T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

POLİFENOLİK ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ İÇİN GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI YENİ BİR NANO-SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

MEDET ZOR

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. KUBİLAY GÜÇLÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 24.06.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. İkbal KