbest radikal miktarının bir ölçüsüdür.

Antioksidan kapasiteyi belirleme yöntemleri elektron transferine (ET) dayanan yöntemler ve hidrojen atomu transferine (HAT) dayanan yöntemler olmak üzere iki genel gruba ayrılır. Her iki yöntem de serbest radikallerin etkisizleştirilmesi dayanır (MacDonald-Wicks ve diğ. 2006).

HAT esaslı yöntemlerde, antioksidanların reaktif türlere H atomu vererek serbest radikal türlerinin (genellikle peroksil radikaller) söndürme kabiliyetini ölçer. Peroksil radikallerin yüksek biyolojik ilgileri, hidroksil ve süperoksit radikaline nazaran daha uzun yarı ömürlerin olması nedeniyle Hat esaslı yöntemde reaktif tür olarak peroksil radikalleri seçilir. HAT reaksiyon mekanizması antioksidanların (AH/Ar-OH) daha kararlı serbest radikal (A• and ArO•) oluşturmak için peroksil radikallerine (ROO•)hidrojen atomu transferi şeklinde özetlenebilir.



ET esaslı yöntemlerde antioksidanlar reaktif türleri süpürürken aynı zamanda indirgen özellik gösterirler. Bu yöntemlerde prob olarak kullanılan reaktif türler antioksidanlar tarafından indirgendiklerinde renk ya da fluoresans özelliklerinde değişiklik oluşur (Apak ve diğ. 2016).



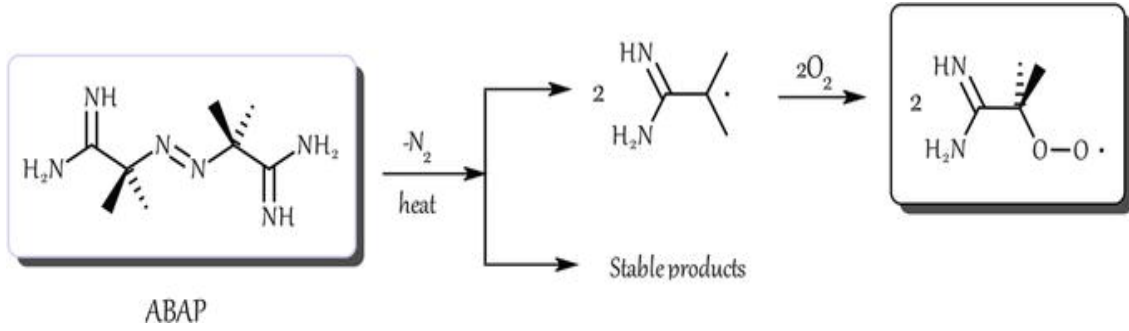
HAT ve ET esaslı toplam antioksidan kapasite/ aktivite tayin yöntemleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Table 2.1: HAT ve ET esaslı toplam antioksidan kapasite/ aktivite tayin yöntemleri.

Yöntemler	Reaksiyon Mekanizması	Özellikleri	Ref.
Trap yöntemi	HAT	TRAP yöntemi, suda çözünür ROO• üreterek lipid peroksidasyonunun başlatılmasını içerir.	(Wayner ve diğ. 1985)
Krosin (CBA) Yöntemi	HAT	AAPH gibi azo bileşiklerinin sıcaklıkla bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmasına (beyazlatma) dayanmaktadır.	(Bors ve diğ. 1986)
ORAC Yöntemi	HAT	AAPH gibi azo bileşiklerinin termal bozunması ile başlatılan peroksil radikal kaynaklı oksidasyonun inhibisyonuna dayanmaktadır.	(Cao ve diğ. 1997)
DPPH Yöntemi	ET ya da HAT	Antioksidanların DPPH• radikalini süpürme kapasitesinin ölçülmesine dayanan kolorimetrik yöntemdir.	(Brand-Williams ve diğ.1999)
ABTS Yöntemi	ET ya da HAT	Antioksidanlar varlığında ABTS ⁺ radikal katyonu absorbansının inhibisyonuna dayanan kolorimetrik yöntemdir.	(Re ve diğ. 1999)
FRAP Yöntemi	ET	Fe ³⁺ -tırtridilriazin kompleksinin (Fe ³⁺ -TPTZ) indirgenerek Fe ²⁺ -TPTZ kompleksine dönüştürülmesiyle toplam antioksidan tayininin ölçülmesine dayanan kolorimetrik yöntemdir.	(Benzie ve diğ. 1996)
Folin Ciocalteu Yöntemi	ET	Molibdofosfotungstat karışım reaktifindeki Mo (VI)' ün antioksidanlar aracılığıyla Mo(V) 'e indirgemesine dayanan yöntemdir.	(Singleton ve diğ. 1999)
CUPRAC Yöntemi	ET	Antioksidanlar tarafından Cu ⁺² 'nin Cu ⁺¹ 'e indirgenmesine dayanan yöntemdir.	(Apak ve diğ. 2016).

2.7.1. TRAP Yöntemi

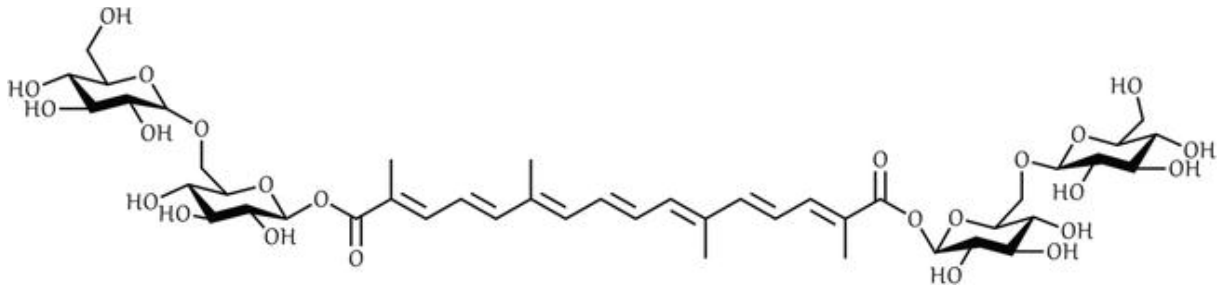
Sabit bir oranda ROO • üreten 2,2'-azobis- (2-amidopropan) (ABAP) 'ın termal ayrışması ile teşvik edilen kontrollü bir peroksidasyon reaksiyonu sırasında O₂ alımının ölçülmesine dayanır (Wayner ve diğ. 1985) (Şekil 9).



Şekil 2.30: ABAP' tan peroksil radikalinin oluşumu.

2.7.2. Krosin Ağartma Yöntemi

Krosin ağartma yöntemi (CBA), başlangıçta fotokimyasal olarak üretilen alkoksil radikallerinin inhibisyonunu değerlendirmek için önerilen bir yöntemdir. Bu, alkoksil radikallerinin etkisi altında, yoğun bir kırmızı renk sunan bir karotenoid olan antioksidan bileşiklerin, krosin üzerindeki koruyucu etkisinin ölçülmesiyle yapılır (Bors ve diğ. 1986).

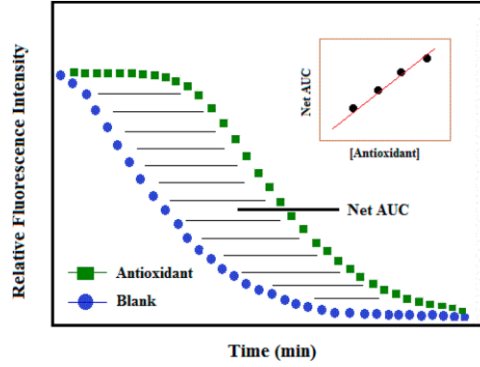


Şekil 2.31: Krosinin kimyasal yapısı.

2.7.3. ORAC Yöntemi

AAPH gibi azo bileşiklerinin termal bozunması ile başlatılan peroksil radikal kaynaklı oksidasyonun inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girer.

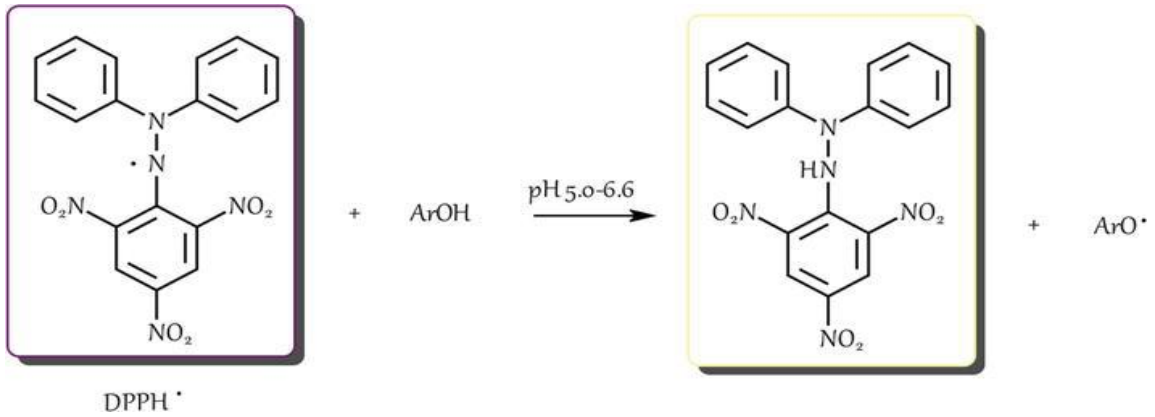
Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integrale edilmiş net alandan yapılır (AUC) (Cao ve diğ. 1997).



Şekil 2.32: ORAC yöntemindeki eğrinin altında net alan.

2.7.4. DPPH Yöntemi

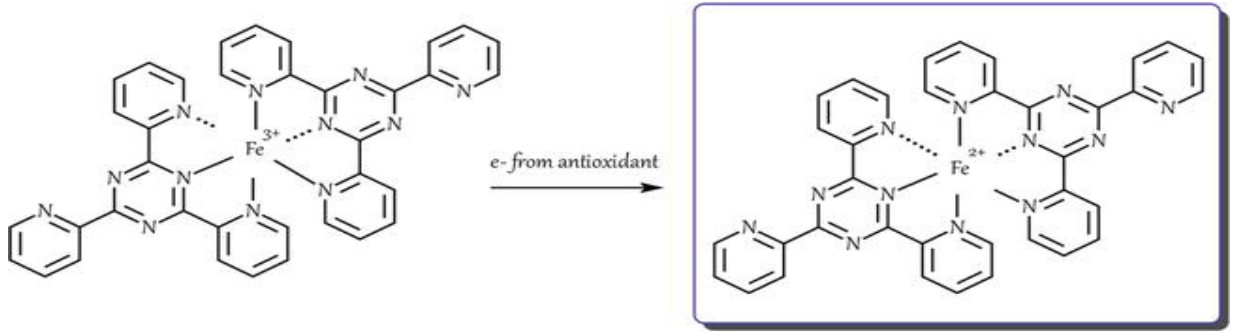
DPPH• (2,2 – di(4-tert-oktilfenil)-1-pikrilhidrazil) kararlı organik azot radikaldir. Antioksidanların DPPH• radikalini süpürme kapasitesinin ölçülmesine dayanan kolorimetrik yöntemdir ($\lambda_{\max} = 515 \text{ nm}$ ' dir) (Brand-Williams ve diğ.1999).



Şekil 2.33: Antioksidan aracılığıyla DPPH• radikalinin indirgenmesi.

2.7.5. FRAP Yöntemi

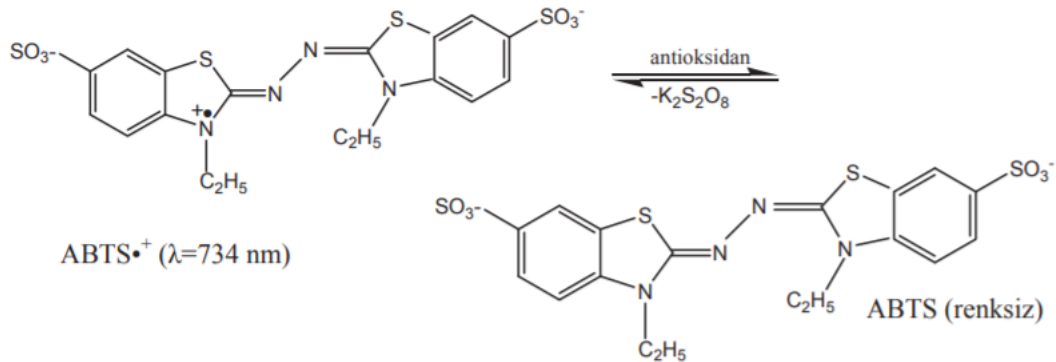
Fe^{3+} -tiritridilriazin kompleksinin (Fe^{3+} -TPTZ) indirgenerek Fe^{2+} -TPTZ kompleksine dönüştürülmesiyle toplam antioksidan tayininin ölçülmesine dayanan kolorimetrik yöntemdir ($\lambda_{\max} = 595 \text{ nm}$) (Benzie ve diğ. 1996).



Şekil 2.34: Bir antioksidan varlığında FRAP tahlili için reaksiyon mekanizması.

2.7.6. ABTS/TEAC Yöntemi

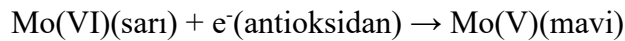
TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve Rice-Evans tarafından 1993 yılında rapor edilmiştir. Re ve arkadaşları bu metodu geliştirmişlerdir (Miller ve Miller, 2010). Geliştirilmiş yöntemde, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, ABTS^{•+} radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metod antioksidan bileşikler tarafından ABTS' nin rengini kaybetmesi temeline dayanır ($\lambda_{\max} = 734 \text{ nm}$) (Re ve diğ. 1999).



Şekil 2.35: ABTS^{•+}'nin antioksidan bileşiklerle reaksiyonu.

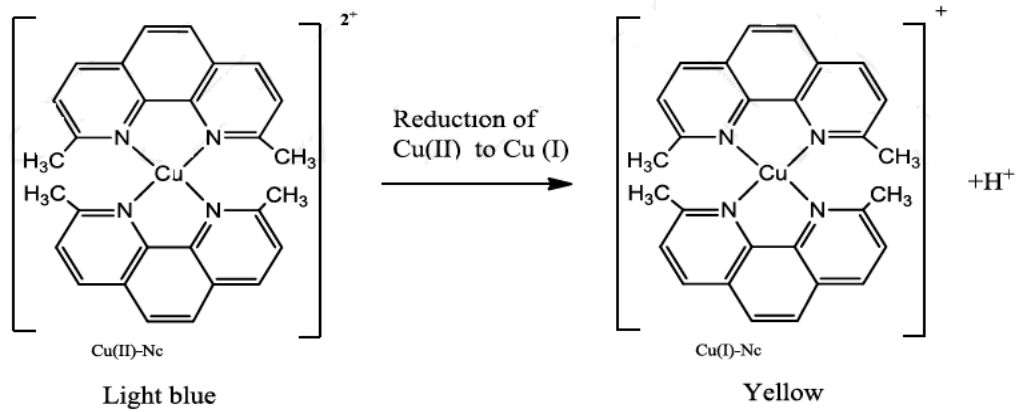
2.7.7. Folin Ciocalteu Yöntemi

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdo fosfotungstik heteropoliasittir. $3\text{H}_2\text{O} - \text{P}_2\text{O}_5 - 13\text{W}\text{O}_3 - 5\text{Mo}\text{O}_3 - 10\text{H}_2\text{O}$ formüllü molibdo fosfotungstik heteropoliasit yükseltgen belirteçdir ve Mo(V) aktif merkezili olan son ürünün maksimum dalgaboyu 765 nm'dir. (Singleton ve diğ. 1999)



2.7.8. CUPRAC Yöntemi

CUPRAC yöntemi ilk olarak Apak ve arkadaşları tarafından İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarı'nda geliştirilmiştir. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbands veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Apak ve diğ. 2016).



Şekil 2.36: CUPRAC reaksiyonu.

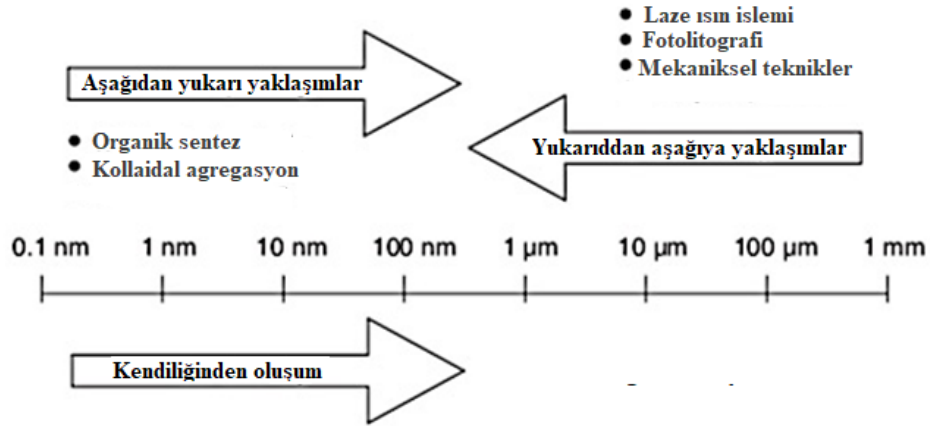
2.8. NANOBİLİM VE NANOTEKNOLOJİ

Nanobilim ve nanoteknoloji, mikroskopla görülemeyecek kadar küçük seviyenin altındaki uygulamalar için materyal üretmek amacıyla tek tek atomların ve moleküllerin amaca uygun şekilde bir takım proseslere tabi tutulmasına dayanır. Tek tek atomlar ve nanometrenin altındaki moleküller arasında, yaklaşık 100 nm'ye kadar olan ölçeklerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik bilgileri içerirler. Nanobilim ve nanoteknolojinin birçok tanımı, boyutlara atıfta bulunur: örneğin, ABD'deki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'ne (NNI) göre "nanoteknoloji, benzersiz olayların yeni uygulamalara olanak tanıdığı yaklaşık 1 ila 100 nanometre arasındaki boyutlardaki maddenin anlaşılması ve kontrolüdür." (Adams ve Barbante, 2012) Prof. Whitesides'a göre "nanobilim" ise en büyük moleküller ile en küçük yapılar arasında orta büyüklükte meydana gelen nesnelerin bilimidir; yani, birkaç nanometreden 100 nanometreye küçük boyutlara sahip nesnelerin bilimidir. Kimyada, bu boyut aralığı tarihsel olarak

kolloidler, miseller, polimer molekülleri, blok kopolimerlerde faz-ayrılmış bölgeler ve benzer yapılarla, tipik olarak, çok büyük moleküller veya birçok molekülün agregatları ile ilişkilendirilmiştir (Whitesides, 2005).

Nanoteknolojinin birçok yönü, yaşamda ve uygulamalarda uğraşmaya çok alıştığımız makroskopik dünyadan nano-ölçekli dünyanın farklı olduğu gerçeğine dayanmaktadır. Mikron büyüklüğü düzeyinde ve üstünde malzemeler, klasik bilim yasalarına uygun geleneksel özelliklere sahipken, mikroskopik nesnelere (1 μm ile 100 nm arasında mezoskopik ve bu boyut aralığının altındaki nanoskopik) olağan dalgalanmalardan etkilenen ve kuantum mekaniğinin garip ve tahmin edilemez yasalarına tabi olan özelliklere sahiptir. Nano-malzemelerin uzunluk ölçekleri azaldıkça, yüzey alanı etkileri son derece önemli hale gelir ve bu malzemelerin (veya cihazların) özelliklerinde derin değişikliklere yol açan kuantum etkileri ortaya çıkar. Nano ölçekli malzemelerin küçük boyutlu olmasının önemli bir etkisi, bu yapıların yüzeyinde bulunan atomların artan yüzdesi ve dolayısıyla artan reaktivitesidir (Adams ve Barbante, 2012).

Nano-yapıların üretilmesine yönelik kavramlar ve süreçler, Şekil 2.38'de kabaca tanımlanmıştır. Genel olarak, aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımlara veya kendiliğinden oluşuma dayalı olarak küçültülmüş boyutlardaki karmaşık yapıları elde etmenin temelde üç yolu vardır (Adams ve Barbante, 2012).



Şekil 2.37: Farklı boyutlarda nano- ve mikro-yapıların eldesi için muhtemel prosesler.

2.8.1. Nanoyapılar ve Kimyasal Analiz

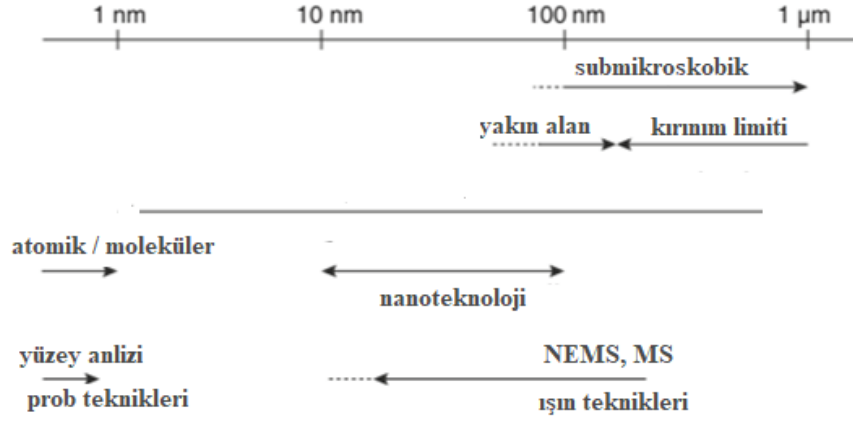
Tablo 2.1, nanoyapıların boyut aralığını ve türünü bir dizi başka büyüklüğe bağlı olaylar çerçevesinde göstermektedir. Tablo aynı zamanda metallere, yalıtkanlara, basit inorganik tuzlara ve karmaşık organik moleküllere, hatta kendiliğinden oluşma (self-assembly) için muazzam potansiyele sahip olan DNA'nın bile farklı boyutlarda ve şekillerde nanoyapıların eldesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Tablo 2.1: Nanoyapıların tipik boyutları.

Nanoyapı	Boyut (nm)	Materyal
Nanokristal, karbondotlar	1-10 yarıçaplı	Yalıtkanlar, yarı iletkenler, metal magnetik materyal
Diğer nanopartiküller	1-10 yarıçaplı	Seramik oksitler
Nanobiyomateryaller	5-10 yarıçaplı	Membran protein
Nanoteller	1-100 çaplı	Metaller, yarı iletkenler, oksitler, sulfidler, nitritler
Nanotupler	1-100 çaplı	Karbon, kalkojenit
Nanobiyočubuklar	5 çaplı	DNA
Yüzey ve ince film	1-100 kalınlık	Yalıtkanlar, yarı iletkenler, metaller, DNA

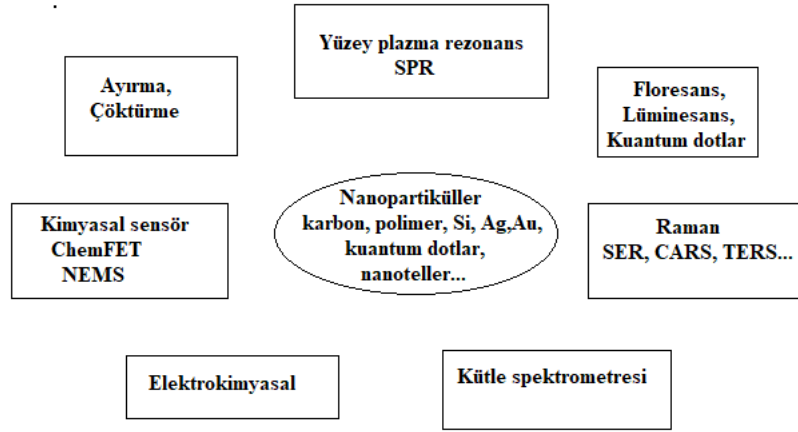
Şekil 2.38, nanoteknolojinin boyut aralığını analitik kimya ve spektroskopide bir dizi başka büyüklüğe bağlı olaylar çerçevesinde göstermektedir. Çok büyük ve hızla artan bir dizi

uygulama ve işlevsel kullanımlar vardır. Mevcut nanoteknoloji uygulamalarının çoğu nanoparçacıklar, nanotüpler, nanokompozitler ve nanokaplamalara dayanmaktadır (Adams ve Barbante, 2012).



Şekil 2.38: Nanoteknolojinin boyut aralığını.

Nanoparçacıklar, benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir ve kimyasal ve biyolojik sensörler olarak kullanılabilir. Altın nanoparçacıklar (AuNP'ler), farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı en kapsamlı araştırılan nanomalzemelerdir. Kararlı AuNP'leri sentezlemek kolaydır ve benzersiz, ayarlanabilir optik özelliklere sahiptirler. Yüksek yüzey/hacim oranlarına sahip, uygun modifikasyon işlemlerinden sonra, mükemmel biyo uyumluluk ile hedeflerin spesifik olarak algılanması için ligandlarla işlevselleştirilebilen yapıları sunarlar (Xiao ve diğ. 2012).



Şekil 2.39: Nanotüp ve nanofiberlerin kimyasal analizlerde kullanımı.

2.8.2. Nanoparçacıklar

Öncelikle boyuta dayalı önemli nanomalzemeler kategorisine örnekler, nanoparçacıklar ve nanotozlardır. Kümeler iyi tanımlanmış yapı ve kompozisyona sahip parçacıklar iken, nanoparçacıklar daha az hassas kompozisyon ve boyut dağılımına sahip türlerdir (kolloidler). Nanotoz, 1 ila 10 nm arasındaki birçok malzemeye dar bir boyut dağılımı ile verilen bir isimdir. Kümeler, nanoparçacıklar ve nanotozlar, karbon, silika, altın, gümüş veya kompleks halinde oksitler gibi ya da yarı-iletken olarak kuantum nanodotlar (QD) gibi çok çeşitli basit bileşimlere sahiptir. Nanoparçacıkları karmaşık fonksiyonel yapılara sahip bileşikler ile modifiye etmek nanoteknoloji uygulamaları için önemli bir araştırma alanı haline gelmeye başlamıştır. Geniş ve genişleyen bir uygulama yelpazesi vardır: katalitik işlemlerde kaplayıcı, ilaçlar için dağıtım ve görüntüleme aracı olarak kullanılırlar.

2.8.2.1. Metal Oksit Nanoparçacıklar

Metal oksit nanoparçacıklar (Fe_2O_3 , MnO_2 , TiO_2 vb.) ise başta metal tuzlarının indirgenmesi olmak üzere vakum içerisinde metalin buharlaştırılması, lazer ile aşındırma veya çöktürme yöntemlerine benzer olarak jelleşme öncesi durdurulan sol-jel yöntemi gibi fiziksel ve kimyasal birçok yöntem kullanılarak sentezlenebilmektedir. Metal oksit nanopartiküller, sahip oldukları yarıiletken, pizoelektrik ve piroelektrik özelliklerinden dolayı sensör, optik ve optoelektronik uygulamalarda çok fazla kullanılmaktadır. Soy metal nanoparçacıklara en büyük üstünlüğü düşük maliyetli olmalarıdır. Bunun yanı sıra soy metal nanoparçacıklara nazaran daha büyük yüzey alanına sahip olmaları, kararlılıkları ve çevre dostu olmaları da

diğer önemli avantajlarından (Chen ve diğ. 2007; Oskam, 2006). Metal oksit nanoparçacıklar arasında başta TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 ve SiO_2 olmak üzere son zamanlarda MnO_2 de yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.9. ANTIOKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN NANOPARÇACIK ESASLI KOLORİMETRİK YÖNTEMLER

Gıda numunelerinde antioksidan kapasite ve total fenolik içeriğini değerlendirmek için son yıllarda birkaç yeni analitik yaklaşım denenmiştir. Son zamanlarda, genel olarak araştırma kaynaklarının kullanımını modernleştirmek amacıyla duyarlı, hızlı, kolay, nispeten ucuz cihaz gerektiren ve küçük hacimlerle çalışmaya imkan sağlayan yöntemlere özel ilgi gösterilmektedir. Bu bakımdan nanoyapılar birkaç polifenolik bileşik sensöründe ve algılama stratejisinde kullanılmıştır. Farklı bilimsel makaleler ve incelemeler (Del Carlo ve diğ. 2008; Hayat ve diğ. 2014; Pérez-López ve diğ. 2011; Alarcon-Angeles ve diğ. 2016; Zhu ve diğ. 2015; Wang ve diğ. 2017), bu malzemelerin avantajlarını ve iyileştirmelerini vurgulayan bu nano-temelli yaklaşımın kullanımını ortaya koymuştur. Nanoyapılar ve işlevselleştirilmiş nanoyapılar, daha yüksek hassasiyet, kararlılık ve seçicilik sergileyen biyoalgılama performansını geliştirmek için katalitik araçlar, immobilizasyon platformları ve optik veya elektroaktif sensörler olarak kullanılmaktadır (Pérez-López ve diğ. 2011).

Küçük boyutlarından (1-100 nm) ve çok yüksek spesifik yüzey alanlarından dolayı, soy metal (Au, Ag, Pt, Pd, Rh, vb.) nanoparçacıklar çok fazla dikkat çekmiş ve tıp, tekstil mühendisliği, biyoteknoloji, biyo-mühendislik, su arıtma elektronik ve optik gibi çeşitli alanlarda uygulamalar için temel oluşturmuştur. Bununla birlikte, nanomalzemeye dayalı yöntemler gıda bilimde (özellikle antioksidan araştırma) -muhtemelen metalik NP oluşumuna yol açan antioksidanlar tarafından soy metal tuzlarının söz konusu indirgeme reaksiyonlarının değişken kinetiği nedeniyle- nadiren kullanılmaktadır. Gümüş nanoparçacıklar sıvı ortam içinde dağıldıklarında, yığın (bulk) metalin spektrumunda bulunmayan absorpsiyon bandına göre daha güçlü bir ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon bandı sergilerler. Bu bant, yüzeydeki elektron yoğunluğunda periyodik bir değişiklik (SPR, yüzey plazmon rezonans emilimi), elektron bulutunun parçacıklar içinde kolektif olarak uyarılması ile ilişkilidir. Bu nedenle, nanoparçacık esaslı toplam antioksidan kapasite tayinleri, lokalize (yerleşmiş) SPR absorpsiyonları ile kolayca tanımlanabilen/nicelenebilen soy metal nanoparçacıkları üretmek için, soy metal tuzlarının/asitlerinin antioksidan polifenoller tarafından kimyasal olarak

indirgenmesi prensibine dayanır. Antioksidan kapasitenin kimyasal indirgeme temelli nanoteknolojik kolorimetrik uygulamaları, soy metal nanoparçacıklarının oluşumunu veya büyümesini kullanır; en yüksek TAC değerlerine sahip antioksidanlar, Au(III)/Ag(I) tuzlarından Au/Ag-NP'ler üretme kabiliyeti yüksek olanlardır (Apak ve diğ. 2015). Metal oksit nanoparçacıkların (Fe_2O_3 , MnO_2 , TiO_2 vb.) ise soy metal nanoparçacıklara en büyük üstünlüğü düşük maliyetli olmalarıdır. Bunun yanı sıra soy metal nanoparçacıklara nazaran daha büyük yüzey alanına sahip olmaları, kararlılıkları ve çevre dostu olmaları da diğer önemli avantajlarından (Chen ve diğ. 2007; Oskam, 2006). Gıda antioksidanları için prob olarak kullanılan nanoparçacıkların çoğu uygulamaları altın (Au), gümüş (Ag), magnetit (Fe_3O_4) titanya (TiO_2) ve mangan dioksit (MnO_2) nanoparçacıkları ve kuantum dotların (QD) kullanımı ile ilişkilidir.

Soy metal veya metal oksit nanoparçacıkların kullanıldığı antioksidan kapasite/aktivite tayinlerinin çalışma prensibi dört kategoride sınıflandırılabilir:

- (i) oluşum ve büyüme (genişleme)
- (ii) agregasyon (yığışım) ve aglomerasyon
- (iii) bozunma
- (iv) antioksidan analitlerinin etkisi altında nanoparçacıkların spesifik etkileşimi

Bu mekanizmalar, seçicilik ve duyarlılığın farklı boyutlarında antioksidan miktar tayinini mümkün kılar.

Scroccarello ve arkadaşları tarafından, antioksidan kapasite içeriğinin değerlendirilmesi için, AuNP'lerin oluşumu yoluyla hızlı ve kullanımı kolay kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. Özellikle, AuNP esaslı antioksidan kapasite tayini, elma özütü bileşiminin değerlendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Yöntemin tayin prensibi polifenollerin Au(III)'ü Au(0)'a indirgemesine ve böylece AuNP'lerin koloidal süspansiyonlarının oluşumuna dayanmaktadır. AuNP'lerin oluşumu, polifenolik bileşiğin yapısına ve konsantrasyonuna bağlı olarak kırmızı renkli süspansiyonlarla sonuçlanır. Uygun koşullar altında polifenolik bileşikler tarafından AuNP'lerin oluşumuna ait kırmızı rengin (10 dakika ve 45 °C sıcaklıkta) absorbansı 540 nm dalga boyunda ölçülür. Yöntemin analitik performansı iyi tekrarlanabilirlik ($RSD \leq 6\%$), hassasiyet ($LOD \leq 8.7 \mu mol L^{-1}$) ve geri kazanımlar (% 91–113.7%) açısından iyidir. Yöntem ayrıca 42 elma örneğinde test edilmiş ve elde edilen veriler, geleneksel yöntemlerle (yani, Folin-Ciocalteu, ABTS ve iyon kromatografisi)

karşılaştırılmıştır. Bu AuNP oluşumuna dayalı yaklaşım, elma örneklerinde polifenollerin hızlı ve kolay analizi için basit ve maliyeti düşük bir araçtır (Scroccarello ve diğ. 2019).

Bener ve arkadaşları tarafından TAC ölçümü için yeni bir heparin ile stabilize edilmiş AuNP esaslı ‘bakır(II) indirgeme antioksidan kapasitesi’ (CUPRAC) kolorimetrik sensör geliştirilmiştir. Sülfatlanmış bir polisakkarit olan heparin, negatif yüklü AuNP sentezi için hem indirgeyici hem de stabilize edici madde olarak kullanılmıştır. Stabilize edilmiş AuNP’ler, Cu(II)-Nc’nin antioksidanlarla reaksiyonundan ve elde edilen bakır (I) -neokuproin (Cu (I)-Nc) çözeltisine eklenmiş ve oluşan Cu(I)-Nc-AuNP’lerin (Altın nano-tanecikler üzerinde elektrostatik olarak adsorbe edilmiş Cu(I)-Nc katyonik kelat) absorpsiyonu 455 nm’de ölçülmüştür. Diğer benzer AuNP esaslı sensörlerin aksine, önerilen nano-sensör aggregasyon olmadan inert elektrolitlere karşı mükemmel (1000 kat) tolerans sergilemiştir. Doğrusal aralık, daha düşük LOD (trolloks için 0,2 µM) ve daha yüksek molar absorptivite (quercetin için $8.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ile geleneksel CUPRAC’tan daha üstün olduğu görülmüştür. “Trolloks eşdeğeri antioksidan kapasite” (TEAC) değerleri ve bir dizi antioksidan için aktivite sırası, referans CUPRAC testine uygun olarak yapılmıştır. Siyah çay ekstraktına antioksidan ilaveler, %93-97 oranında gerikazanım ve %2-6 oranında rölatif standart sapma sağlamıştır. Bu yeşil sensör reaktif tüketimini önemli ölçüde azaltmış ve karmaşık gıda örneklerinde kullanılacak basit, güvenilir ve sağlam bir metodoloji sağlamıştır (Bener ve diğ. 2018).

Özyürek vd. tarafından polifenoller için geliştirilen toplam antioksidan kapasite yöntemi sitrat-stabilize gümüş tohumları varlığında Ag^+ iyonunun indirgenmesi sonucu 423 nm’de kuvvetli bir yüzey plazmon rezonans absorpsiyon bandı vermesi temeline dayanmaktadır (Özyürek ve diğ. 2012). Sitrat, gümüş nitrat ve gümüş tohumları miktarı kontrol altında tutularak değişen polifenol konsantrasyonuna bağlı olarak doğrusallığın sağlandığı yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Oksalat, sitrat, meyve asitleri, amino asitler ve indirgen şekerlerin yönteme girişim etkisinin olmaması, yöntemi gerçek örneklere kolaylıkla uygulanabilir kılmıştır. Yöntemin LOD değeri 0,23 µM’dır.

Kağıt esaslı algılayıcılar da kullanımı kolay ve düşük maliyetli cihazlar olarak basit saha içi analizleri yapmak amacıyla son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla Choleva ve arkadaşları analit odaklı AuNP’lerin oluşumu yoluyla antioksidan aktivitenin belirlenmesini

sağlayan kağıt esaslı sensör geliştirmişlerdir. AuNP'leri oluşturmak için kâğıt üzerindeki altın iyonlarının çekirdeklenmesi (nano-boyutlu elementel altın eldesi), sulu numunelerde bulunan antioksidan bileşikler tarafından altının indirgenmesiyle elde edilmiştir (Vasilescu ve diğ. 2012). Kağıt yüzeyinde oluşan kromatik geçişler, çözeltinin antioksidan kuvvetini değerlendirmek için kullanılmıştır. Sensör, farklı antioksidan bileşiklerine karşı test edildiğinde, renk oluşumunun yoğunluğu şu sırayla gözlenmiştir: kateşin, gallik asit> kafeik asit> askorbik asit> kumarik asit> vanilik asit> ferulik asit> sinamik asit. Bu, antioksidan polifenollerinin klasik reaktivitesiyle (yani, flavonoidler> o-fenol> m-fenoller) ile uyumludur (Scarano ve diğ. 2017; Vasilescu ve diğ. 2012; Dwiecki ve diğ. 2017).

Son yıllarda, gıdalardaki polifenolik bileşiklerin kolorimetrik değerlendirmesinde altın ve gümüş nanoparçacıklar haricinde diğer metal nanoparçacıklar (özellikle metal oksit nanoparçacıklar) da kullanılmaya başlanmıştır. Seryum dioksit redoks çifti Ce (IV)/Ce (III) Sharpe ve arkadaşları tarafından antioksidanların optik algılanması için filtre kağıdında immobilize edilmiş nano-seryum dioksit esaslı bir sensörün geliştirilmesi için kullanılmıştır. Spektroskopik çalışmalar, farklı antioksidanların (troloks, epigallokateşin gallat, L-askorbik asit, gallik asit, vanillik asit, kuersetin, kafeik asit) seryum dioksit nanoparçacıkların yüksek konsantrasyonlu dispersiyonları için görünür bir renk değişikliğine (veya yük transfer komplekslerinin oluşumu) sebep olduğunu göstermektedir. Her bir antioksidanın LOD değerleri 10^{-8} M mertebesindedir (Sharpe ve diğ. 2013).

Aynı zamanda Sharpe ve arkadaşları polifenol tayini için kağıt üzerinde kolorimetrik bir yöntem olarak farklı metal oksit nanoparçacık (seryum oksit, titanil oksalat, demir oksit ve çinko oksit) esaslı bir sensör dizisi de geliştirmişlerdir. Antioksidan tayin mekanizması, polifenollerin, benzersiz spektral özelliklere ve karakteristik renklere sahip metal oksitlerle karakteristik renklerin yüzey komplekslerini oluşturma yeteneğine dayanmaktadır. Renk oluşumu, standardın veya numunenin konsantrasyonuna ve antioksidan kapasitesine, ayrıca metal oksit tipine bağlıdır. Yiyeceklerde yaygın olarak bulunan on beş polifenol başarılı bir şekilde tayin edilmiştir. Sensör dizisinin performansı ORAC testiyle karşılaştırılmış, ancak doğrudan bir korelasyon elde edilememiştir. Bununla birlikte, taşınabilir bir renk okuyucusu

kullanılarak geliştirilen kolorimetrik bir veri tabanı geliştirilmiş ve yeşil çay bitkilerinde ana polifenolik bileşenleri kalitatif ve kantitatif olarak tayin edilebilmiştir (Sharpe ve diğ. 2014).

Kolza tohumu yağlarının antioksidan kapasitelerinin teknolojik işlemlerin çeşitli aşamalarında değerlendirilmesi Szydłowska-Czerniak ve ark. tarafından demir oksit nanoparçacıklar (iron oxide nanoparticles, IONP'ler) kullanarak yapılmıştır. Bu çalışmada ferrik iyonlar, asidik ortamda yağ özütleri ile indirgenmekte ve sonuçta demir oksit nanoparçacıkların sarı çözeltileri oluşmaktadır. Kolza tohumu yağlarının özütlerinin eklenmesinden 50 dakika sonra, IONP'lerin sarı-turuncu çözeltilerinin absorpsiyonu 396 nm'de ölçülmüştür. Oluşan IONP'ler, küresel görünümlü, oldukça monodispers ve homojen olup Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) verileri, IONP'lerin yüzeyinde adsorbe edilen sinapik asit varlığını (standart olarak kullanılır) desteklemiştir. Kolza tohumu yağlarının asetonik ve metanolik ekstraktları için IONP esaslı yöntemle belirlenen antioksidan kapasitelerinin FRAP ve DPPH değerleri ile anlamlı olarak doğrusal olduğu bulunmuştur (Szydłowska-Czerniak ve diğ. 2015).

Ji ve arkadaşları tarafından ilk kez kobalt oksihidroksit (CoOOH) nanotaneciklerin 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB) karşı yüksek oksidasyon kabiliyetine sahip olduğu ve askorbik asidin (AA) nitel ve nicel tespiti için yeni bir strateji geliştirildiği bildirilmiştir. Çalışmada CoOOH nanotanecikleri, TMB'yi doğrudan ortaya çıkan açık mavi renkle yükseltgenmiş TMB'ye okside edebilir ve AA, CoOOH nanotaneciklerini Co²⁺ya dönüştürerek oksidasyonu seçimli olarak inhibe edebilir. Bu durum yükseltgenmiş TMB'nin absorpsiyonunda bir azalmaya ve mavi rengin ağarmasına neden olur. Bu haliyle, AA konsantrasyonu UV-spektroskopisi ve çıplak gözlerle kolayca belirlenebilmektedir. Optimum koşullar altında bu yöntem 142 nM belirtme sınırına ve 5 dakikalık kısa bir tayin süresine sahip olup AA'ya oldukça hassastır. Bu yöntem, insan serumu ve gıda örneklerine AA'yı analiz etmek için başarıyla uygulanmıştır. Bunun yanı sıra geliştirilen yöntemde CoOOH nanotanecikleri kağıda emdirilerek de kağıt esaslı sensör haline de getirilmiştir (Ji ve diğ. 2018).

2.10. DİĞER ANTIOKSIDAN TAYİN YÖNTEMLERİ

Klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE) genellikle polifenolik bileşiklerin iyi bir şekilde geri kazanılmasını sağlar, bununla birlikte, büyük miktarda çözücü gereksinimi, uzun ekstraksiyon süresi, sınırlı çözücü seçimi ve bazı durumlarda hedef bileşiklerin bozunması gibi bazı

dezavantajları vardır. Diğer ekstraksiyon teknikleri, katı-sıvı ekstraksiyon (SLE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), basınçlı sıvı ekstraksiyon (PLE), süperkritik ekstraksiyon (SCE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UAE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) teknikleridir (Ajila ve diğ. 2011; Ziyatdinova ve Budnikov, 2015; Ignat ve diğ. 2011). Son yıllarda, temizleme prosedürünü otomatikleştirmek ve çözücü tüketimini, analiz sürelerini ve matris etkilerini azaltmak amacıyla temizlik aşamasında otomasyon ve mikro-ekstraksiyon sistemlerinin kullanımına yönelik bir eğilim olmuştur (Della Pelle ve diğ. 2015; Di Ottavio ve diğ. 2017). Kuşkusuz, bir sensör veya algılama sisteminin kullanılması ideal olarak hiçbir numune ön işlem gerektirmemekte veya bu işlemler minimal olarak yapılmalıdır.

Analitik bilimlerin gelişmesiyle birlikte, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS), gaz kromatografisi-kütle spektrometresinden (GC-MS) başlayarak polifenollerin analizi için kullanılabilen aralarında Fourier Transform infrared spektroskopisi (FT-IR), nükleer manyetik rezonans (NMR), kapiler elektroforez (CE), sensörler ve biyosensörlerin de olduğu bir dizi modern araç vardır (Ajila ve diğ. 2011; Ziyatdinova ve Budnikov, 2015; Ignat ve diğ. 2011). Karmaşık matrisler içinde bileşiklerin seçimli tanımlanması ve nicelenmesi mümkün olduğu için polifenolik bileşiklerin kromatografi kullanılarak nicelendirilmesi en sık kullanılan yaklaşımdır. Bu açıdan HPLC çok kullanışlıdır; çünkü bileşikler, aglikonların hidrofobikliği ve karşılık gelen glikozitlerin hidrofilikliği gibi kendine özgü kimyasal özelliklerinden dolayı ayrılır (Valls ve diğ. 2009). Ultraviyole/görünür bölge, fotodiyot dizisi ve ultraviyole-floresans dedektörü ile birleştirilmiş ters faz ayırma, polifenolik bileşiklerin ayrılması için klasik olarak en çok kullanılan tekniktir (Dobes ve diğ. 2013). Daha yakın zamanlarda, çok karmaşık karışımlarda düşük seviyelerde polifenolik bileşikleri tayin edebilmek için kütle spektrometri (MS) yaygın olarak kullanılmaktadır (Motilva ve diğ. 2013). Bu teknikler, tek bir bileşiğin veya bir metabolitin tanımlanması için idealdir, ancak pahalı ekipman, eğitimli personel gerektirirler ve zaman alabilirler. Dahası, ayırma teknikleri incelenen polifenollerin antioksidan kapasitesi hakkında bilgi vermemektedir.

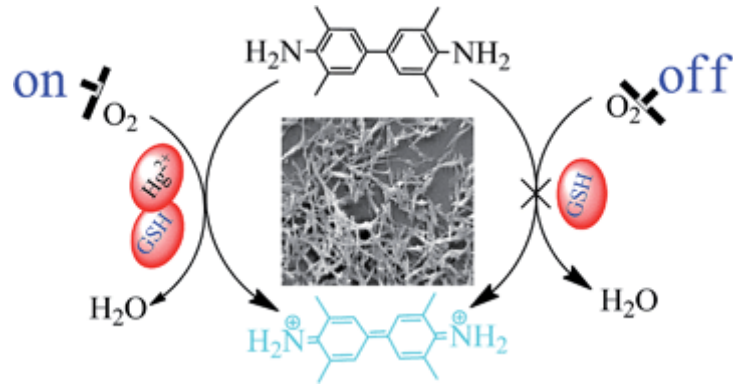
Elektrokimyasal (EC) teknikler, doğaları gereği, reaktif türler kullanmadan toplam antioksidan kapasitenin doğrudan belirlenmesini sağlayabilir. Bu yöntemler, döngüsel voltametri (CV), diferansiyel darbe voltametrisi (DPV), kare dalga voltametrisi (SWV), diferansiyel darbe voltametrisi (DPV), amperometrik saptama ile akış enjeksiyon analizi ve

daha yakın zamanda amperometrik algılama ile birleştirilmiş mikroakışkan çip stratejileri kullanarak yükseltgeme potansiyeli ve antioksidan aktivite arasında bir ilişki kurmaya çalışır (Pisoschi ve diğ. 2015; Escarpa, 2014). Elektrokimyasal yöntemler, gıda maddeleri ve içecekler, biyolojik sıvılar, farmasötikler, vb. çeşitli ortamlarda toplam antioksidan kapasite veya toplam fenolik değerlendirilmesinin başarılı bir şekilde belirlenmesini sağlayan enzim elektrotlarının geliştirilmesi için enzimlere bağlanabilir.

2.11. TEZ ÇALIŞMASINA YÖN VEREN LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

2.11.1. Enzim Benzeri Etki Gösteren MnO₂ Nanoçubukları Kullanılarak Cıva İyonlarının Kolorimetrik Tayini

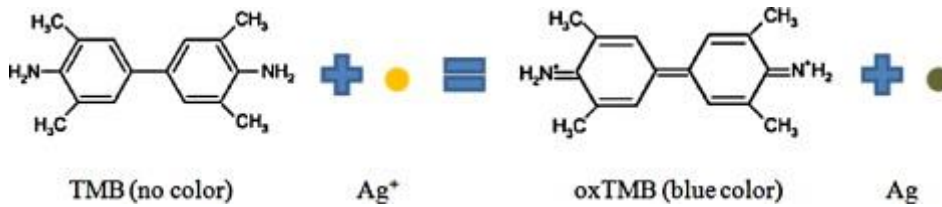
Yang ve arkadaşları tarafından Hg²⁺ iyonlarının tayini için ‘on-off’ olarak nitelendirilen kolorimetrik bir sensör geliştirilmiştir. H₂O₂ varlığında sentezlenen homojen MnO₂ nanoçubuklar oksidaz-benzeri aktivite göstererek ortamda başka herhangi bir yükseltgeme aracına ihtiyaç duymadan TMB reaktifini uygun koşullarda mavi renkli katyon radikali formuna yükseltmiştir. –SH grubu içeren glutatyon (GSH), yükseltgenmiş formda TMB’nin mavi rengini giderebilecek potansiyelde bir indirgendir. Hg²⁺ iyonları ise tiyollenmiş bileşiklere kuvvetli bir afinite göstermektedir. Bundan yararlanarak GSH ve Hg²⁺ önceden bir arada inkübe edilmiş, MnO₂ varlığında yükseltgenmiş formda TMB’nin mavi rengi giderilememiş (GSH tarafından tekrar indirgenemeyecek) ve sabit GSH konsantrasyonunda Hg²⁺ konsantrasyonu arttıkça daha kuvvetli bir absorpsiyon gözlenmiştir. Yöntemde çalışılan kalibrasyon aralığı 0,1 – 8,0 µM aralığında olup belirtme sınırı (LOD) 0.08 µM’dır. Çalışmada gerçek su örneklerinde de Hg²⁺ tayini yapılmış ve %82 – 114 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir (Yang ve diğ. 2015).



Şekil 2.40: MnO₂ nanoçubukları varlığında Hg²⁺ tayini için önerilen yöntemin şematik gösterimi.

2.11.2. İndikatör Olarak 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) Kullanılarak Ag(I)'in Yüksek Hassasiyet Ve Seçimli Kolorimetrik Tayini

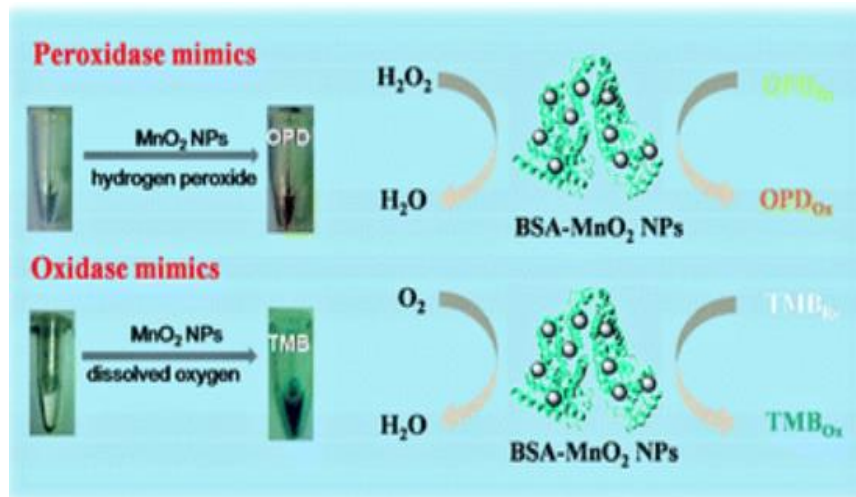
Liu ve arkadaşları tarafından geliştirilen yöntemde Ag⁺ iyonlarının TMB ile olan redoks reaksiyonundan yararlanılarak hassas ve seçimli tayini yapılmıştır. Yöntemin prensibi pH 4'te Ag⁺ iyonlarının TMB'yi yükseltgemesi sonucu katyonik radikal formunda yükseltgenmiş TMB'nin karakteristik mavi rengin ($\lambda_{\text{maks}} = 656 \text{ nm}$) Ag⁺ konsantrasyonu ile doğrusal bir şekilde artmasına dayanmaktadır. Çalışmada Fe³⁺ iyonları yöntemi ciddi şekilde etkilerken diğer metal iyonlarının sadece en düşük oksidasyon basamağı (genellikle 2+ değerlikli) denenmiştir. Fe³⁺'ün ortamdaki giderilmesi SHPP ile kelatlama aracı ile gerçekleştirilmiştir. SHPP varlığında maskelenen Fe³⁺ iyonları varlığında Ag⁺ seçimli bir şekilde tayin edilebilmiştir. Yöntemde belirtme sınırı 50 nM'dır (Liu ve diğ. 2012).



Şekil 2.41: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) ile Ag(I) için önerilen reaksiyon.

2.11.3. Peroksidaz ve Oksidaz Aktivite Olarak Bovin Serum Albumin (BSA)-Temelli MnO₂ Nanopartikülleri

Liu ve arkadaşları tarafından geliştirilen çalışmada BSA temelli MnO₂ nanopartikül sentezlenerek bunların oksidaz ve katalaz benzeri aktivite sergiledikleri gösterilmiştir. BSA-MnO₂ NP'lerin aktiviteleri, hidrojen peroksit veya çözülmüş oksijen varlığında horseradish peroksit (HRP) substratı ile o-fenilendiamin (OPD) ve 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) kullanılarak değerlendirilmiştir. İyi dağılma, çözünürlük ve biyo-uyumluluğa sahip bu küçük boyutlu BSA-MnO₂ NP'leri, H₂O₂, OPD ve TMB'ye yüksek afinite göstermiş, bu da BSA-MnO₂ NP'lerinin enzim benzeri olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgulara dayanarak, HRP yerine anti-sheep IgG saptanmasında BSA-MnO₂ NP'leri kolorimetrik testi olarak kullanılmıştır (Liu ve diğ. 2012).

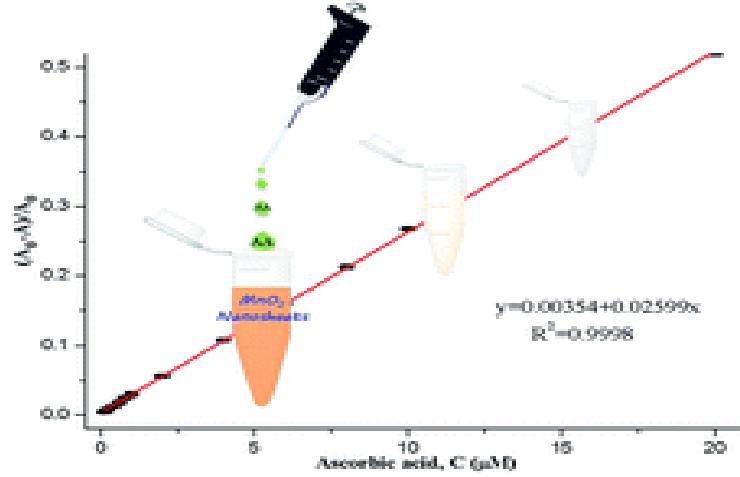


Şekil 2.42: MnO₂ NPs varlığında TMB ve OPD'nin oksidasyonunun şematik gösterimi.

2.11.4. MnO₂ Nanosheets Kullanarak Askorbik Asidin Kolay ve Ucuz Belirlenmesinde Reaktif Kullanılmadan Kolorimetrik Yöntemin Geliştirilmesi

Chen ve arkadaşları tarafından manganez dioksit (MnO₂) nanosheets kullanarak herhangi bir kromofor reaktif kullanılmadan askorbik asidin (AA) belirlenmesinde bir kolorimetrik yöntem geliştirmiştir. Yöntemin prensibi AA ve MnO₂ nanosheets arasında meydana gelen redox tepkimesi sonucu ortaya çıkan Mn²⁺iyonu, MnO₂ nanosheet çözeltisinin renk şiddetinin ($\lambda_{\text{maks}} = 370 \text{ nm}$) doğrusal bir şekilde açılmasına dayanmaktadır. Yötemde çalışılan kalibrasyon aralığı 0,2 – 20 μM aralığında olup belirtme sınırı (LOD) 98 nM'dır. Yöntemde

sırasıyla C vitamini ve çeşitli ticari meyve suyu örneklerinde standart katma yöntemi uygulanmış ve %95-105 aralığında geri kazanım değerleri elde edilmiştir (Chen ve diğ. 2019).



Şekil 2.43: Artan AA konsantrasyonu varlığında MnO₂ nanosheets çözeltinin renk şiddetinde doğrusal bir şekilde azalmasının grafik gösterimi.

2.12. SPERMAN KORELASYON KATSAYISI

Spearman korelasyon katsayısı, eşleştirilmiş veriler arasındaki monotonik bir ilişki gücünün istatistiksel bir ölçüsüdür. Spearman korelasyon katsayısı, denklem 2.1'e göre hesaplandı.

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2-1)} \quad (2.1)$$

Denklem 2.1'e göre

r_s – Spearman sıralama analiz korelasyonu

d_i – İki sıra arasındaki fark

n – Örnek sayısı

Korelasyon bir etki büyüklüğüdür ve bu nedenle mutlak değer için aşağıdaki kılavuzu kullanarak korelasyonun gücünü yorumlayabiliriz (Spearman's correlation, accessed May 07, 2019)

- 00-.019 “çok zayıf”
- 0.20-0.39 “zayıf”
- 0.40-0.59 “ılımlı”
- 0.60-0.79 “güçlü”
- 0.80-1.0 “çok güçlü”

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar; Shimadzu AUX320 marka analitik terazi, Millipore Direct-Q 8UV marka ultra saf su cihazı, Wiseclean ultrasonik banyo, pH ayarlamaları için kullanılan Mettler Toledo Seven Compact pH metre, Wisd WiseBath su banyosu, IKA YellowLine MSH Basic manyetik karıştırıcı ısıtıcı, DAIHAN WiseVen vakum etüvü absorbans ölçümlerinin yapılması için kullanılan Hellma SUPRASIL 10 mm ışığa yollu kuartz küvet, absorbans ölçümleri ve spektrumların eldesi için Shimadzu UV-1800 marka UV spektrofotometredir. Sentezlenen nanopartiküllerin yapı tayini için XRD analizi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa PROTEK-MERLAB/Merkez araştırma Laboratuvar'nda yapılmıştır. Analizde Rigaku marka D/Max-2200/PC model X-Işını Toz Kristal Cihazı kullanılmıştır. Cihaz Cu kaynaklı (A4 1L-Cu / 60 kV, 2.0 kw) X ışını tüpü ve tüpün ani sıcaklık değişimlerini kontrol eden su soğutucusuna (Thermo NESLAB, M 100) sahiptir ve cihazda monokromatize X-Işını elde edilmesini sağlayan Grafit Monokromatör kullanılmaktadır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; potasyum permanganat (KMnO_4), 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc), troloks (TR), kuersetin (QR), kateşin (CT), Klorojenik asit (CGA), L-askorbik asit (AA), ferulik asit (FRA), gallik asit (GA), α -tokoferol (TOC), kafeik asit (CFA), rutin (RT), kaemferol (KA), p-kumarik asit (CMA), vanilik asit (VA), glutatyon (GSH), L-sistein (CYS), sisteamin (CYS-NH_2), N-asetil sistein (NAC), sitrik asit, sodyum monohidrojen fosfat dihidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), amonyum asetat, benzoik acid, mannitol, D-(+)- Glukoz, metil- β -siklodekstrin ve etil alkol (EtOH) (Sigma-Aldrich, HPLC saflıkta), nitroblue tetrazolyum (NBT), sodyum nitrit (NaNO_2), sodyum molibdat (Na_2MoO_4), salisilik asit, sodyum hidroksil (NaOH), asetik asit (CH_3COOH), sodyum asetat (CH_3COONa), sodyum monohidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Gerçek örnek çalışması için, cappy gold mini portakal suyu (%100), yeşil çay (*Camellia sinensis*) kullanılmıştır

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

Tez çalışması boyunca kullanılan antioksidanlardan askorbik asit ve diğer tiyollu antioksidanların (glutasyon, sistein, sisteamin, N-asetil sistein ve α -Tokoferol) çözeltileri ultra saf suda hazırlanmıştır. Diğer tüm antioksidanlar ise HPLC saflıktaki etanol de hazırlanmıştır. Her bir antioksidan uygun stoklarda hazırlanmış ve gereken bütün seyreltmeler hazırlanan stok çözelti üzerinden yapılmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden ultra saf suda hazırlananlar 4 °C'de, HPLC saflıktaki etanol de hazırlanan stok çözeltiler ise -18°C'de saklanılarak muhafaza edilmiştir. (Glutasyon, sistein, sisteamin, N-asetil sistein çözeltileri ultra saf suda, α -Tokoferolçözeltisi ise %2'lik metil- β -siklodekstrinde hazırlanmıştır).

Yeşil çay bitki özütü için, beherde içerisinde kaynatılmış yaklaşık 50 mL ultra saf su içerisine 0,5 g yeşil çay bitkisi tartılarak ilave edildi ve 10 dakika boyunca 100°C'de demlenmeye bırakıldı. Yapılan inkübasyon işleminden sonra oluşan ekstrakt önce adi süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülüp, daha sonra mikrofiltreden geçirilerek oluşan berrek çözelti soğumaya bırakıldı ve ardından 1:36 oranında su ile seyreltildikten sonra analizde kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

Portakal suyu ise önce adi süzgeç kâğıdı yardımıyla süzülüp, daha sonra 0,45 μ m'lik membran filtreden şırınga yardımıyla geçirildi. Oluşan berrak çözelti 1:10 oranında su ile seyreltildikten sonra analiz için hazır hale getirildi.

3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB)'in stok çözeltisi 1×10^{-2} M olacak şekilde 0,012 g tartılıp HPLC saflıktaki etil alkolle çözülerek günlük hazırlandı. Sitrik asit-mono hidrojen fosfat tamponu 0,1 M (pH 4) olacak şekilde hazırlandı. Sentezlenen MnO₂ nanopartikülün (MnO₂ – NPs) süspanse stok çözeltisi için 0,02 g MnO₂ -NPs olacak şekilde tartılarak 25 mL ultra saf su ile tamamlanılarak hazırlandı.

Bakır (II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde CuCl₂.2H₂O'tan 0,4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat tamponu, 1 M (pH 7) olacak şekilde 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin (2,9-

dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.156 g tartım alınıp etanolle 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Geliştirilen yöntemde salisilik asit 10 mM olacak şekilde etanolde, 300 μ M nitroblue tetrazolyum (NBT), 2.0 M NaNO_2 , 0.1 M Na_2MoO_4 , 6 M NaOH , 3 M asetik asit tamponu ve 0,2 M fosfat tamponu ise saf suda hazırlanılmıştır.

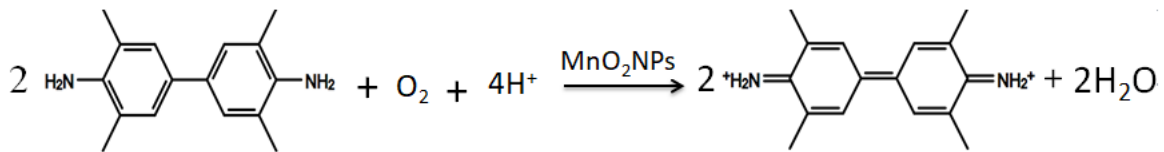
3.4. ANTİOKSİDAN AKTİVİTE TAYİNİ İÇİN MANGAN DİOKSİT NANOPARTİKÜL ESASLI SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

3.4.1. Mangan Dioksit Nanopartikül (MnO_2 –NPs) Sentezi

MnO_2 sentezi için 0,632 g (4 mmol) KMnO_4 tartılarak sentez balonuna alındı ve üzerine 30 mL ultra saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlandı. Ardından 0,706 g (4 mmol) olacak şekilde askorbik asit tartıldı ve 20 mL ultra saf su ilave edilerek ultrasonikte çözünmesi sağlandı. Hazırlanan askorbik asit çözeltisi yavaş yavaş çözünmüş olan KMnO_4 çözeltisine eklenilir ve 30 dakika sıcaklık olmadan manyetik karıştırıcısında karıştırıldı. 30 dakika sonunda süzme işlemine geçildi. Elde edilen katı 3 kez ultra saf su 2 kez de etil alkolle yıkandıktan sonra 60 °C de etüvde bir gece kurumaya bırakıldı (Wang ve diğ. 2011).

3.4.2. MnO_2 Nanopartikül Esaslı Sensör Hazırlanması

Deney tüpü içerisine 4 mL 0,1 M sitrik asit-monohidrojen fosfat tamponu (pH 4) 0,1 mL MnO_2 –NPs ve 0,15 mL 10^{-2} M TMB eklenir ve son hacim 5 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlanılarak karıştırıldı. MnO_2 nanopartikülleri TMB reaktifinin oksidasyonuna neden olduğundan son durumda berrak mavi çözelti (prob) oluşur. Oluşan prob oda koşullarında 5 dakika bekletildi.



3.4.3. MnO₂ Nanopartikül Esaslı Spektrofotometrik Antioksidanların Aktivite Tayin Yöntemi

Geliştirilen MnO₂ nanopartikül esaslı antioksidan tayin yönteminde, hazırlanan prop çözeltilisinden deney tüpü içerisine 2 mL alınır ve üzerine her bir antioksidan farklı çalışma aralığında olacak şekilde eklenilir ve 30 dakika oda koşullarında (kateşin, rutin, p-kumarik asit ve vanilik asit hariç) bekletildi (kateşin, rutin, p-kumarik asit ve vanilik asit 5 dakika 37,5°C' de inkübe edildi). 30 dakika sonunda referans çözeltilinin absorbansına karşı, prob ve antioksidan arasında meydana gelen redox tepkimesi sonucu okside antioksidanlar varlığında örnek çözeltilisinin absorbansında bir azalma gözlemlendi. Absorbanstaki bu azalış, ΔA , uygun reaksiyon süresi sonunda UV/görünür bölge spektrofotometresinde 650 nm dalga boyunda referans çözeltiliye karşı absorbans ölçümü yapıldı.

4. BULGULAR

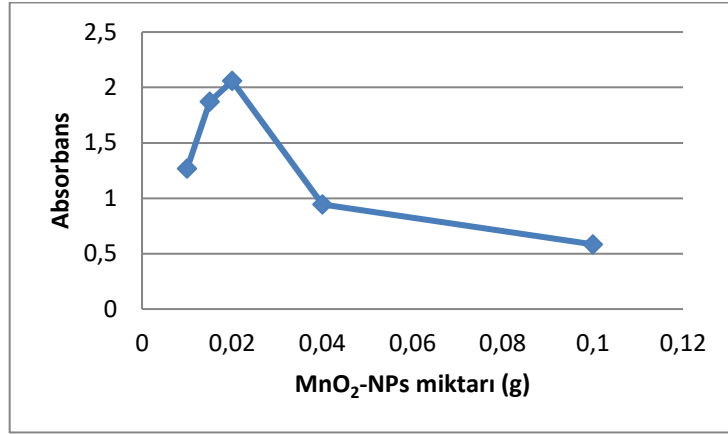
4.1. MANGAN DİOKSİT NANOPARTİKÜL ESASLI YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN STANDART ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI

4.1.1. Yöntemin Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

4.1.1.1. MnO₂ Nanopartiküllerin Miktarının Belirlenmesi

(i) Gram Miktarının Belirlenmesi:

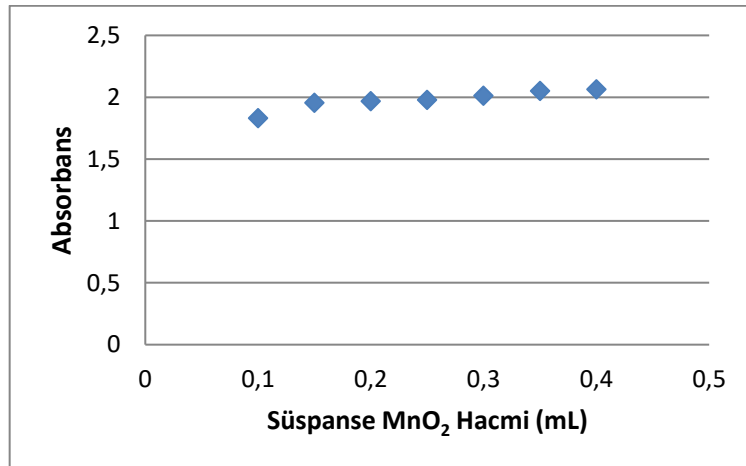
MnO₂ nanopartiküllerin TMB reaktifi ile redoks reaksiyonunda MnO₂ nanopartiküllerin miktarı çok önemlidir. Bu bağlamda 0,01, 0,015, 0,02, 0,04 ve 0,1 g sentezlenmiş MnO₂ nanopartikül katısı tartılarak denemeler yapıldı. Her bir MnO₂ nanopartikülün tartımı için bir deney tüpüne x g MnO₂-NPs, 4ml 0,1 M pH 4 sitrik asit –monohidrojen fosfat çözeltisi, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB reaktifi ve (1-x) mL su eklendikten sonra vortekslenip bir süre oda koşulların da bekletildi.Oluşan probun renk şiddetinin stabil kalmaması ve kısa sürede bazı çökmeler gözlenmiştir.Bu nedenle bu sefer 25 mL'lik balon jöjelere 0,01, 0,015, 0,02, 0,04 ve 0,1 g MnO₂-NPs katısı alınarak ultra saf suda dispers edilmiştir.Ardından her bir süspansiyon MnO₂-NPs çözeltisinden 0,1'er mL alınarak üzerine 4ml 0,1 M pH 4 sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon çözeltisi , 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB reaktifi eklendikten sonra son hacim 5 mL ultra saf su ile tamamlandı.Oluşan nano prop bir süre oda koşulların da bekletildikten sonra UV/görünür bölge spektrofotometresi ile referans çözeltilere karşı spektrumları alındı.



Şekil 4.1: 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon ve 0,15 ml 1×10^{-2} M TMB varlığında değişen MnO₂ NP'lerin miktarına karşı (0,01, 0,015, 0,02, 0,04 ve 0,1 g) elde edilen absorbans değerlerine ait optimizasyon grafiği.

(ii) Hacim Miktarının Belirlenmesi:

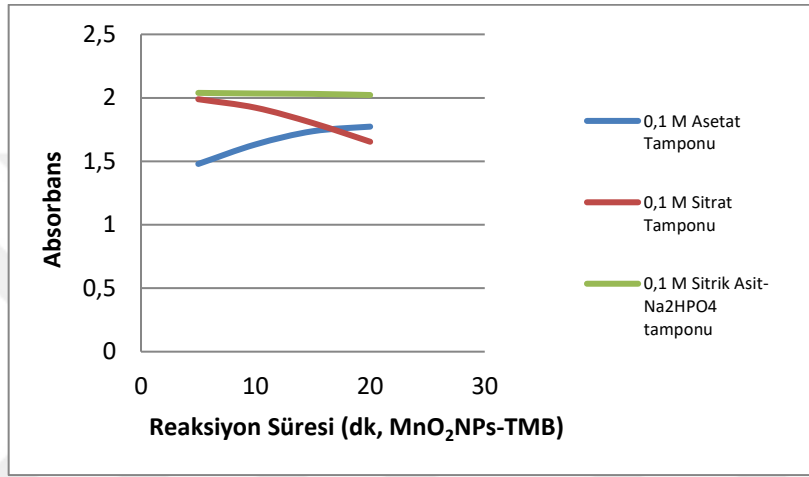
Hazırlanmış süspans MnO₂-NPs çözeltisinden 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 ve 0,4 mL alınarak denemler yapıldı. Bir deney tüpü içerisine 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon çözeltisi, x mL süspans MnO₂-NPs çözeltisi, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB reaktifi ve (1-x) mL ultra saf su eklenerek karıştırıldı. Oluşan nano prop bir süre oda koşulların da bekletildikten sonra UV/görünür bölge spektrofotometresi ile referans çözeltiliye karşı spektrumları alındı.



Şekil 4.2: 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon ve 0,15 ml 1×10^{-2} M TMB varlığında değişen MnO₂ NP'lerin miktarına karşı (0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 ve 0,4 mL) elde edilen absorbans değerlerine ait optimizasyon grafiği.

4.1.1.2. Tampon Çözelti Sisteminin Seçilmesi

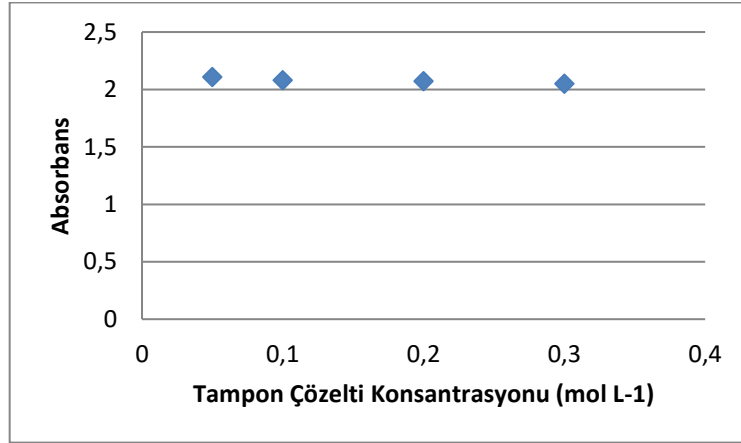
Tampon çözeltisi hem TMB reaktifinin etkinliğini hem de çözelti ortamında bulunan mangan dioksit nanopartiküllere etkisi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle farklı tampon çözelti sistemleri seçilerek bu tampon çözeltilerin etkisi incelendi. Bu bağlamda belirli derişimler de asetik asit –asetat, sitrik asit –sitrata ve sitrik asit –monohidrojen fosfat tampon çözeltileri hazırlandı ve yöntemle uygulanarak absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 4.3: Geliştirilen yöntemle tampon sisteminin etkisi.

4.1.1.3. Tampon Çözelti Konsantrasyonunun Belirlenmesi

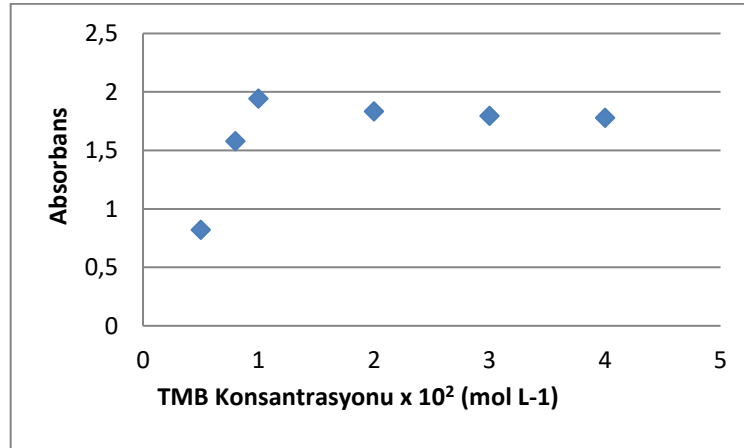
Seçilen tampon çözeltisinin konsantrasyonu; TMB reaktifinin etkinliği, ortamda bulunan mangan dioksit nanopartiküllerin etkisi ve oluşan probun kararlılığı açısından önemlidir. Bu nedenle 0,05, 0,1, 0,2 ve 0,3 M 'lik değişen konsantrasyonlarda tampon çözeltilerin etkisi incelenmiştir. Hazırlanan bu konsantrasyonlarda tampon çözeltisinden 4 mL alınarak üzerine sırasıyla 0,1 mL süspansiyon MnO₂-NPs çözeltisi, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB reaktifi eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlandı. Oluşan nano prob bir süre oda koşullarında bekletildikten sonra UV/görünür bölge spektrofotometresi ile referans çözeltiye karşı spektrumları alındı.



Şekil 4.4: 0,1 mL süspansede MnO₂-NPs çözeltisi ve 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB varlığında değişen tampon konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbanslarına ait optimizasyon grafiği.

4.1.1.4. Uygun Reaktif Konsantrasyonunun Belirlenmesi

TMB konsantrasyonu, TMB reaktifinin mangan dioksit nanopartikülleri indirgemesi sonucu ortaya çıkan TMB katyonunun kararlılığı yani oluşan probun kararlılığı için önemlidir. Bu nedenle uygun TMB reaktifi konsantrasyonunu belirlemek için 8×10^{-3} , 1×10^{-2} , 2×10^{-2} , 3×10^{-2} , 4×10^{-2} ve 5×10^{-2} M'lık değişen konsantrasyonlar da çalışılarak geliştirilen yönteme uygulandıktan sonra her bir konsantrasyon için absorbans değerleri ölçülmüştür.



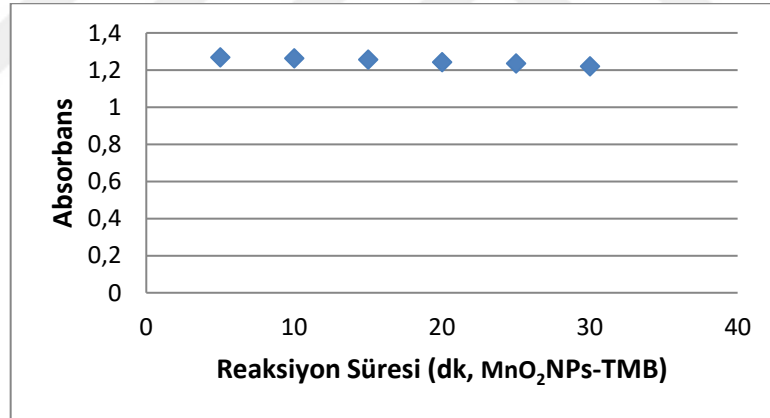
Şekil 4.5: 0,1 mL süspansede MnO₂-NPs çözeltisi ve 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tampon varlığında değişen TMB konsantrasyonuna karşı elde edilen absorbanslara ait optimizasyon grafiği.

4.1.1.5. Uygun Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Geliştirilen yöntemde iki ayrı reaksiyon olduğu için iki ayrı reaksiyon süresi vardır. Birincisi mangan dioksit nanopartiküller ile TMB reaktifi arasındaki redoks tepkimesi, ikincisi ise birinci redoks tepkimesi sonucu oluşan TMB katyonu ile bazı antioksidanlar arasındaki redoks tepkimesidir.

(i) MnO₂ NPs – TMB Arasındaki Reaksiyon Süresi

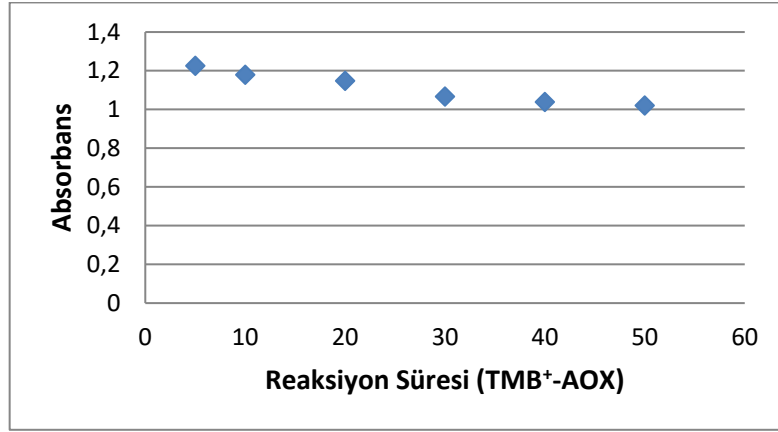
Bir deney tüpü içerisine 4 mL 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tamponu alınarak üzerine belli miktarda suda dispers halinde hazırlanmış MnO₂-NPs çözeltisinden 0,1 mL, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlandı. Bu reaksiyon sonucunda TMB reaktifinin mangan dioksit nanopartikülleri indirilmesi sonucu ortaya çıkan TMB katyonunun karakteristik mavi renginin dengeye gelmesi için 5, 10, 20, 25 ve 30 dakika oda koşullarında bekletildi ve her bir deneme için UV/görünür bölge spektrofotometresi ile absorbans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4.6: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltisinde MnO₂ NP'lerin 1×10^{-2} M TMB okside etmesi için gerekli reaksiyon süresine karşı elde edilen absorbanslara ait optimizasyon grafiği.

(ii) TMB Katyonu ile Antioksidanlar Arasındaki Reaksiyon Süresi

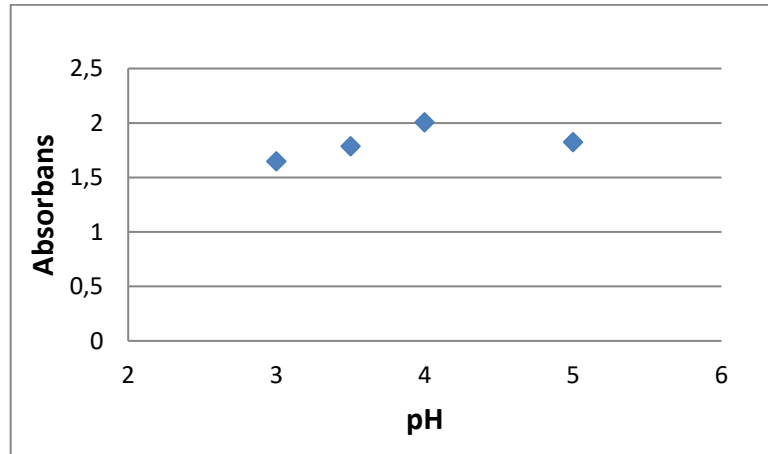
Bir deney tüpü içerisine 4 mL 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tamponu alınarak üzerine 0,1 mL süspanse MnO₂-NPs çözeltisi, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlandıktan sonra 5 dakika oda koşullarında bekletildi. 5 dakika sonra hazırlanan çözeltiden 2 mL alınarak üzerine stok çözeltilerden alınan farklı antioksidan çözeltilerinden aynı hacimlerde alınarak ilave edildikten sonra 5, 10, 20, 30, 40 ve 50 dakika oda koşullarında bekletilerek absorbans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4.7: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltisinde TMB kasyonu ile antioksidanlar arasındaki redoks tepkimesinin termodinamik olarak dengeye gelmesi için gerekli reaksiyon süresine karşı elde edilen absorbanslara ait optimizasyon grafiği.

4.1.1.6. Ortam pH'sının Belirlenmesi

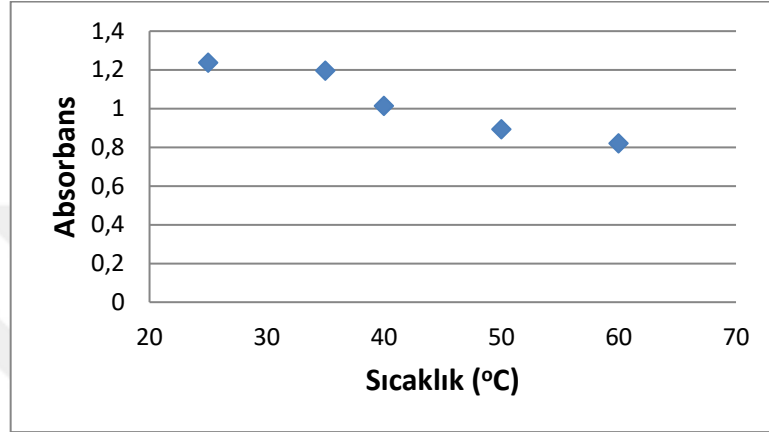
Mangan dioksit nanopartikülleri ve TMB arasında gerçekleşen redoks tepkimesinde pH etkisini incelemek için deney tüpü içerisine 4ml 0,1 M sitrik asit – monohidrojen fosfat pH 'sı 3.0 ile 5.0 arasında değişen tampon çözeltilerinden alınarak üzerine üzerine 0,1 mL süspansiyon MnO₂-NPs çözeltisi, 0,15 mL 1×10^{-2} M TMB eklenerek son hacim 5 mL olacak şekilde ultra saf su ile tamamlandıktan sonra bir süre oda koşullarında bekletildi ve her bir çözeltinin absorbans değeri ölçülmüştür.



Şekil 4.8: Geliştirilen yönteme pH'ın etkisi.

4.1.1.7. Ortam Sıcaklığının Belirlemesi

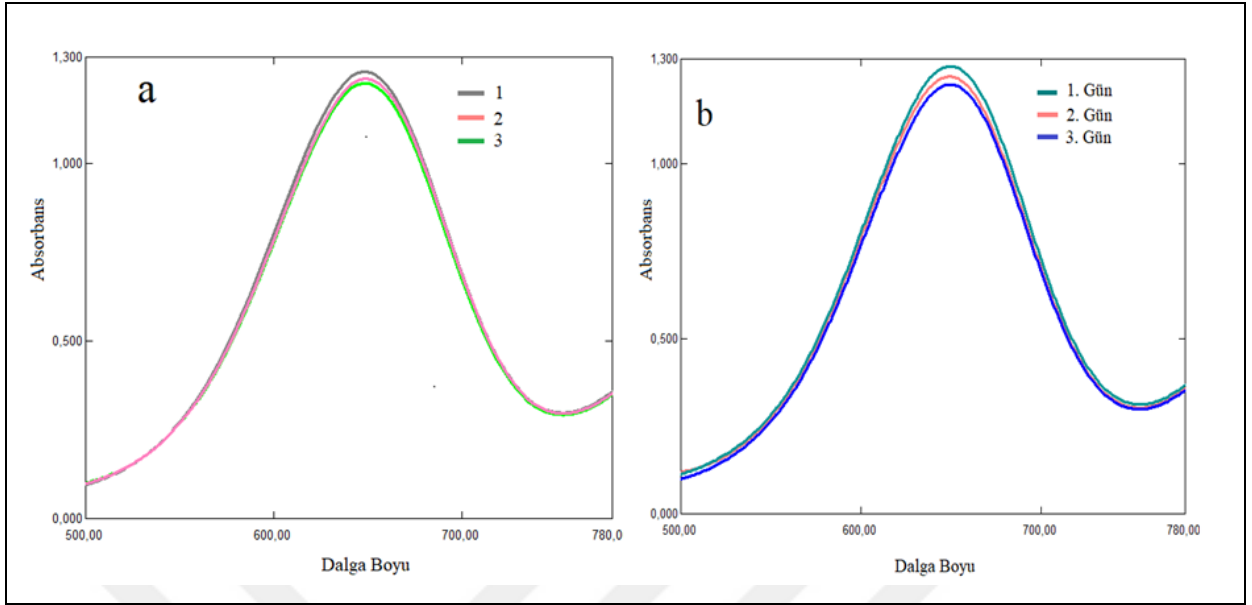
Reaksiyon ortamına TMB eklendikten sonra sıcaklığın reaksiyon hızına etkisini incelemek için örnek çözeltiler 35, 40, 50 ve 60 °C 'de su banyosunda ve oda koşullarında (25 °C) 5 dakika bekletildi ve her bir sıcaklık denemesi için UV/görünür bölge spektrofotometresi ile absorbans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4.9: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prob çözeltilisine sıcaklığın etkisi.

4.1.2. MnO₂ NPs Temelli Sensörünün Kararlılığının Belirlenmesi

Mangan dioksit nanopartikül sensörünün kararlılığı belirlemek için nano sensör 3.4.2. bölümde olduğu gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan nano problemlerin kararlılığı gün içi ve günler arası (şekil 4.10) UV/ görünür spektrofotometresinde yapılan ölçümler ile belirlenmiştir.

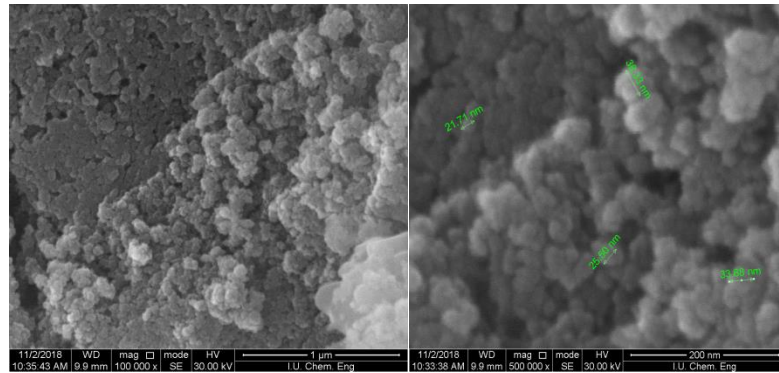


Şekil 4.10: Mangan dioksit nanopartikül temelli sensörün gün içi (a) ve günler arası (b) spektrumları.

4.1.3. Sentezlenen Mangan Dioksit Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

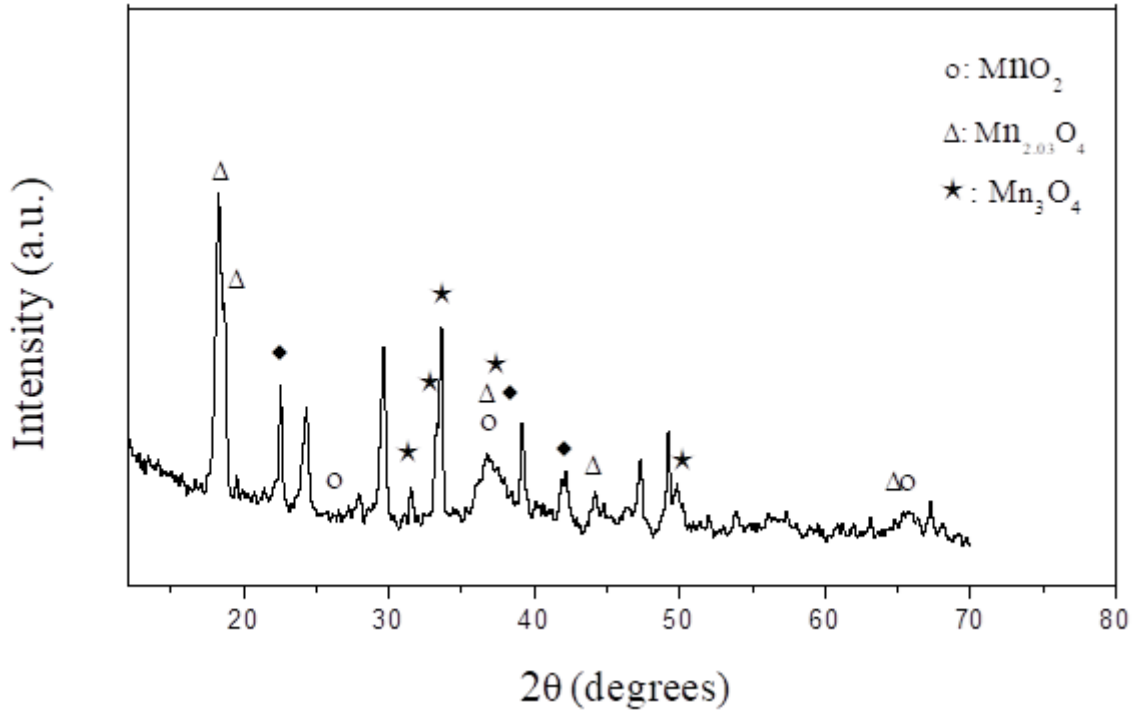
4.1.3.1. SEM Analizi İle Karakterizasyonu

Geliştirilen yöntemde, mangan dioksit nanopartiküller literatüre göre sentezlenmiştir. Sentezlenen mangan dioksit nanopartiküllerinin SEM analizi sonucunda partikül boyutunun yaklaşık 20-39 nm arasında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11: MnO₂ NP'lerin SEM görüntüleri.

4.1.3.2. XRD ile Karakterizasyonu

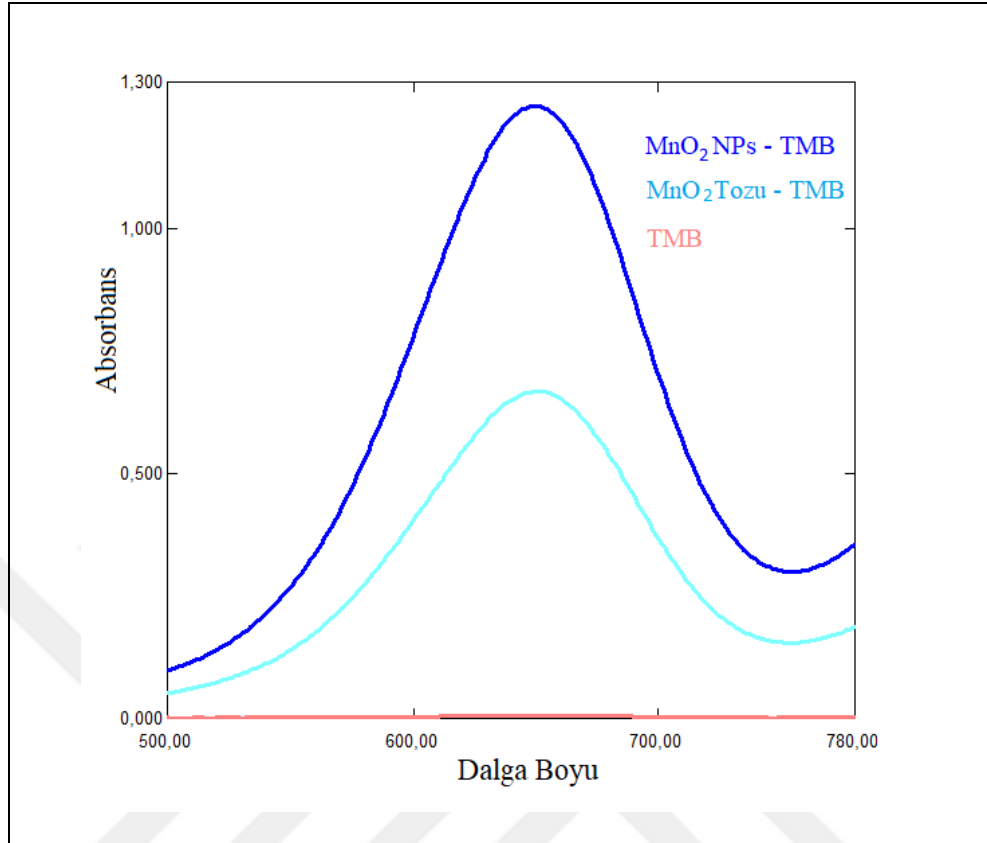


Şekil 4.12: Sentezlenen nanopartiküllerin XRD görüntüsü.

Karışık oksit yapıdaki oksit dağılımları diyagramda belirtilen pik şiddetleri dikkate alınarak hesaplanmış ve %54 Mn₂O₄ ($2\theta = 18,27$), %41 Mn₃O₄ ($2\theta = 33,67$), %20 MnO₂ ($2\theta = 36,77$) ve diğerleri şeklinde belirlenmiştir.

4.1.4. MnO₂-NP'lerin Peroksidaz ve Oksidaz Benzeri Aktivitelerinin Karakterizasyonu

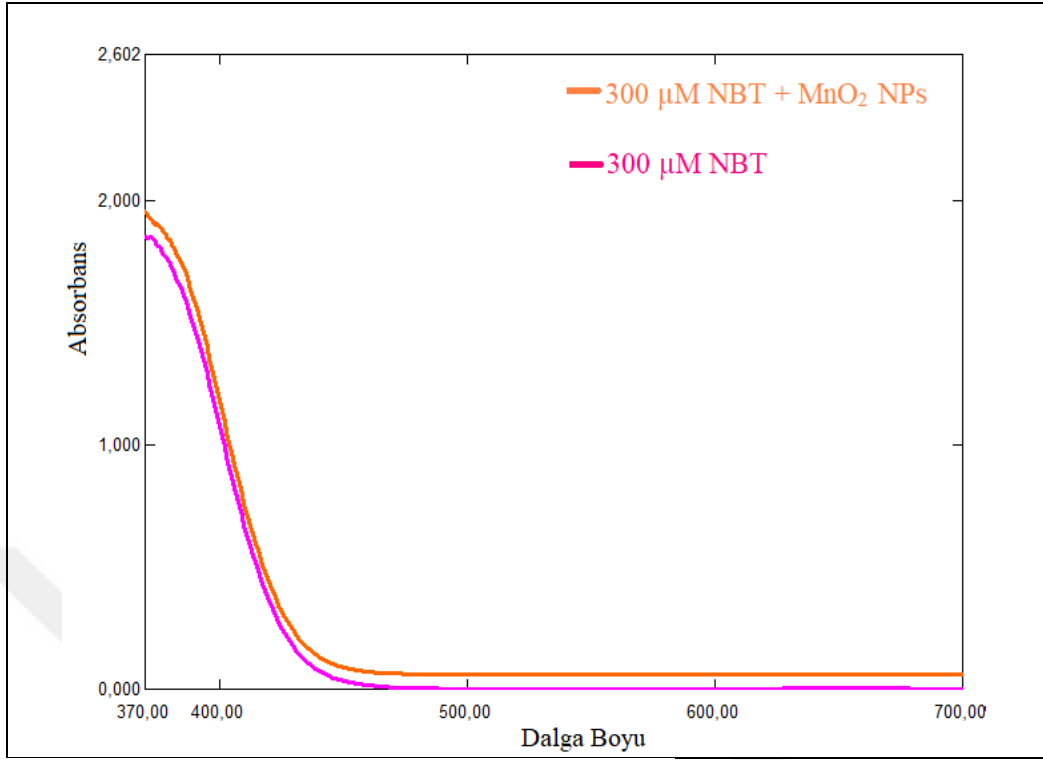
MnO₂-NP'lerin peroksidaz ve oksidaz benzeri aktivitelerinin karakterizasyonu için eş zamanlı ve 4ml 0,1 M (pH 4) sitrik asit – monohidrojen fosfat tamponu varlığında hazırlanılan; TMB-MnO₂ NPs (1:2 oranında seyreltilmiş), TMB- MnO₂ tozu ve TMB çözeltilerinin her biri UV/görünür bölge spektrofotometresi ile absorbans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4.13: 1:2 oranında seyreltilmiş TMB- MnO₂ NPs, TMB- MnO₂ tozu ve TMB çözeltilerine ait spektrumlar (λ_{max} =650 nm).

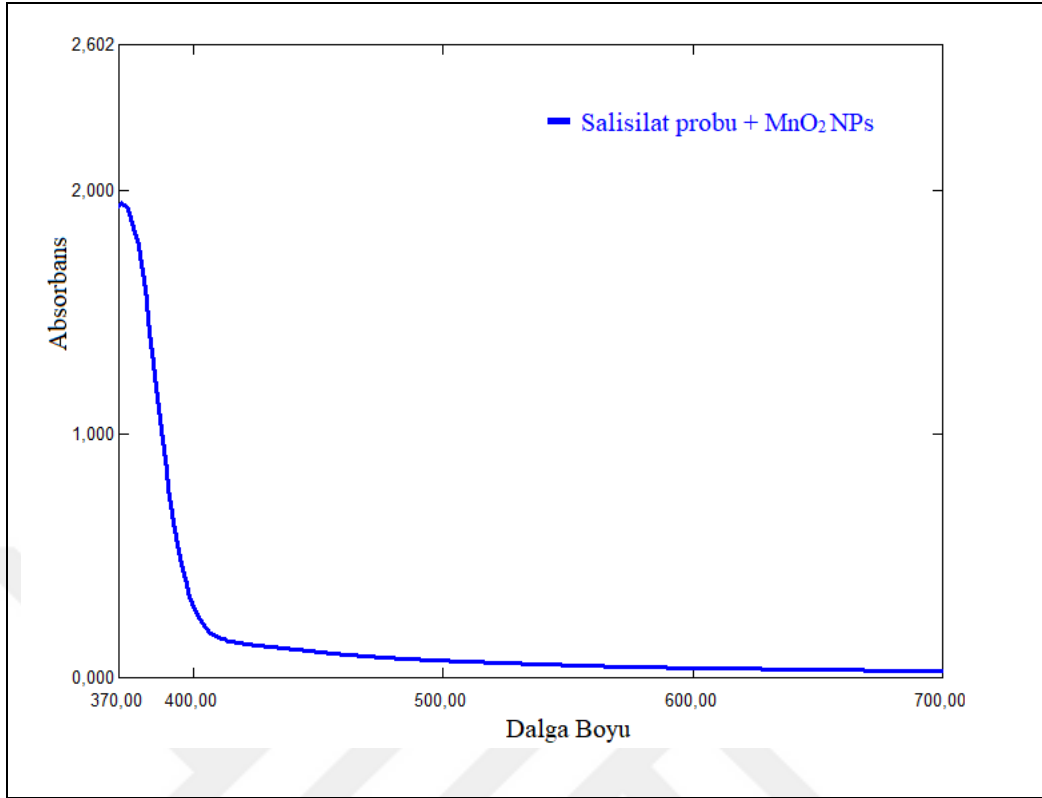
4.1.5.Ortamda Bulunması Muhtemel Reaktif Türlerin Varlığının İncelenmesi

Ortamda bulunabilecek reaktif türlerinden biri olan süper oksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varlığının incelenmesinde hazırlanan 300 μ M nitroblue tetrazolyum (NBT) çözeltisinden 1 mL (Bekdeşer ve diğ. 2011) alınarak geliştirilen yöntem uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen mangan dioksit nanopartikül temelli spektrofotometrik yöntem ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.14: NBT ve NBT-MnO₂NPs çözeltilerinin spektrumları.

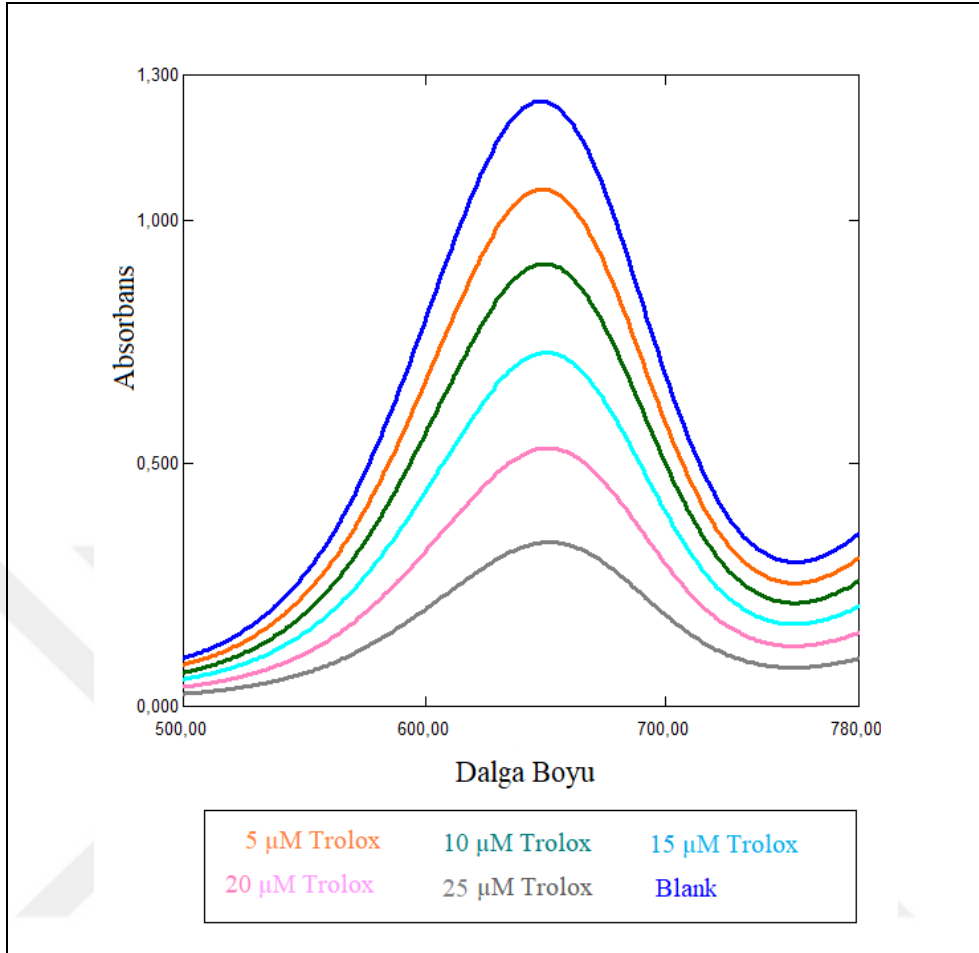
Ortamda bulunabilecek bir diğer reaktif tür olan hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) tespiti için ise süspansiyonda bulunan mangan dioksit nanopartikül çözeltisinden 0,1 mL alınarak üzerine 1,5 mL 0,2 M olacak şekilde fosfat tamponu (pH 7) ve 10 mM hazırlanmış salisilik asit çözeltisinden 0,5 mL eklenilerek hazırlanan karışım 37°C’de 10 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan çözeltiden 2 mL alınarak üzerine sırasıyla 2 M NaNO₂, 0,1 M Na₂MoO₄ ve 3 M asetat tamponundan (pH 5,2) 1’er mL eklenerek son hacim 9 mL olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan karışım 15 dakika oda koşullarında bekletildikten sonra 6 M NaOH çözeltisinden 1 mL eklenmiştir (Bayarsaikhan ve diğ. 2018).



Şekil 4.15: Salisilat probu- MnO₂NPs çözeltilerinin pektrumları.

4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Trolox Antioksidan Bileşiğine Uygulanması

Geliştirilen MnO₂ nanopartikül esaslı antioksidan tayin yönteminde sonuçlar trolox bileşiği referans alınarak inceleneceği için trolox bileşiğinin $7,5 \times 10^{-5}$ M standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltilerden farklı hacimler alınarak bölüm 3.4.3.'de belirtilen şekilde yönteme uygulandı. Trolox için farklı derişimlerde elde edilen spektrumlar Şekil 4.11' de gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda maksimum absorpsiyon dalgaboyu 650 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.16: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisinde farklı konsantrasyonlarda bulunan Trolox bileşiğinin absorpsiyonunda meydana gelen azalmanın (ΔA) görünür alan bölgesindeki spektrumu.

Tablo 4.1: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Trolox bileşiğinin molar konsantrasyon ve absorpsiyonunda meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi (c: molar konsantrasyon ve ΔA : absorpsiyon farkı).

Konsantrasyon (M)	ΔA
5×10^{-6}	0,171
10×10^{-6}	0,338
15×10^{-6}	0,518
20×10^{-6}	0,714
25×10^{-6}	0,908
Doğru Denklemi : $\Delta A = 3,7 \times 10^4 C_{TR} - 0,0252$ $r = 0,9995$	

Trolox bileşiğinin kalibrasyon doğrusu sonucunda elde edilen doğru denklemi $\Delta A = 3,7 \times 10^4 c - 0,0252$ olarak bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin molar absorpsiyon katsayısına (ϵ) karşılık gelmektedir. Troloks bileşiğinin molar absorpsiyon

katsayısı $3,7 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur (Doğru denklemi $A=aC + b$ şeklinde olup A =analitik veri, C =konsantrasyon, a =eğim, b = kayım). Elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) 4,85 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7. Geliştirilen Yönteme Uygulanan Antioksidanların Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması, Lineer Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi, Molar Absorplama Katsayılarının Bulunması, LOD ve LOQ Değerlerinin Bulunması

Geliştirilen yönteme antioksidanlar uygulanarak her bir antioksidan için çalışma aralıkları belirlenerek kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve molar absorplama katsayısı bulunmuştur.

4.1.7.1. Kateşin

Tablo 4.2: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kateşin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
5×10^{-6}	0,22
10×10^{-6}	0,341
15×10^{-6}	0,599
20×10^{-6}	0,766
25×10^{-6}	0,95
Doğru Denklemi: $\Delta A = 3,63 \times 10^4 C_{CT} + 0,0442$ $r = 0,9997$	

Kalibrasyon grafiğinde edilen doğru denkleminde yararlanılarak kateşin bileşiğinin molar absorplama katsayısı $3,63 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağıl standart sapma (% RSD) 1,65 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.2. Kuarsetin

Tablo 4.3: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kuarsetin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbanlarında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$3,33 \times 10^{-6}$	0,285
$6,66 \times 10^{-6}$	0,49
$9,99 \times 10^{-6}$	0,688
$13,3 \times 10^{-6}$	0,883
$16,7 \times 10^{-6}$	1,043
Doğru Denklemi : $\Delta A = 5,73 \times 10^4 C_{QR} + 0,1051$ $r = 0,9989$	

Kuarsetin bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak kuarsetin bileşiğinin molar absorplama katsayısı $5,73 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 2,56 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.3. Askorbik Asit

Tablo 4.4: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Askorbik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbanlarında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,206
$13,3 \times 10^{-6}$	0,414
20×10^{-6}	0,611
$26,7 \times 10^{-6}$	0,804
$33,4 \times 10^{-6}$	1,016
Doğru Denklemi: $\Delta A = 3,01 \times 10^4 C_{AA} + 0,0072$ $r = 0,9998$	

Askorbik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak askorbik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $3,01 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur.

4.1.7.4. Kafeik Asit

Tablo 4.5: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kafeik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$2,67 \times 10^{-6}$	0,242
$5,34 \times 10^{-6}$	0,467
8×10^{-6}	0,669
$10,6 \times 10^{-6}$	0,858
$13,33 \times 10^{-6}$	1,025
Doğru Denklemi: $\Delta A = 7,34 \times 10^4 C_{KAF} + 0,0651$ $r = 0,9985$	

Kafeik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak kafeik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $7,34 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 4,35 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.5. Gallik Asit

Tablo 4.6: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Gallik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
2×10^{-6}	0,182
4×10^{-6}	0,354
6×10^{-6}	0,52
8×10^{-6}	0,684
10×10^{-6}	0,821
Doğru Denklemi : $\Delta A = 8,04 \times 10^4 C_{GA} + 0,0298$ $r = 0,9992$	

Gallik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak gallik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $8,04 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 2,84 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.6. Rutin

Tablo 4.7: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Rutin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbanlarında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$1,33 \times 10^{-5}$	0,24
$2,66 \times 10^{-5}$	0,416
$3,99 \times 10^{-5}$	0,61
$5,33 \times 10^{-5}$	0,773
$6,66 \times 10^{-5}$	0,872
Doğru Denklemi: $\Delta A = 1,21 \times 10^4 C_{RT} + 0,0971$ $r = 0,9946$	

Rutin bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak rutin bileşiğinin molar absorplama katsayısı $1,21 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 5,56 olarak hesaplanmıştır.

4.1.6.7. p-Kumarik Asit

Tablo 4.8: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki p-Kumarik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbanlarında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,274
$13,3 \times 10^{-6}$	0,414
20×10^{-6}	0,56
$26,7 \times 10^{-6}$	0,689
$33,4 \times 10^{-6}$	0,795
Doğru Denklemi : $\Delta A = 1,97 \times 10^4 C_{CMA} + 0,1513$ $r = 0,9982$	

p-Kumarik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak p-kumarik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $1,97 \times 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 4,84 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.8. Klorojenik Asit

Tablo 4.9: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Klorojenik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,206
$13,3 \times 10^{-6}$	0,384
20×10^{-6}	0,564
$26,7 \times 10^{-6}$	0,7
$33,4 \times 10^{-6}$	0,85
Doğru Denklemi : $\Delta A = 2,4 \times 10^4 C_{CGA} + 0,0596$ $r = 0,9983$	

Klorojenik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak klorojenik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $2,4 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 1,12 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.9. Vanilik Asit

Tablo 4.10: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Vanilik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-5}$	0,193
$13,3 \times 10^{-5}$	0,342
20×10^{-5}	0,503
$26,7 \times 10^{-5}$	0,645
$33,4 \times 10^{-5}$	0,752
Doğru Denklemi: $\Delta A = 2,13 \times 10^3 C_{VA} + 0,0607$ $r = 0,9976$	

Vanilik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak

vanilik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $2,13 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 1,78 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.10. Ferulik Asit

Tablo 4.11: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Ferulik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$3,33 \times 10^{-6}$	0,216
$6,66 \times 10^{-6}$	0,438
$9,99 \times 10^{-6}$	0,648
$13,3 \times 10^{-6}$	0,862
$16,7 \times 10^{-6}$	1,025
Doğru Denklemi : $\Delta A = 6,13 \times 10^4 C_{\text{FRA}} + 0,0252$ $r = 0,9986$	

Ferulik asit bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak ferulik asit bileşiğinin molar absorplama katsayısı $6,13 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 2,04 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.11. Kamferol

Tablo 4.12: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Kamferol bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbandsında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,209
$13,3 \times 10^{-6}$	0,391
20×10^{-6}	0,583
$26,7 \times 10^{-6}$	0,76
$33,4 \times 10^{-6}$	0,91
Doğru Denklemi : $\Delta A = 2,65 \times 10^4 C_{\text{KA}} + 0,0393$ $r = 0,9991$	

Kamferol bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak kamferol

bileşiminin molar absorplama katsayısı $2,65 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% , RSD) 4,85 olarak hesaplanmıştır.

4.1.7.12. α -Tokoferol

Tablo 4.13: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki α -Tokoferol bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbensinde meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,267
$13,3 \times 10^{-6}$	0,434
20×10^{-6}	0,602
$26,7 \times 10^{-6}$	0,8
$33,4 \times 10^{-6}$	1,015
Doğru Denklemi : $\Delta A = 2,79 \times 10^4 C_{\text{TOC}} + 0,065$ $r = 0,9983$	

α -Tokoferol bileşiminin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denkleminde faydalanarak α -tokoferol bileşiminin molar absorplama katsayısı $2,79 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% , RSD) 4,06 olarak hesaplanmıştır

4.1.7.13. Glutatyon

Tablo 4.14: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Glutatyon bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbensinde meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,221
$13,3 \times 10^{-6}$	0,442
20×10^{-6}	0,654
$26,7 \times 10^{-6}$	0,871
$33,4 \times 10^{-6}$	1,061
Doğru Denklemi : $\Delta A = 3,16 \times 10^4 C_{\text{GSH}} + 0,0171$ $r = 0,9996$	

Glutasyon bileşiminin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denkleminde faydalanarak glutasyon bileşiminin molar absorplama katsayısı $5,73 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 0,816 olarak hesaplanmıştır

4.1.7.14. Sistein

Tablo 4.15: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Sistein bileşiminin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansta meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$3,33 \times 10^{-6}$	0,225
$6,66 \times 10^{-6}$	0,408
$9,99 \times 10^{-6}$	0,613
$13,3 \times 10^{-6}$	0,818
$16,7 \times 10^{-6}$	1,036
Doğru Denklemi : $\Delta A = 6,1 \times 10^4 C_{\text{CYS}} + 0,0104$ $r = 0,9995$	

Sistein bileşiminin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denkleminde faydalanarak sistein bileşiminin molar absorplama katsayısı $6,1 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 0,559 olarak hesaplanmıştır.

1.4.7.15. Sisteamin

Tablo 4.16: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki Sisteamin bileşiğinin artan konsantrasyonları ve oluşan oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$3,33 \times 10^{-6}$	0,11
$6,66 \times 10^{-6}$	0,2
$9,99 \times 10^{-6}$	0,298
$13,3 \times 10^{-6}$	0,402
$16,7 \times 10^{-6}$	0,504
Doğru Denklemi : $\Delta A = 2,97 \times 10^5 C_{\text{CYS-NH}_2} + 0,0058$ $r = 0,9996$	

Sisteamin bileşiğinin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak sisteamin bileşiğinin molar absorplama katsayısı $2,97 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 3,29 olarak hesaplanmıştır

4.1.7.16. N-Asetil Sistein

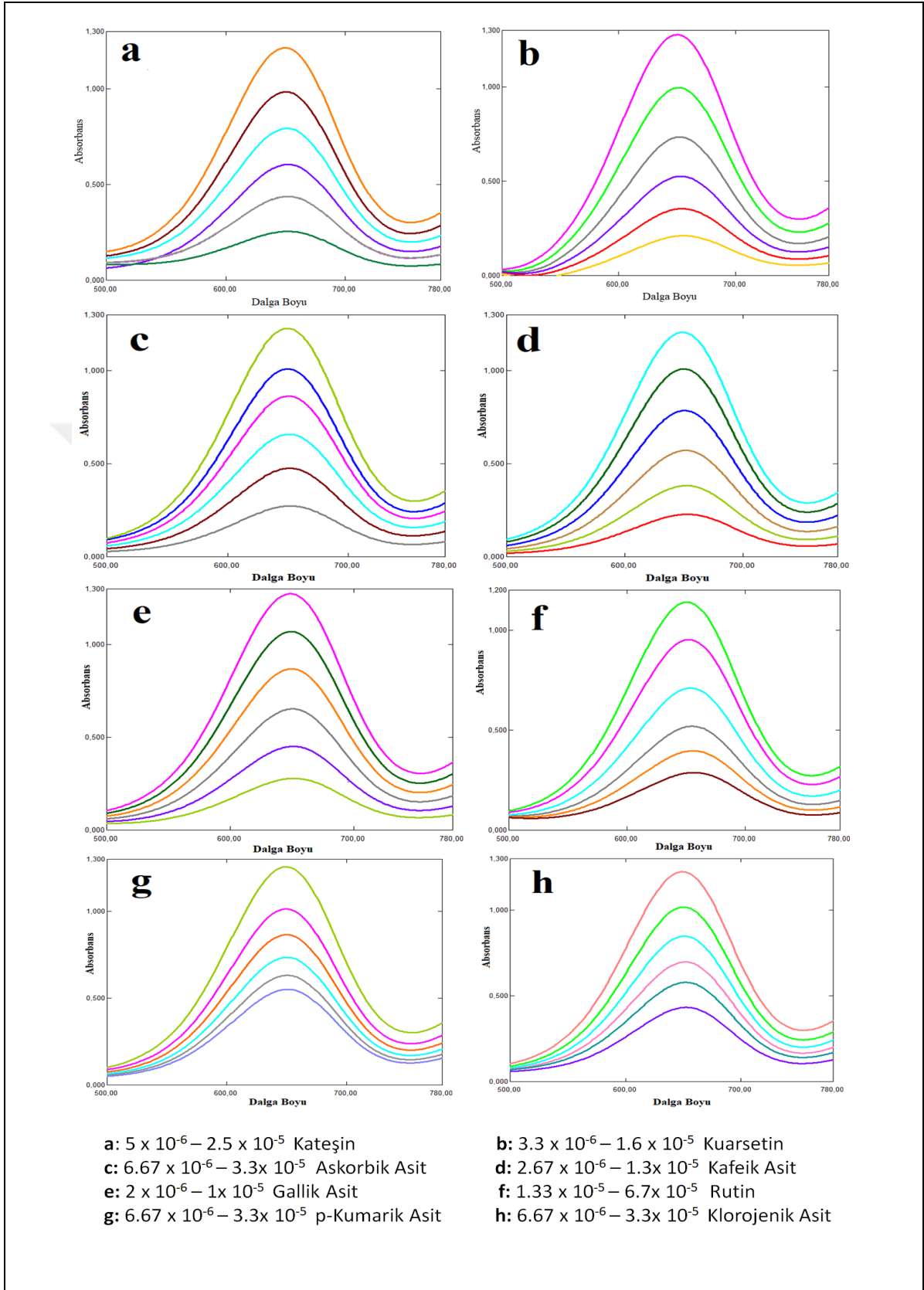
Tablo 4.17: 1:2 oranında seyreltilmiş nano prop çözeltisi içerisindeki N-Asetil sistein bileşiğinin artan konsantrasyonları ile oksidasyon ürünlerinin absorbansında meydana gelen azalma (ΔA) arasındaki kalibrasyon grafiği.

Konsantrasyon (M)	ΔA
$6,67 \times 10^{-6}$	0,183
$13,3 \times 10^{-6}$	0,332
20×10^{-6}	0,45
$26,7 \times 10^{-6}$	0,574
$33,4 \times 10^{-6}$	0,714
Doğru Denklemi : $\Delta A = 1,96 \times 10^5 C_{\text{NAC}} + 0,0592$ $r = 0,9993$	

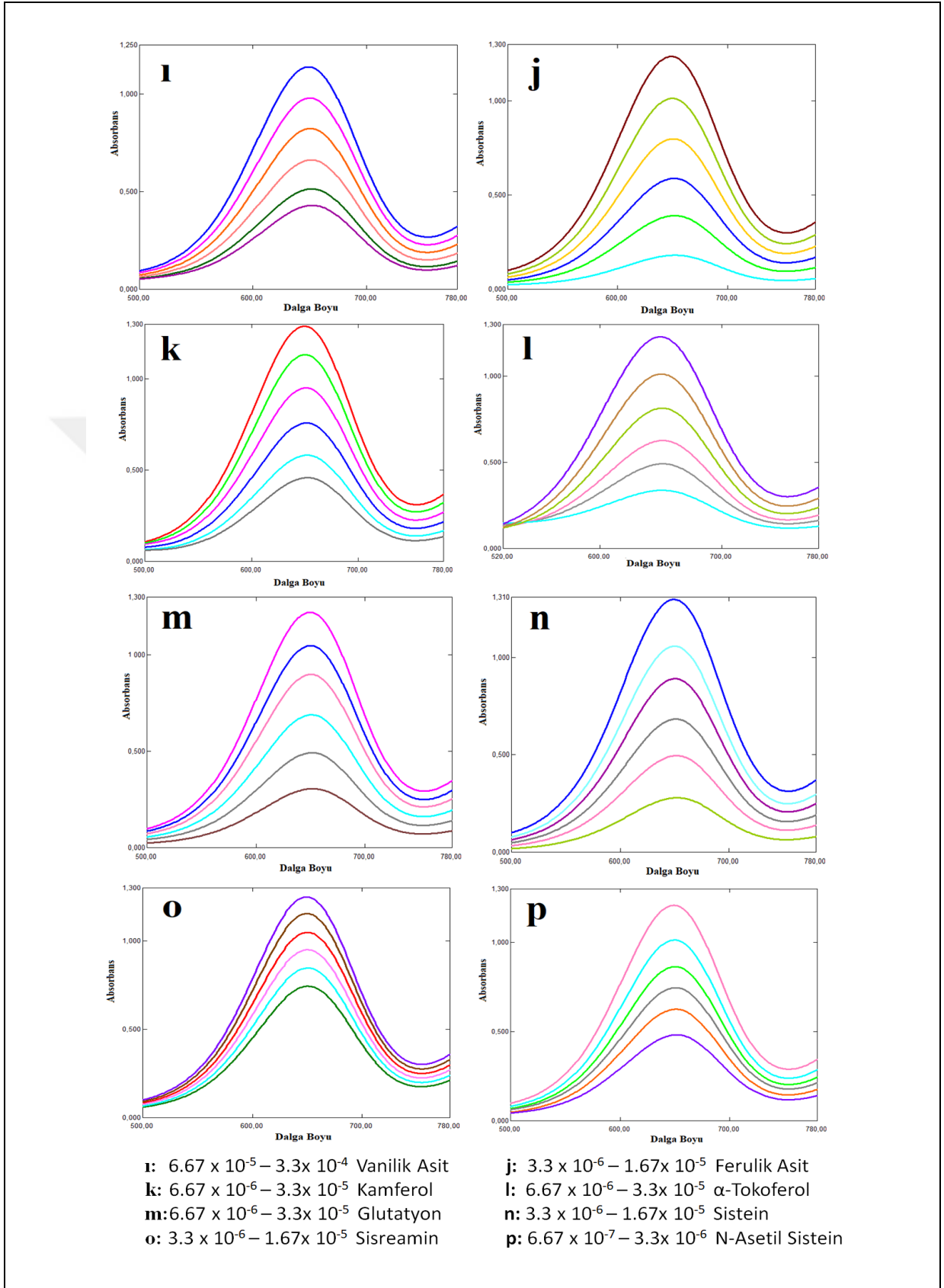
N-asetil sistein bileşiminin artan konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon grafiği sonucunda oluşan doğru denklemden faydalanarak N-asetil sistein bileşiminin molar absorplama katsayısı $1,96 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bağlı standart sapma (% RSD) 3,57 olarak hesaplanmıştır

Geliştirilen yöntemde tayini yapılan antioksidan bileşiklerinin görünür alan bölgesindeki spektrumları Şekil 4.30 ve Şekil 4.31 de verilmiştir.





Şekil 4.17: Geliştirilen yöntemeye uygulanan antioksidan bileşiklerin görünür alan bölgesindeki spektrumu ($\lambda_{max} = 650$ nm).



Şekil 4.18: Geliştirilen yöntemle uygulanan antioksidan bileşiklerin görünür alan bölgesindeki spektrumu ($\lambda_{max} = 650$ nm).

Geliştirilen yöntemde tayini yapılan antioksidan bileşiklerinin molar konsantrasyon ile absorbanlarında meydana gelen azalma arasındaki kalibrasyon grafiğinden yola çıkarak tayini yapılan her bir antioksidan bileşiğin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri Tablo 4.18 ve Tablo 4.19’ da verilmiştir.

$$\text{LOD} = 3 \text{ sbl}/m \quad (4.1)$$

$$\text{LOQ} = 10 \text{ sbl}/m \quad (4.2)$$

LOD ve LOQ değerleri denklem (4.1) ve (4.2) kullanılarak hesaplanmıştır. sbl: blank’in standart sapması (N=3), m: kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

Tablo 4.18: Geliştirilen yönteme uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.

Antioksidanlar	Doğru Denklemleri ve Korelasyon Katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	LOD (M)	LOQ (M)
Troloks(TR)	$A = 3.7 \times 10^4 c + 0.0252$ $r=0.9995$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	$4,57 \times 10^{-9}$	$1,38 \times 10^{-8}$
Kateşin (CT)	$A = 3.63 \times 10^4 c + 0.0442$ $r=0.9997$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	$8,16 \times 10^{-9}$	$2,47 \times 10^{-8}$
Kuersetin (QR)	$A = 5.73 \times 10^4 c + 0.1051$ $r=0.9989$	$3.3 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-9}$	$3,73 \times 10^{-8}$
Askorbik Asit (AA)	$A = 3.02 \times 10^4 c + 0.0072$ $r = 0.9998$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-9}$	$4,85 \times 10^{-8}$
Kafeik Asit (CFA)	$A = 7.34 \times 10^4 c + 0.0651$ $r = 0.9985$	$2.67 \times 10^{-6} - 1.3 \times 10^{-5}$	$5,96 \times 10^{-9}$	$1,81 \times 10^{-8}$
Gallik asit (GA)	$A = 8.04 \times 10^4 c + 0.0298$ $r = 0.9992$	$2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$	$2,49 \times 10^{-9}$	$7,54 \times 10^{-8}$
Rutin (RT)	$A = 1.22 \times 10^4 c + 0.0971$ $r = 0.9939$	$1.33 \times 10^{-5} - 6.7 \times 10^{-5}$	$5,38 \times 10^{-8}$	$1,63 \times 10^{-7}$
p-Kumarik asit (p-CA)	$A = 1.98 \times 10^4 c + 0.1513$ $r = 0.9983$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$2,61 \times 10^{-8}$	$2,61 \times 10^{-8}$

Tablo 4.19: Geliştirilen yönteme uygulanan antioksidan bileşiklerinin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları, LOD ve LOQ değerleri.

Antioksidanlar	Doğru Denklemleri ve Korelasyon Katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	LOD (M)	LOQ (M)
Klorojenik Asit (CGA)	$A = 2.41 \times 10^4 c + 0.0596$ $r = 0.9983$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-9}$	$5,06 \times 10^{-8}$
Vanilik Asit (VA)	$A = 2.12 \times 10^3 c + 0.0631$ $r = 0.9969$	$6.67 \times 10^{-5} - 3.3 \times 10^{-4}$	$1,71 \times 10^{-7}$	$5,18 \times 10^{-7}$
Ferulik Asit (FA)	$A = 6.13 \times 10^4 c + 0.0252$ $r = 0.9986$	$3.3 \times 10^{-6} - 1.67 \times 10^{-5}$	$2,75 \times 10^{-9}$	$8,33 \times 10^{-9}$
Kamferol (KA)	$A = 2.66 \times 10^4 c + 0.0393$ $r = 0.9990$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$9,94 \times 10^{-9}$	$3,08 \times 10^{-8}$
α -Tokoferol (TOC)	$A = 2.79 \times 10^3 c + 0.065$ $r = 0.9983$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-8}$	$4,73 \times 10^{-8}$
Glutasyon (GSH)	$A = 3.16 \times 10^4 c + 0.0171$ $r = 0.9996$	$6.67 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-5}$	$3,63 \times 10^{-9}$	$1,09 \times 10^{-8}$
Sistein (CYS)	$A = 6.10 \times 10^4 c + 0.0104$ $r = 0.9995$	$3.3 \times 10^{-6} - 1.67 \times 10^{-5}$	$1,145 \times 10^{-9}$	$3,47 \times 10^{-9}$
Sisteamin (CYS-NH ₂)	$A = 2.97 \times 10^4 c + 0.0058$ $r = 0.9996$	$3.3 \times 10^{-6} - 1.67 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-9}$	$3,96 \times 10^{-9}$
N-Asetilsistein (NAC)	$A = 1.96 \times 10^5 c + 0.0592$ $r = 0.9993$	$6.67 \times 10^{-7} - 3.3 \times 10^{-6}$	$2,03 \times 10^{-9}$	$6,15 \times 10^{-9}$

4.1.8. Geliştirilen Yöntemde alışılan Standart Antioksidan Bileşiklerinin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi

Geliştirilen yöntemde standart antioksidanların Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri antioksidanların molar konsantrasyonları ile absorbansta meydana gelen azalma arasında oluşturulan kalibrasyon doğru denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. TEAC değerleri antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayılarının troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısına oranı şeklinde hesaplanmıştır.

Tayini yapılan her bir antioksidan bileşiminin geliştirilen yöntem ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen ABTS/persülfat yöntem için hesaplanan TEAC değerleri Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.20: Antioksidan bileşiklerinin geliştirilen yöntem, CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemine göre TEAC değerleri.

Antioksidanlar	TEAC (Geliştirilen Yöntemi)	TEAC (CUPRAC Yöntemi)	TEAC (ABTS/persülfat)
Kuersetin (QR)	1,55	4,39	2,77
Kateşin (CT)	0,98	3,0	-
Askorbik Asit (AA)	0,82	0,74	1,03
KlorojenikAsit (CGA)	0,65	2,54	1,21
Kafeik Asit (CFA)	1,98	2,18	1,39
Gallik asit (GA)	2,17	2,67	3,48
Rutin (RT)	0,33	2,63	1,15
p-Kumarik asit (p-CA)	0,54	0,43	-
Vanilik Asit (VA)	0,06	1,11	-
Ferulik Asit (FA)	1,65	0,97	2,16
Kaempferol (KA)	0,72	1,20	-
α -Tokoferol (TOC)	0,75	0,71	1,02
Glutatyon (GSH)	0,85	0,49	1,51
Sistein (CYS)	1,64	0,44	1,28
Sisteamin(CYS-NH ₂)	8,01	0,48	-
N-Asetilsistein (NAC)	5,28	0,39	-

4.2. Sentetik Antioksidan Karışımların Hazırlanması Ve Geliştirilen Yönteme Uygulanarak Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) Değerlerinin Bulunması

4.2.1: İkili Sentetik Antioksidan Karışımları

Tablo 4.21 de verildiği konsantrasyonlarda hazırlanan antioksidan çözeltilerden farklı hacimlerde alınarak farklı kombinasyonlarda hazırlanan ikili sentetik karışımların geliştirilen yönteme uygulanarak teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri bulunmuş ve % hataları hesaplanmıştır.

Tablo 4.21: İkili sentetik antioksidan karışımlarının teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri.

İkili Antioksidan Sentetik Karışımlar	Beklenen Kapasite Değerleri (M TR)	Bulunan Kapasite Değerleri (M TR)	% Hata
1x10 ⁻⁴ M Askorbik Asit 1x10 ⁻⁴ M Gallik asit	1,49x10 ⁻⁵	1,51x10 ⁻⁵	1,34
1x10 ⁻⁴ M Askorbik Asit 5x10 ⁻⁵ M Quarsetin	8,83x10 ⁻⁶	8,5x10 ⁻⁶	-3,74
1x10 ⁻⁴ M Glutatyon 1x10 ⁻⁴ M Gallik Asit	1,83x10 ⁻⁵	1,86x10 ⁻⁵	1,64
5x10 ⁻⁵ M Ferulik Asit 5x10 ⁻⁵ M Sistein	1,05x10 ⁻⁵	1,02x10 ⁻⁵	-2,85
5x10 ⁻⁵ M Quarsetin 4x10 ⁻⁵ M Kafeik Asit	1,38x10 ⁻⁵	1,28x10 ⁻⁵	-7,2

4.2.2. Üçlü Sentetik Antioksidan Karışımları

Tablo 4.22 de verildiği konsantrasyonlarda hazırlanan antioksidan çözeltilerden farklı hacimlerde alınarak farklı kombinasyonlarda hazırlanan üçlü sentetik karışımların geliştirilen yöntemle uygulanarak teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri bulunmuş ve % hataları hesaplanmıştır.

Tablo 4.22: Üçlü sentetik antioksidan karışımlarının teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri.

İkili Antioksidan Sentetik Karışımlar	Beklenen Kapasite Değerleri (M TR)	Bulunan Kapasite Değerleri (M TR)	% Hata
5x10 ⁻⁵ M Ferulik Asit 5x10 ⁻⁵ M Sistein 1x10 ⁻⁴ M Askorbik Asit	1,18x10 ⁻⁵	1,22x10 ⁻⁵	3,39
1x10 ⁻⁴ M Gallik Asit 5x10 ⁻⁵ M Sistein 1x10 ⁻⁴ M Tokoferol	1,03x10 ⁻⁵	1,04x10 ⁻⁵	0,97
1x10 ⁻⁴ M Askorbik Asit 1x10 ⁻⁴ M Tokoferol 5x10 ⁻⁵ M Ferulik Asit	1,31x10 ⁻⁵	1,30x10 ⁻⁵	-0,97
5x10 ⁻⁵ M Ferulik Asit 5x10 ⁻⁵ M Quarsetin 1,5x10 ⁻⁴ M Kamferol	1,6110 ⁻⁵	1,59x10 ⁻⁵	-1,24
1x10 ⁻⁴ M Askorbik Asit 1x10 ⁻⁴ M Tokoferol 4x10 ⁻⁵ M Kafeik Asit	1,28x10 ⁻⁵	1,31x10 ⁻⁵	2,34

4.3. Standart Katkı Yöntemi ile İçecek Ve Bitki Ekstraktının Geliştirilen Yönteme Uygulanması

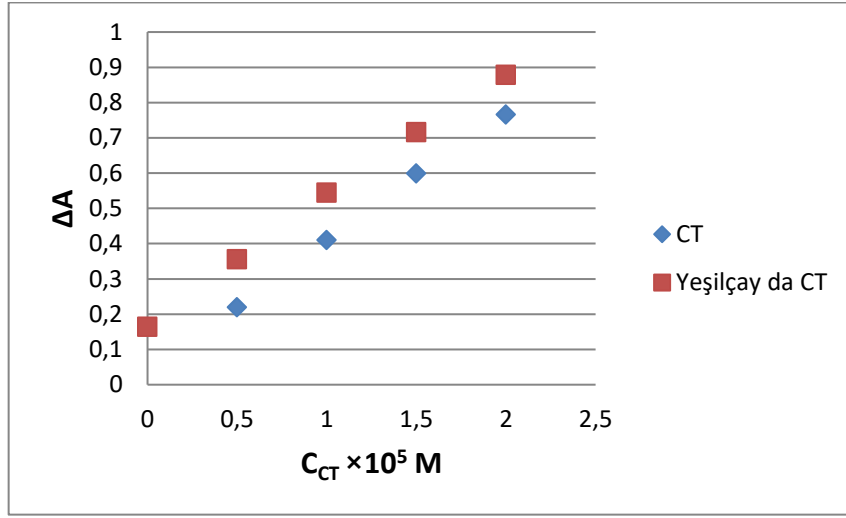
4.3.1. Yeşil Çay (*Camellia sinensis*) Ekstraktına Kateşin ve Troloks Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

4.3.1.1. Kateşin Bileşiğinin Standart Katkısı

1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktından 0,1 mL örnek alınarak gelişen yönteme uygulandığında absorbansta meydana gelen azalma (ΔA) 0,164 olarak ölçülmüştür. Ardında 0,1 mL örnek çözeltisi üzerine başlangıç konsantrasyonu 5×10^{-6} M olan kateşin bileşiğinin çözeltisinden farklı hacimde eklenerek standart katma yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışma doğruları birbirleriyle paralellik göstermişlerdir. Bu da herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir.

Tablo 4.23: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktına Kateşin bileşiğinin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbanсында meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.

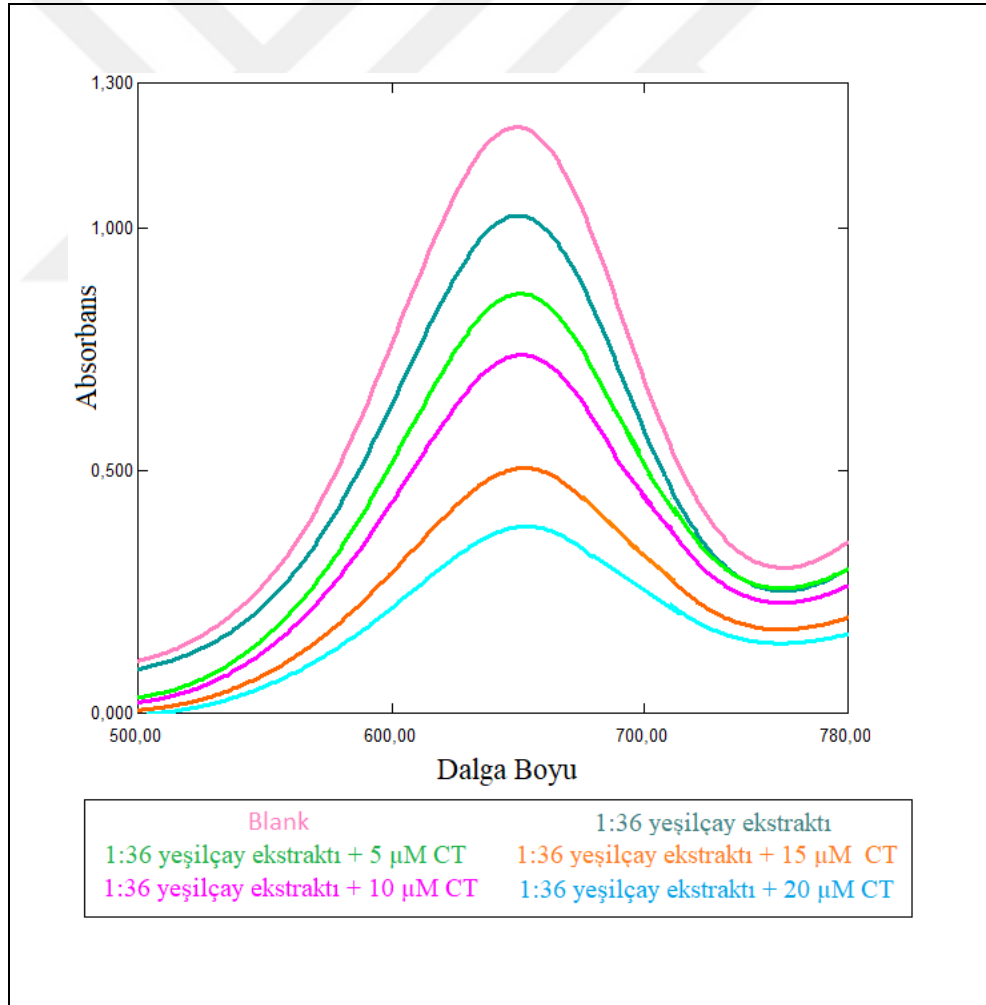
Örnek Miktarı (mL) + Eklenen CT derişimi	ΔA
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı	0,164
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 5 μ M Kateşin	0,356
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 10 μ M Kateşin	0,545
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 15 μ M Kateşin	0,716
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 20 μ M Kateşin	0,879



Kateşin bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,63 \times 10^4 C_{CT} + 0,0442$

Yeşilçay içerisindeki Kateşin bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,58 \times 10^4 C_{CT} + 0,174$

Şekil 4.19: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktındaki Kateşin bileşiminin kalibrasyon grafiği.



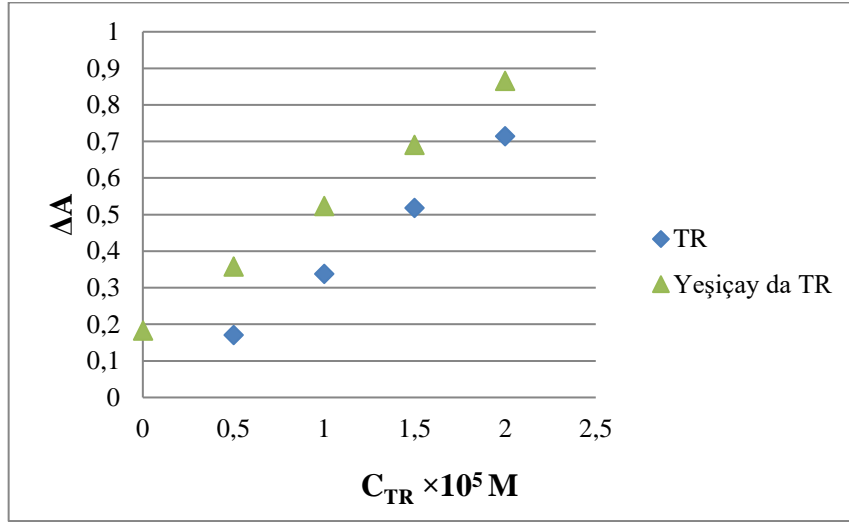
Şekil 4.20: 1:36 yeşilçay içerisindeki Kateşin bileşimi standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$).

4.3.1.2. Trolox Bileşiminin Standart Katkısı

1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktından 0,1 mL örnek alınarak gelişen yönteme uygulandığında absorbansta meydana gelen azalma (ΔA) 0,183 olarak ölçülmüştür. Ardında 0,1 mL örnek çözeltisi üzerine başlangıç konsantrasyonu 5×10^{-6} M olan trolox bileşiminin çözeltisinden farklı hacimde eklenerek standart katma yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışma doğruları birbirleriyle paralellik göstermişlerdir. Bu da herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir.

Tablo 4.24: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktına Trolox bileşiminin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbanında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.

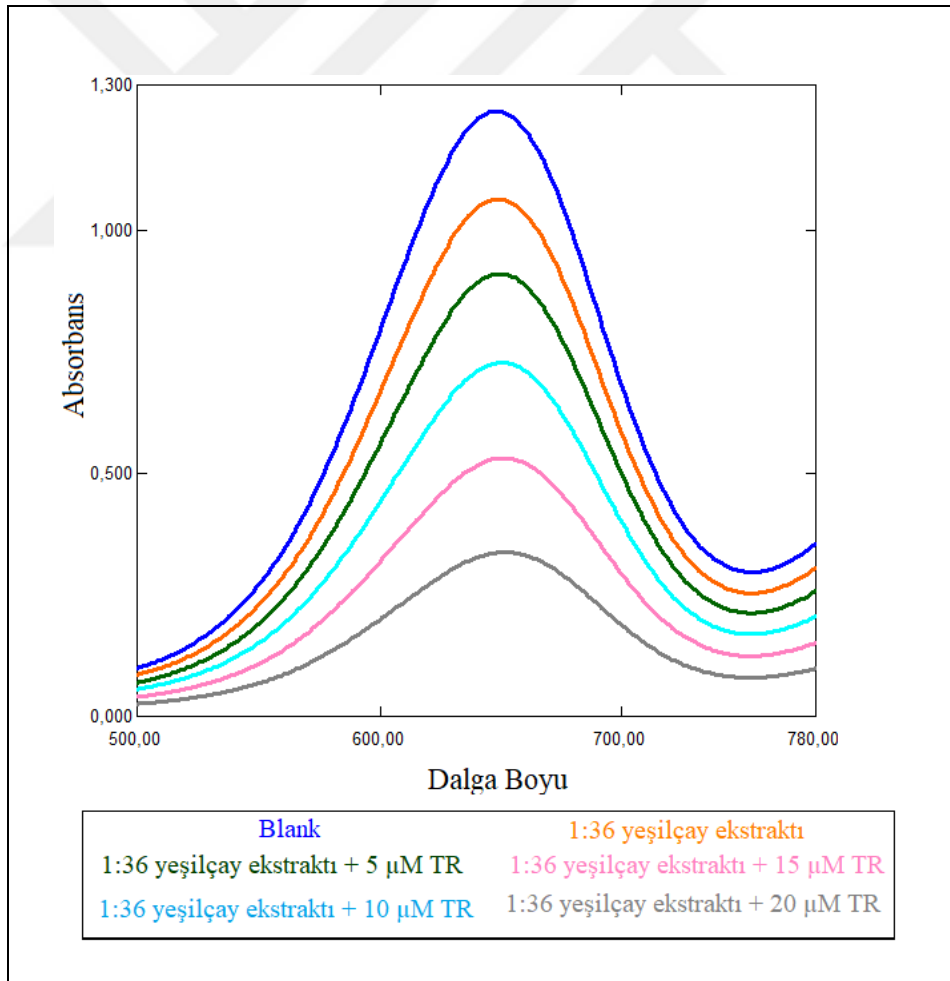
Örnek Miktarı (mL) + Eklenen TR konsantrasyonu	ΔA
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı	0,183
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 5 μ M Trolox	0,358
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 10 μ M Trolox	0,523
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 15 μ M Trolox	0,691
0,1 mL 1:36 yeşilçay ekstraktı + 20 μ M Trolox	0,866



Trolox bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,7 \times 10^4 C_{TR} - 0,0252$

Yeşilçay içerisindeki Trolox bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,4 \times 10^4 C_{TR} + 0,184$

Şekil 4.21: 1:36 oranında seyreltilmiş yeşilçay ekstraktındaki Trolox bileşiminin kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.22: 1:36 yeşilçay içerisindeki Trolox bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$).

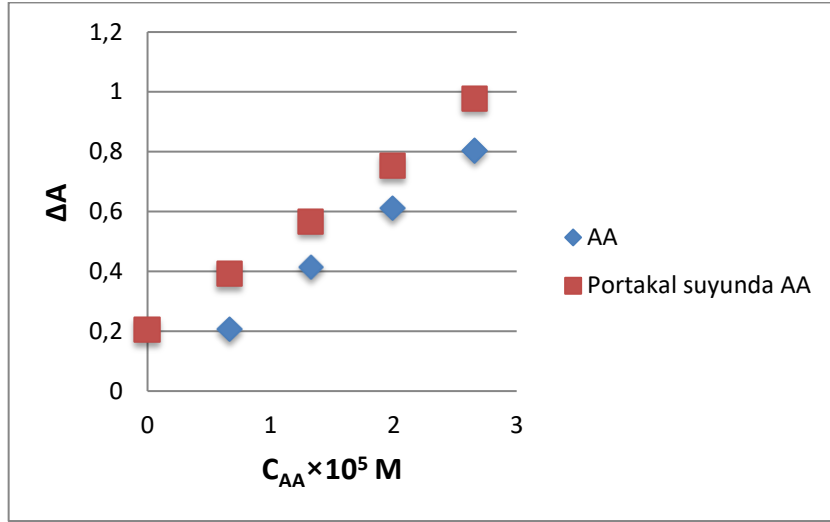
4.3.2. Portakal Suyuna Askorbik Asit ve Troloks Standart Katkı Yönteminin Uygulanması

4.3.2.1. Askorbik Asit Bileşiminin Standart Katkısı:

1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyundan 0,2 mL örnek alınarak gelişen yönteme uygulandığında absorbansta meydana gelen azalma (ΔA) 0,204 olarak ölçülmüştür. Ardında 0,2 mL örnek çözeltisi üzerine başlangıç konsantrasyonu $6,67 \times 10^{-6}$ M olan askorbik asit bileşiminin çözeltisinden farklı hacimde eklenerek standart katma yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışma doğruları birbirleriyle paralellik göstermişlerdir. Bu da herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir.

Tablo 4.25: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyuna Askorbik asit bileşiminin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbanlarında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.

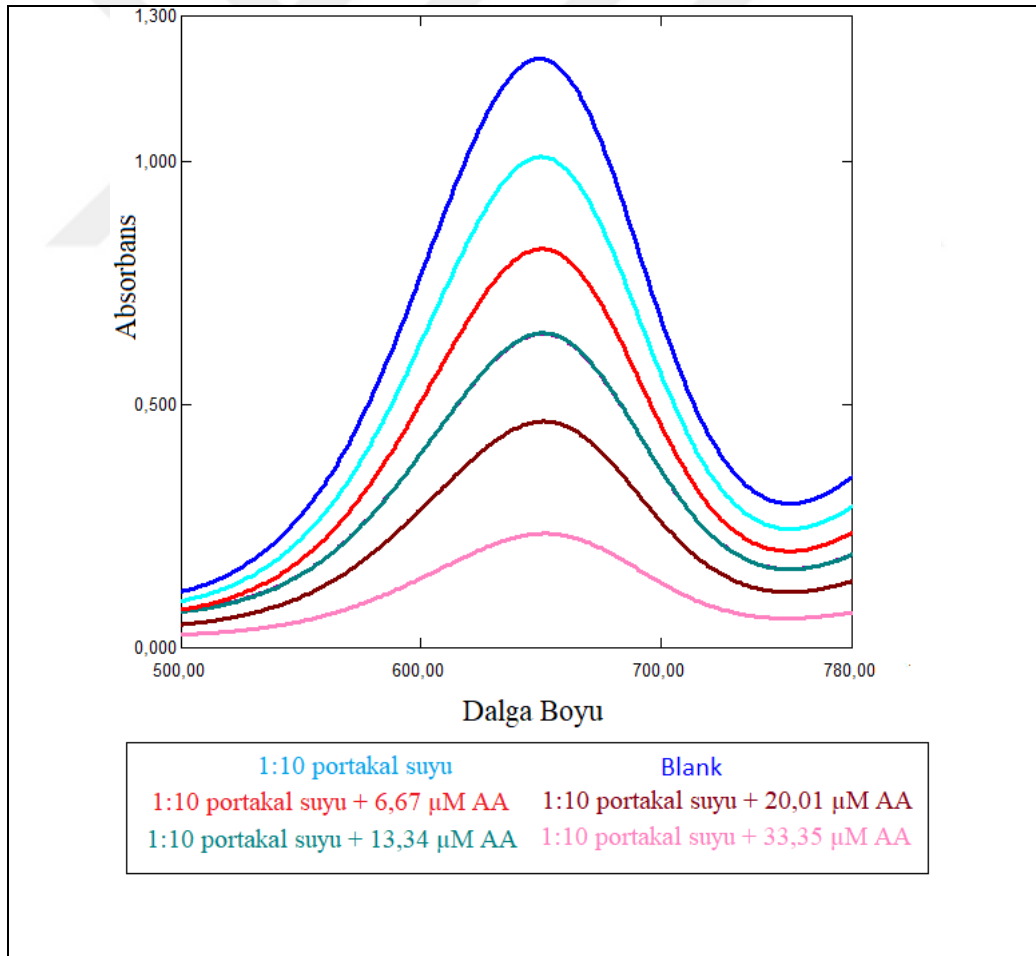
Örnek Miktarı (mL) + Eklenen AA konsantrasyonu	ΔA
0,2 mL 1:10 portakal suyu	0,204
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 6,67 μ M Askorbik Asit	0,391
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 13,34 μ M Askorbik Asit	0,566
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 20,01 μ M Askorbik Asit	0,752
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 33,35 μ M Askorbik Asit	0,977



Askorbik asit bileşiğinin doğru denklemi: $\Delta A = 3,01 \times 10^4 C_{AA} + 0,0072$

Portakal suyu içerisindeki Askorbik asit doğru denklemi: $\Delta A = 2,86 \times 10^4 C_{AA} + 0,196$

Şekil 4.23: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyunda Askorbik asit bileşiğinin kalibrasyon grafiği.



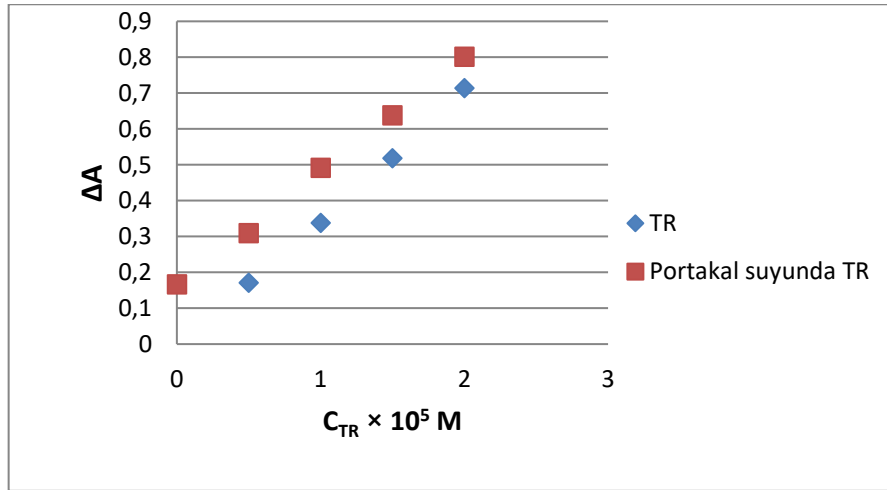
Şekil 4.24: 1:10 portakal suyu içerisindeki Askorbik asit bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$).

4.3.2.2. Trolox Bileşiminin Standart Katkısı:

1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyundan 0,2 mL örnek alınarak gelişen yõteme uygulandığında absorbansta meydana gelen azalma (ΔA) 0,164 olarak ölçülmüştür. Ardında 0,1 mL örnek çözeltilisi üzerine başlangıç konsantrasyonu 5×10^{-6} M olan trolox bileşiminin çözeltilisinden farklı hacimde eklenerek standart katma yötemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışma doğruları birbirleriyle paralellik göstermişlerdir. Bu da herhangi bir etkileşimin olmadığını göstermiştir.

Tablo 4.26: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyuna Trolox bileşiminin farklı konsantrasyonlarda standart katmaları ve absorbanında meydana gelen azalma (ΔA) değerleri.

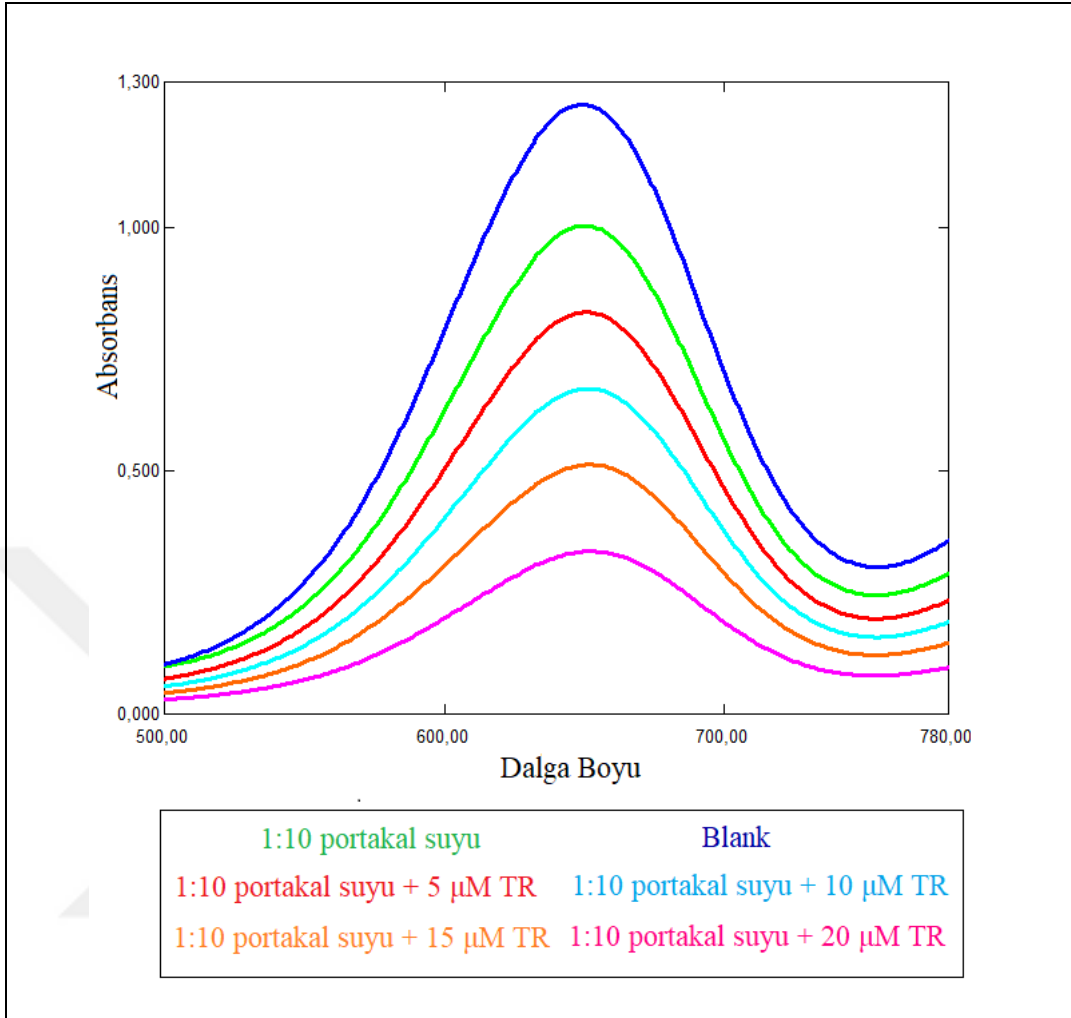
Örnek Miktarı (mL) + Eklenen TR konsantrasyonu	ΔA
0,2 mL 1:10 portakal suyu	0,166
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 5 μ M Trolox	0,309
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 10 μ M Trolox	0,491
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 15 μ M Trolox	0,638
0,2 mL 1:10 portakal suyu + 20 μ M Trolox	0,801



Trolox bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,7 \times 10^4 C_{TR} - 0,0252$

Yeşilçay içerisindeki Trolox bileşiminin doğru denklemi: $\Delta A = 3,2 \times 10^4 C_{TR} + 0,161$

Şekil 4.25: 1:10 oranında seyreltilmiş portakal suyunda Askorbik asit bileşiminin kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.26: 10 portakal suyu içerisindeki Trolox bileşiği standart katkısının görünür alandaki spektrumları ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$).

Standart katkı yöntemi sonucu yeşil çay (*Camellia sinensis*) ve portakal suyunun Trolox eşdeğeri antioksidan kapasiteleri Tablo 4.28 verilmiştir.

Tablo 4.27: Yeşil çay (*Camellia sinensis*) ve portakal suyunun Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite

Örnek	TAC
Yeşil Çay (<i>Camellia sinensis</i>)	0,58 mmol Tr/g
Portakal suyu	0,93 mM Tr

4.4. Bazı Standart Antioksidan Bileşiklerde İnterferan Etkisinin İncelenmesi

Kuarsetin, Askorbik asit ve Ferulik asit varlığında benzoik asit, sitrik asit, glukoz ve mannitol maddelerinin olduğu çözeltiler hazırlanılarak geliştirilen yöntemde interferan etkileri incelenmiş ve % hataları hesaplanarak değerler Tablo 4.28’de verilmiştir.

Tablo 4.28: Geliştirilen yönteme interferan maddelerin etkisi ve % hata.

Antioksidan	İnterferan Madde	(interferant/Analit) ^{a,b,c} Molar Oranı	% Hata
Kuarsetin	Benzoik Asit	5	-1,7
	Sitrik Asit	5	+0,98
	Glukoz	3	-2,07
	Mannitol	3	+1,66
Askorbik Asit	Benzoik Asit	5	+1,38
	Sitrik Asit	3	-3,07
	Glukoz	5	-1,39
	Mannitol	3	+2,37
Ferulik Asit	Benzoik Asit	3	-1,98
	Sitrik Asit	5	-1,56
	Glukoz	5	-2,67
	Mannitol	3	+1,97

(^aQR derişimi $3,33 \times 10^{-6}$ M, ^bAA derişimi $6,67 \times 10^{-6}$ M, ^cFRA derişimi $3,33 \times 10^{-6}$ M).

4.5. Antioksidan Bileşiklerin Etkinliği Sıralaması İçin Spearman Analizi

Spearman sıra-korelasyon katsayısı istatistiklerine göre ($p = 0,013$) geliştirilen yöntemde antioksidanların etkinliği sıralaması ile bu antioksidanların spektrofotometrik ABTS/ persülfat yöntemin de verdiği cevaba göre geliştirilen yöntemde bulunan sıra arasında monotonik olarak “güçlü” bir ilişki olduğu doğrulanmıştır (Tablo 4.29).

Tablo 4.29: Geliştirilen yöntem ile spektrofotometrik ABTS/ persülfat yönteminde elde edilen sonuçların kıyaslanmasında Spearman korelasyon katsayısının belirlenmesi.

Yöntem	Antioksidanların etkinlik sırası										rs katsayısı P= 0,013	Açıklama
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Geliştirilen Yöntem	GA	CFA	FA	CYS	QR	GSH	AA	α -TOC	CGA	RT	0,745	Güçlü
ABTS/ Persülfat	GA	QR	FA	GSH	CFA	CYS	CGA	RT	AA	α -TOC		

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksijen, insan yaşamı için olmazsa olmaz bir öneme sahiptir, fakat normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri çoğu işlevlerinde yararlı olurken oksidatif stres koşullarında vücuda ciddi bir zarar oluşturma potansiyeline sahiptir. Çevre kirliliği, radyasyon, kontamine sular, pestisitler ve canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi birçok etmen kaçınılmaz olarak serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (Diplock, 1998). Hücrel yıpranma ve yaşlanma yanında kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerini (RNS) yadsınamaz bir rolü olduğu kanıtlanmıştır. Günümüzde bu reaktif türlerin inaktif hale getirilmesinde en çok kullanılan fonksiyonel gıda bileşenlerinden birisi antioksidanlardır. Antioksidan terimi dünya literatüründe farklı şekillerde tanımlanmıştır. Tez çalışması kapsamında, antioksidanlar oksidatif hasara uğratılan substrat ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunsa da oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddeler olarak tanımlanabilir (Young, 2001). Çoğu araştırmacıya göre antioksidanlarca zengin bir beslenme alışkanlığı, başta kanser, kalp-damar rahatsızlıkları ve katarakt gibi göz hastalıklarının önlenmesi açısından son derece önemlidir. Bu antioksidan bileşiklerinin tanımlanması, sınıflandırılması ve tayin edilebilmesi için; bilim dünyasında kabul gören, basit, hızlı, ucuz ve hassas yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

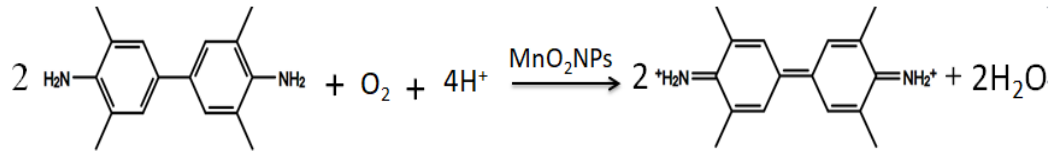
Literatürde mangan dioksit nanopartikül (MnO_2 NPs) temelli antioksidan aktivite çalışmaları mevcuttur ve bunlardan biri olan Chen ve diğ. çalışmasında herhangi bir kromofor reaktif kullanılmadan MnO_2 : mangan dioksit nanolevhaların kendi renginden yola çıkarak askorbik asidin (AA) belirlenmesinde bir kolorimetrik yöntem geliştirmiştir. Bu yöntemde askorbik asitin belirtme sınırı (LOD) 98 nM olarak verilmiştir, ancak mangan dioksit nanolevhaların kendi renginden yararlanılarak bu kadar düşük konsantrasyonlara inmesi mümkün değildir. Ayrıca yöntemlerde absorban ölçümleri 370 nm civarında yapılmış ve bu bölgede yöntemler girişim etkisine açık olup çoğu girişim yapıcı iyonların etkileri araştırılmamıştır. Yöntemde bir diğer eksiklik ise başka antioksidan bileşikleri için analitik bulguya yer verilmemesidir.

Yine aynı şekilde Zhang ve diğ., benzer bir çalışma ile Mn_3O_4 nano-oktaedr kristalleri ve TMB varlığında tannik asit ve fenollerin belirlenmesinde bir kolorimetrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde Mn_3O_4 nano-oktahedron'un yüzeyinde absorblanan oksijen ile reaktif oksijen türlerinin (hidroksil radikalleri ve süper oksit anyon radikali) oluştuğunu öngörmüşlerdir. Yöntemde reaktif türlerin varlığından dolayı hem TMB ile Mn_3O_4 nano-oktahedron arasında hem de yükseltgenmiş TMB katyonu ile tannik asit arasında yarışmalı bir reaksiyon söz konusu olacaktır. Bu da yöntemin tekrarlanabilirliği açısından dezavantajdır. Ayrıca yöntemde fenolik bileşiklere dair herhangi bir analitik bulguya rastlanmamıştır.

Kısaca özetlenen bu çalışmalardan yola çıkılarak absorpsiyon azalışına dayalı turn-off bir sensör geliştirilmesi amaçlanmış ve antioksidan aktivite ölçümü için hızlı, maliyeti düşük ve kolay uygulanabilir mangan dioksit nanopartikül temelli bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

Tez kapsamında, sentezlenen mangan dioksit nanopartikülleri ile ortama eklenen eklenen kromofor bir reaktif olan 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin'in (TMB) sitrik asit – monohidrojen fosfat tamponu (pH 4) varlığında TMB reaktifinin yükseltgenmesi ile ortaya çıkan TMB katyonunun mavi rengi ($\lambda_{max} = 650 \text{ nm}$) gözlenmiştir.

Mangan dioksit nanopartiküllerin TMB ile olası reaksiyonu literatüre dayanarak (Liu ve diğ. 2012) şu şekilde gösterilebilir:



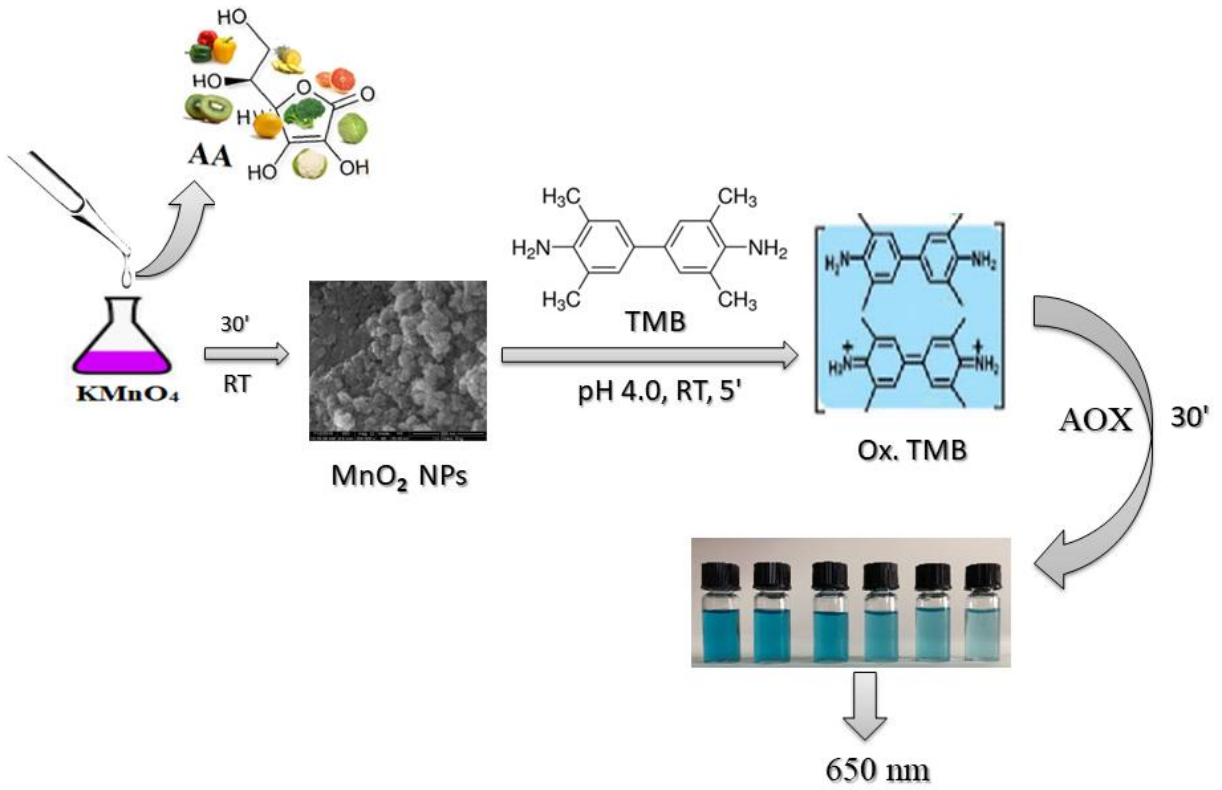
Sentezlenen mangan dioksit nanopartiküllerin TMB substratı varlığında ortamda H_2O_2 olmaksızın peroksidaz ve oksidaz benzeri aktivite sergiledikleri kanıtlanmıştır (bkz. Şekil 4.11). Elde edilen sonuçlar, ortamda H_2O_2 olmaksızın 5 dakika içinde TMB'in mavi renginin oluşması sonucu (maksimum absorpsiyon 650 nm), mangan dioksit nanopartiküllerin TMB oksidasyonunu hızlı bir şekilde katalizleyebileceğini göstermiştir. Nanometre boyutundaki

MnO₂ NP'lerin katalitik etkisinin MnO₂ tozuna göre yaklaşık 3 kat artmıştır. Bu durum daha küçük boyutun katalitik etkisinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin prensibi, sentezlenmiş mangan dioksit nanopartiküller, O₂ ve TMB arasında meydana gelen redoks tepkimesi sonucu oluşan TMB kationunun mavi renginden (nano prob) yararlanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidanların aktivite ölçümünü yapmaktır.

Mangandioksit nanopartikül temelli antioksidan aktivite sensörünün geliştirilmesi aşamasında minimum süre, pratiklik ve sensör kararlılığı ön planda tutularak optimal koşullar belirlenmiştir. İlk olarak Yu-Ting Wang ve diğ'nin yapmış olduğu ve indirgen olarak askorbik asitin kullanıldığı mangan dioksit nanopartiküllerin sentez yöntemi kolay, ucuz, kararlı, nano boyutlu (bkz. Şekil 4.10) ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği için bu yöntemin mangan dioksit nanopartikül sentezi için ideal olduğuna karar verilmiştir. Mangan dioksit nanopartiküllerin sentez yönteminin seçilmesinden sonra yöntemin optimum şartlarda kılınmasında bir diğer etken mangan dioksit nanopartiküller ile TMB arasındaki redoks reaksiyonunda uygun ortam pH'sına karar verilmesidir. Literatürde TMB reaktifinin genellikle etkin olduğu pH ortamı asetik asit-sodyum asetat tamponu ile değişen konsantrasyonlarda ve pH değerlerinde (3-5) sağlanmıştır (Liu ve diğ. 2002; Gonzalez-Fuenzalida ve diğ. 2013). Fakat yine de yöntemin optimizasyonu aşamasında farklı tampon çözeltiler ile değişen pH ortamında çalışılmıştır. Yöntemin optimizasyon aşamasında asetik asit - sodyum asetat, sitrik asit - sodyum sitrat ve sitrik asit - sodyum monohidrojen fosfat tampon çözeltileriyle çalışılmıştır. Asetik asit-sodyum asetat ve sitrik asit - sodyum sitrat tampon çözeltileriyle çalışıldığında mangan dioksit nanopartiküller ile TMB arasındaki reaksiyonun dengeye gelme süresi 30 dakika sürmüştür. Ancak sitrik asit-sodyum monohidrojen fosfat tampon çözeltisiyle çalışıldığında reaksiyonun dengeye gelmesi 5 dakika sürmüştür (bkz. Şekil 4.3). Reaksiyonun hızlı bir şekilde dengeye gelmesi nedeniyle ideal tampon çözeltinin pH 4 sitrik asit- sodyum monohidrojen fosfat tamponu olduğuna karar verilmiştir.

Tüm optimizasyon (reaktif konsantrasyonu, pH, ortam sıcaklığı, reaksiyon süresi v.b.) işlemlerinin ardından geliştirilen yöntemin prensibi şu şekilde şematize edilebilir.



Şekil 5.1: Ox. TMB'nin antioksidan bileşikler varlığındaki renk açılımı esasına göre antioksidan bileşiklerin aktivite ölçümü için geliştirilen yöntemin şematik gösterimi.

Geliştirilen yöntemde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun $7,5 \times 10^{-5} \text{M}$ standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak yöntem uygulanmıştır. Denemeler sonucunda Şekil 4.12'deki spektrumda görüldüğü gibi maksimum absorpsiyon elde edilen dalgaboyu 650 nm olarak belirlenmiştir. Troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve doğru denklemi $A=3.70 \times 10^4 C_{\text{TR}} + 0.0252$ şeklinde elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin bu yöntemdeki molar absorplama katsayısını (ϵ) vermektedir. Troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı $3,7 \times 10^4 \text{Lmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. TR bileşiğinin geliştirilen yöntemde elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,57 ve 13,8 nM'dır.

Kalibrasyon doğrusunun elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) hesaplanmıştır (bkz. Tablo 4,20). Elde edilen sonuçlarla neticesinde antioksidan bileşikler için % RSD değerleri 0,585 ile 5,66 arasında bulunmuştur.

Geliştirilen mangan dioksit nanopartikül esaslı spektrofotometrik yöntemde troloks dahil toplam 17 antioksidan bileşiğin molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru

denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4,18 ve 4,19’da standart antioksidan bileşiklerin lineer doğru denklemleri ($A = mc + n$), korelasyon katsayıları (r), lineer konsantrasyon aralıkları, LOD ve LOQ degerleri özetlenmiştir.

Geliştirilen yöntem antioksidan bileşiklere uygulandıktan sonra her bir antioksidan bileşiği için TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) değerleri hesaplanmış ve değerler Tablo 4.20’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde çalışılan antioksidanlar için TEAC sıralaması; gallik asit > kafeik asit > ferulik asit > sistein > kuarsetin > glutatyon > askorbik asit > α -Tokoferol > klorojenik asit > rutin şeklinde bulunmuştur (bkz. Tablo 4.20) . Ek olarak, geliştirilen yöntemle elde edilen TEAC değerleri, aynı antioksidanlar için spektrofotometrik orijinal CUPRAC ve ABTS/ persülfat değerleri ile karşılaştırılmıştır. Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin (GSH, CYS, CYS-NH₂ ve NAC) geliştirilen yöntem ile bulunan TEAC değerleri orijinal CUPRAC bulgularına kıyasla daha yüksek olduğu için Spearman korelasyon katsayıları ABTS/ persülfat yöntemine göre hesaplanılmıştır. CUPRAC yönteminde bütün tiyoller disülfürlere yükseltgenerek 1 elektron transfer ederken ABTS yönteminde ise oksidasyon daha ileri gitmektedir. Geliştirilen sensör ile ABTS/ persülfat yöntemi kıyaslandığında 0.745’lik bir Spearman korelasyon katsayısı elde edildi. Böylece karşılaştırılan yöntemler arasında güçlü bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (bkz. Tablo 4.29). Geliştirilen yöntemde tiyol grubu antioksidan bileşiklerin TEAC değerlerinin yüksek olmasının nedeni tiyol grubu antioksidanların (GSH, CYS, CYS-NH₂ ve NAC) olası oksidasyon ürünleri olan sülfirik (-SO₂H) veya sülfonik (-SO₃H) asitlere dönüşmeleriyle açıklanabilir (Apak ve diğ. 2005).

Çalışılan antioksidan bileşiklerinden bazıları ikili ve üçlü sentetik karışımlar elde etmek için kullanılmıştır. Bu bileşiklerin sentetik çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda çeşitli karışımlar oluşturulmuştur. Hazırlanan sentetik karışımlara geliştirilen yöntem uygulandığında teorik olarak beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite değerlerinin (mM TR) birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve ikili karışımlar için hata değerlerinin % -7,2 ile 1,64 arasında, üçlü sentetik karışımlar için ise % -1,24 ile 3,39 arasında olduğu görülmüştür (bkz. Tablo 4.22 ve 4.23).

Standart katkı metoduyla yeşil çay ekstraktına ve portakal suyuna troloks, askorbik asit ve kateşin katkıları yapılarak gerçek örneklerde yöntemle bir girişim etkisinin olup olmadığı incelenmiştir. Saf antioksidan bileşiklerle gerçek matris karışımlarına ilavesiyle elde edilen kalibrasyon eğrileri lineer olup birbirlerine paraleldir (bkz. Şekil 4.32 ve 4.38). Yani bir gerçek matris çözeltisi bileşenleri, seçilen saf antioksidanlarla kimyasal olarak bir etkileşime girmemiştir. Bu nedenle geliştirilen mangan dioksit nanopartikül temelli spektrofotometrik yöntem hem sentetik karışımların hem de gerçek karışımların antioksidan aktivite ölçümünde etkili bir yöntemdir.

Nanoparçacık esaslı antioksidan aktivite tayininde kuersetin, askorbik asit ve ferulik asit varlığında benzoik asit, sitrik asit, glukoz ve mannitol maddelerinin interferan etkisi incelenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.28 'de özetlenmiştir. % Hata değerleri -3,07 ile +2,37 arasında değişmektedir.

Geliştirilen yöntemde ortamda bulunabilecek reaktif oksijen türlerinden $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerin varlığı araştırılmıştır (Bekdeşer ve diğ. 2011; Bayarsaikhan ve diğ. 2018).Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda ortamda $\cdot\text{OH}$ ve $\text{O}_2\cdot^-$ radikallerine rastlanılmamıştır (bkz. Şekil 4.13 ve 4.14). Bir diğer deyişle burada etkin olan antioksidan maddeler, nano- MnO_2 yüzeyinde oluşan hidroksil veya süperoksit anyon radikallerini süpürerek değil, nano- MnO_2 katalizliğinde TMB'nin hava oksijeni ile oksidasyonunu engelleyerek işlev görmektedir. Geliştirilen antioksidan aktivite tayin yöntemi bu sisteme özgü olup özgün değerdedir.

Nanopartikül temelli geliştirilen yöntemler genel olarak kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük yöntemler olarak bilinmektedir. Bu yöntem sayesinde lipofilik, hidrofilik ve tiyollü saf antioksidan bileşikler için nanoparçacık bazlı yeni bir antioksidan aktivite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar, toplumun gıda tüketimi ve beslenme konusunda bilgilendirilmesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valero, J.R., 2011, Extraction and analysis of polyphenols: recent trends, *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 227-249.

Alarcon-Angeles, G., Álvarez-Romero, G.A., Merkoçi, A., 2016, Emerging nanomaterials for analytical detection, *Compr. Anal. Chem.*, 74, 195–246.

Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., Trinajstić, N., 2007, SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids, *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845.

Andersen, O.M. and Markham, K.R., 2005, *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, In: Valant-Vetschera, K.M., Wallenweber, E.(ed.), CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, ISBN: 9781420039443, 618-748.

Anderson, O.M., Jordheim, M., 2006, The anthocyanins In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, In: Anderson, O.M., Markham, K.R. (ed.), CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 472–551

Apak, R., Çapanoğlu, E., Arda, A.Ü., 2015, Nanotechnological Methods of Antioxidant Characterization, *The Chemical Sensory Informatics of Food: Measurement, Analysis, Integration*, In: Guthrie, B., Beauchamp, J., Buettner, A., Lavine, BK, (ed.), American Chemical Society: Washington, DC, USA, ISBN 9780841230699, 209-234.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Altun, M., 2005, Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper(II)-Neocuproine As Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method. *Free Radical Research*. 39, 949-961.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016, 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.

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016, Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(5), 1046-1070.

Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van Bladeren, P.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M., 2002, The regioselectivity of glutathione adduct formation with flavonoid quinone/quinone methides is pH-dependent, *Chemical research in toxicology*, 15(3), 343-351.

Bayarsaikhan, G., Dondurmacioğlu, F., Avan, A.N., Cekiç, S.D., Apak, R., 2018, Novel Colorimetric Assay of 2, 3-Dihydroxybenzoate among Other Isomers as a Selective Indicator of Hydroxyl Radical Damage and Related Antioxidant Activity, *Analytical Letters*, 51(1-2), 236-253.

Bayrakçeken, F., Aktaş, S., Toptan, M., Ünlügedik, A., 2003, High resolution electronic absorption spectra of anisole and phenoxy radical, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(1),135-138.

Bekdeşer, B., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, tert-Butylhydroquinone as a spectroscopic probe for the superoxide radical scavenging activity assay of biological samples, *Analytical chemistry*, 83(14), 5652-5660.

Bener, M., Şen, F.B., Apak, R., 2018, Heparin-stabilized gold nanoparticles-based CUPRAC colorimetric sensor for antioxidant capacity measurement, *Talanta*, 187, 148-155.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Blekas, G., Tsimidou, M., Boskou, D., 1995, Contribution of α -tocopherol to olive oil stability, *Food Chemistry*, 52(3), 289-294.

Borek, C., 1993, Molecular mechanisms in cancer induction and prevention, *Environmental health perspectives*, 101(3), 237-245.

Bors, W., Michel, C., Saran, M., 1984, Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 796(3), 312-319.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Britton, G., 2004, *Carotenoids: handbook*, Birkhäuser, Boston, ISBN:3764361808.

Brown, E.J., Khodr, H., Hider, C.R., Rice-Evans, C.A., 1998, Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal*, 330(3), 1173-1178.

Burda, S., Oleszek, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.

Cao, G., Sofic, E. and Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), pp.749-760.

Carmen, S., 2007, *Food Pigments: Major sources and stability during storage and processing food colorants*, Chemical and functional properties of food components, In: Socaciu, C.(ed), Section 4, Taylor and Francis Group, LLC, Romania, ISBN: 13: 978-0-8493-9357-0, 245-274.

Chandrasekaran, A., Idelchik, M. D. P. S., Melendez, J. A., 2017, Redox control of senescence and age-related disease, *Redox biology*, 11, 91-102.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004, Diversity of structures and properties among catalases, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208

- Chen, C.D., Cheng, S.F., Chau, L.K., Wang, C.C., 2007, Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 926-932.
- Chen, C.D., Cheng, S.F., Chau, L.K., Wang, C.C., 2007, Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(6), 926-932.
- Chen, P., Zhong, H., Wang, X., Shao, C., Zhi, S., Li, X.R., Wei, C., 2019, A label-free colorimetric strategy for facile and low-cost sensing of ascorbic acid using MnO₂ nanosheets, *Analytical Methods*, 11(11), 1469-1474.
- Cheng, I.F., Breen, K., 2000, On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex, *Biometals*, 13(1), 77-83.
- Cheyrier, V., 2005, Polyphenols in foods are more complex than often thought, *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 223S-229S.
- Cholbi, M.R., Paya, M., Alcaraz, M.J., 1991, Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation, *Experientia*, 47(2), 195-199.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., 1998, Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers, *Journal of natural products*, 61(1), 71-76.
- Cotgreave, I.A., 1997, N-Acetylcysteine: Pharmacological Considerations and Experimental and Clinical Applications. *Advances in Pharmacology*. 38, 205-227.
- Croft, K.D., 1998, The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids a, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 435-442.
- Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Cornacchiari, A., Ferrari, R., Albertini, A., 1987, Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress, *Clinical chemistry*, 33(8), 1448-1449.
- Del Carlo, M., Compagnone, D., 2008, Recent advances in biosensor technology for food safety, *Agro Food Ind. Hi-Tech*, 19, 32–35.
- Di Ottavio, F., Della Pelle, F., Montesano, C., Scarpone, R., Escarpa, A., Compagnone, D., Sergi, M., 2017, Determination of pesticides in wheat flour using microextraction on packed sorbent coupled to ultra-high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry, *Food analytical methods*, 10(6), 1699-1708.
- Diplock, A.T., Charuleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J., 1998, Functional food science and defence against reactive oxidative species, *British Journal of Nutrition*, 80(1), 77-112.
- Dobes, J., Sochor, J., Babula, P., Kynicky, J., Hubalek, J., Klejdus, B., Kizek, R., 2013, Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants. A review, *Int. J. Electrochem. Sci*, 8, 4520–4542.

Dolatabadi, J.E.N., Kashanian, S., 2010, A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives, *Food Research International*, 43(5), 1223-1230.

Dringen, R., Pawlowski, P.G., Hirrlinger, J., 2005, Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of neuroscience research*, 79(1-2), 157-165.

Durmaz, G., 2002, *Kayırsı meyvesinin ve kavrulmuş kayırsı çekirdeğinin antioksidan özellikleri*, İnönü Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Dwiecki, K., Nogala-Kałużka, M., Polewski, K., 2017, Determination of total phenolic compounds in common beverages using CdTe quantum dots, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(2), 12863.

El Amrani, F.B.A., Perelló, L., Real, J.A., González-Alvarez, M., Alzuet, G., Borrás, J., García-Granda, S., Montejo-Bernardo, J., 2006, Oxidative DNA cleavage induced by an iron (III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis (flavonolato)(methanol) iron (III) complex, *Journal of inorganic biochemistry*, 100(7), 1208-1218.

Escarpa, A., 2014, Lights and shadows on food microfluidics. *Lab on a Chip*, 14(17), 3213-3224.

Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M., 1997, Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity, *FEBS letters*, 416(2), 123-129.

Frei, B., England, L., Ames, B.N., 1989, Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6377-6381.

Frei, B., Higdon, J.V., 2003, Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies, *The Journal of nutrition*, 133(10), 3275S-3284S.

Frey, A., Meckelein, B., Externest, D., Schmidt, M.A., 2000, A stable and highly sensitive 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays, *Journal of immunological methods*, 233(1-2), 47-56.

Fridovich, I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annual review of biochemistry*, 64(1), 97-112.

Galey, J.B., 1996, Potential use of iron chelators against oxidative damage, In *Advances in pharmacology*, 38, 167-203).

Genestra, M., 2007, Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants, *Cellular signalling*, 19(9), 1807-1819.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.

Gonzalez-Fuenzalida, R.A., Moliner-Martinez, Y., Gonzalez-Bejar, M., Molins-Legua, C., Verdu-Andres, J., Perez-Prieto, J., Campins-Falco, P., 2013, In situ colorimetric

quantification of silver cations in the presence of silver nanoparticles, *Analytical chemistry*, 85 (21), 10013-10016.

Gordon, M.H., 1990, The mechanism of antioxidant action in vitro, In *Food antioxidants*, Springer, 1-18.

Góth, L., Rass, P., Páy, A., 2004, Catalase enzyme mutations and their association with diseases, *Molecular Diagnosis*, 8(3), 141-149.

Haenen, G.R., Paquay, J.B., Korthouwer, R.E., Bast, A., 1997, Peroxynitrite scavenging by flavonoids, *Biochemical and biophysical research communications*, 236(3), 591-593.

Halliwell, B., 2006, Reactive species and antioxidants, Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant physiology*, 141(2), 312-322.

Halliwell, B., 2007, Biochemistry of oxidative stress, *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-50.

Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994, The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.

Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

Hayat, A., Catanante, G., Marty, J., 2014, Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors, *Sensors*, 14(12), 23439-23461.

Helm, K.E., Tagliaferro, R., Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.

Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K., 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *Journal of nutritional science and vitaminology*, 47(5), 357-362.

Holland, V.R., Saunders, B.C., Rose, F.L., Walpole, A.L., 1974, A safer substitute for benzidine in the detection of blood, *Tetrahedron*, 30(18), 3299-3302.

Hudson, B.J.F., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier Science, USA.

Huk, I., Brovkovich, V., Nanobash Vili, J., Weigel, G., Neumayer, C., Partyka, L., Patton, S., Malinski, T., 1998, Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study, *British Journal of Surgery*, 85(8), 1080-1085.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011, A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.

Ji, D., Du, Y., Meng, H., Zhang, L., Huang, Z., Hu, Y., Li, J., Yu, F., Li, Z., 2018, A novel colorimetric strategy for sensitive and rapid sensing of ascorbic acid using cobalt

oxyhydroxide nanoflakes and 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256, 512-519.

Josephy, P.D., Eling, T., Mason, R.P., 1982, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine, Free radical and charge-transfer complex intermediates, *Journal of Biological Chemistry*, 257(7), 3669-3675.

Jovanovic, S.V., Steenken, S., Hara, Y., Simic, M.G., 1996, Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2(11), 2497-2504.

Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.Å., 1996, The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 31(7), 671-701.

Kamal-Eldin, A., Budilarto, E., 2015, Tocopherols and tocotrienols as antioxidants for food preservation, In *Handbook of antioxidants for food preservation*, Woodhead Publishing, 141-159.

Kashanian, S., Dolatabadi, J.E.N., 2009, DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive, *Food Chemistry*, 116(3), 743-747.

Kim, B.H., Cho, S.M., Reddy, A.M., Kim, Y.S., Min, K.R., Kim, Y., 2005, Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor- κ B-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7, *Biochemical pharmacology*, 69(11), 1577-1583.

Kim, K.H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W., 2006, Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chemistry*, 95(3), 466-473.

Laura, A., Alvarez-Parrilla, E. and González-Aguilar, G.A., 2010, *Chemistry, Nutritional Value and Stability*, Fruit and vegetable phytochemicals, In: Tsao, R., McCallum, J. Massachusetts. (ed.), Chapter 5, Wiley-Blackwell Publishing, USA, 131-153.

Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004, Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), pp.21-33.

Leeuwenburgh, C., Heinecke, J. W., 2001, Oxidative stress and antioxidants in exercise, *Current medicinal chemistry*, 8(7), 829-838.

Limón, J., Gonsbatt, ME., 2009, The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137-147.

Liu, S., Tian, J., Wang, L., Sun, X., 2012, Highly sensitive and selective colorimetric detection of Ag(I) ion using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as an indicator, *Sensors and actuators B: chemical*, 165 (1), 44-47.

Liu, S., Tian, J., Wang, L., Sun, X., 2012, Highly sensitive and selective colorimetric detection of Ag (I) ion using 3, 3', 5, 5',-tetramethylbenzidine (TMB) as an indicator, *Sensors and actuators B: chemical*, 165(1), 44-47.

Liu, X., Wang, Q., Zhao, H., Zhang, L., Su, Y., Lv, Y., 2012, BSA-templated MnO₂ nanoparticles as both peroxidase and oxidase mimics, *Analyst*, 137(19), 4552-4558.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2046-2056.

Makahleh, A., Saad, B., Bari, M.F., 2015, Synthetic phenolics as antioxidants for food preservation, In *Handbook of antioxidants for food preservation*, Woodhead Publishing, 51-78.

Marklund, S.L., 1984, Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species, *Biochemical Journal*, 222(3), 649-655.

McCallum, J.L., Yang, R., Young, J.C., Strommer, J.N., Tsao, R., 2007. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column, *Journal of Chromatography A*, 1148(1), 38-45.

Miller, J.N., Miller, J.C., 2010, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, sixth edition, Ashford Colour Press Ltd., Gosport, UK. ISBN: 978-0-273-73042-2, 171-172.

Miller, S.L., Schlesinger, G., 1993, Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: I. Cysteamine and 2-mercaptoethanesulfonic acid (coenzyme M), *Journal of molecular evolution*, 36(4), 302-307.

Moldeus, P., Cotgreave, I. A., Berggren, M., 1986, Lung Protection by a Thiol-Containing Antioxidant: N-Acetylcysteine. *Respiration*. 50, 31-42.

Morón, Ú.M., Castilla-Cortázar, I., 2012, Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions”, In *Antioxidant Enzyme*, IntechOpen.

Motilva, M.J., Serra, A., Macià, A., 2013, Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: an overview, *Journal of Chromatography A*, 1292, 66-82.

Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2002, The function of tocopherols and tocotrienols in plants, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31-57

Namiki, M., 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29 (4), 273-300.

- Nanditha, B., Prabhasankar, P., 2008, Antioxidants in bakery products: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1-27
- Nanditha, B., Prabhasankar, P., 2008, Antioxidants in bakery products: a review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 1-27.
- Nath, K.A., Salahudeen, A.K., 1993, Autoxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264(2), 306-314.
- Nijveldt, R.J., Van Nood, E.L.S., Van Hoorn, D.E., Boelens, P.G., Van Norren, K., Van Leeuwen, P.A., 2001, Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.
- Nimni, M.E., Han, B., Cordoba, F., 2007, Are we getting enough sulfur in our diet?, *Nutrition & Metabolism*, 4(1), 24.
- Oskam, G., 2006, Metal oxide nanoparticles: synthesis, characterization and application, *Journal of sol-gel science and technology*, 37(3), 161-164.
- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., Apak, R., 2012. Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols. *Analytical chemistry*, 84(18), pp.8052-8059.
- Pektaş, İ., 2009, *Bitki Gelişim Düzenleyicilerinin Antioksidan Enzimler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pelle, F.D., Di Crescenzo, M.C., Sergi, M., Montesano, C., Di Ottavio, F., Scarpone, R., Scortichini, G., Compagnone, D., 2016, Micro-solid-phase extraction (μ -SPE) of organophosphorous pesticides from wheat followed by LC-MS/MS determination, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(2), 291-299.
- Pérez-López, B. and Merkoçi, A., 2011, Nanomaterials based biosensors for food analysis applications, *Trends in Food Science & Technology*, 22(11), 625-639.
- Pietta, P.G., 2000, Flavonoids as antioxidants, *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- Pisoschi, A.M., Cimpeanu, C., Predoi, G., 2015, Electrochemical methods for total antioxidant capacity and its main contributors determination: a review, *Open Chemistry*, 13(1), 824–856
- Prior, R.L., Cao, G., 2000, Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications, *HortScience*, 35(4), 588-592.
- Pryor, W.A., 1976, The role of free radical reactions in biological systems. *Free radicals in biology*, 1, 1-49.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Saad, B., Sing, Y.Y., Nawi, M.A., Hashim, N., Ali, A.S.M., Saleh, M.I., Sulaiman, S.F., Talib, K.M., Ahmad, K., 2007, Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC, *Food Chemistry*, 105(1), 389-394.

Sahu, S.C., Gray, G.C., 1997, Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei, *Food and chemical toxicology*, 35(5), 443-447.

Salazar, R., Pozos, ME., Cordero, P., Perez, J., Salinas, MC., 2008, Waksman, N., Determination of the antioxidant activity of plants from Northeast Mexico, *Pharmaceutical Biology*, 46(3), 166-170.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2005, Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.

Scarano, S., Pascale, E., Minunni, M., 2017, The early nucleation stage of gold nanoparticles formation in solution as powerful tool for the colorimetric determination of reducing agents: The case of xylitol and total polyols in oral fluid, *Analytica chimica acta*, 993, 71-78.

Scroccarello, A., Della Pelle, F., Neri, L., Pittia, P., Compagnone, D., 2019, Silver and gold nanoparticles based colorimetric assays for the determination of sugars and polyphenols in apples, *Food Research International*, 119, 359-368.

Shahidi, F. and Naczki, M., 2003, *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC press, ISBN: 9780203508732.

Sharpe, E., Bradley, R., Frasco, T., Jayathilaka, D., Marsh, A., Andreescu, S., 2014, Metal oxide based multisensor array and portable database for field analysis of antioxidants, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 552-562.

Sharpe, E., Frasco, T., Andreescu, D., Andreescu, S., 2013, Portable ceria nanoparticle-based assay for rapid detection of food antioxidants (NanoCerac), *Analyst*, 138(1), 249-262.

Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q., 2004, Purification and Characterization of Cytosolic Isoenzyme III of Cu, Zn-Superoxide Dismutase From Tobacco Leaves. *Plant Science*. 167, 1235-1241.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, In *Methods in enzymology*, 299(1), 152-178.

Sisein, E.A., 2014, Biochemistry of free radicals and antioxidants, *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(2), 110-118.

Spearman's correlation. accessed May 07, 2019. <http://www.statstutor.ac.uk/resources/uploaded/spearmans.pdf>.

Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M., Furuno, K., 1999, Anti-and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linolenic acid, *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1313-1323.

- Sun, C., Fu, J., Chen, J., Jiang, L., Pan, Y., 2010, On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures, *Journal of separation science*, 33(8), 1018-1023.
- Szydłowska-Czerniak, A., Łaszewska, A., Tułodziecka, A., 2015, A novel iron oxide nanoparticle-based method for the determination of the antioxidant capacity of rapeseed oils at various stages of the refining process, *Analytical Methods*, 7(11), 4650-4660.
- Torres, J.L., Lozano, C., Maher, P., 2005, Conjugation of catechins with cysteine generates antioxidant compounds with enhanced neuroprotective activity, *Phytochemistry*, 66(17), 2032-2037.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C., Zhu, H., 2003, Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC), *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(21), 6347-6353.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., Pifferi, G., 1994, A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation, *Free Radical Biology and Medicine*, 16(5), 547-553.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, 2007, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M.P., Borràs, E., Arola, L., 2009, Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols, *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7143-7172.
- Van Acker, S.A., de Groot, M.J., van den Berg, D.J., Tromp, M.N., Donné-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 1996, A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids, *Chemical research in toxicology*, 9(8), 1305-1312.
- Vanacker, S.A., Tromp, M.N., Haenen, G.R., Vandervijgh, W.J.F., Bast, A., 1995, Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical, *Biochemical and biophysical research communications*, 214(3), 755-759.
- Vasilescu, A., Sharpe, E., Andreescu, S., 2012, Nanoparticle-based technologies for the detection of food antioxidants, *Current Analytical Chemistry*, 8(4), 495-505.
- Vickery, H.B., 1952, A Trail of Research in Sulfur Chemistry and Metabolism and Related Fields, *The Yale journal of biology and medicine*, 25(2), 153.
- Wang, P., Lin, Z., Su, X., Tang, Z., 2017, Application of Au based nanomaterials in analytical science, *Nano Today*, 12, 64-97.
- Wang, Y.T., Lu, A.H., Zhang, H.L., Li, W.C., 2011, Synthesis of nanostructured mesoporous manganese oxides with three-dimensional frameworks and their application in supercapacitors, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(13), 5413-5421.

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S., 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS letters*, 187(1), 33-37.

Whitesides, G.M., 2005, Nanoscience, nanotechnology, and chemistry, *Small*, 1(2), 172-179.

Xiao, Q., Gao, H., Lu, C., Yuan, Q., 2012, Gold nanoparticle-based optical probes for sensing amino thiols, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 40, 64-76.

Yamashita, N., Tanemura, H., Kawanishi, S., 1999, Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II), *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 425(1), 107-115.

Yang, H., Xiong, Y., Zhang, P., Su, L., Ye, F., 2015. Colorimetric detection of mercury ions using MnO₂ nanorods as enzyme mimics, *Analytical Methods*, 7(11), 4596-4601.

Young, I.S., Woodside, J.V., 2001, Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003, Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(1), 6-20.

Zhu, C., Yang, G., Li, H., Du, D., Lin, Y., 2014, Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures, *Analytical chemistry*, 87(1), 230-249.

Ziyatdinova, G.K., Budnikov, H.C., 2015, Natural phenolic antioxidants in bioanalytical chemistry: state of the art and prospects of development, *Russian Chemical Reviews*, 84(2), 194.

Zurita, J.L., Jos, Á., del Peso, A., Salguero, M., López-Artíguez, M., Repetto, G., 2007, Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems, *Water research*, 41(12), 2599-2611.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Kader CAN
 Doğum Yeri Özalp
 Doğum Tarihi 10.02.1992
 Uyruğu T.C. Diğer:
 Telefon +90 534 360 23 98
 E-Posta Adresi kadercn.92@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite Ege Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Kimya Bölümü
 Mezuniyet Yılı 24.06.2016

Yüksek Lisans

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

Makale ve Bildiriler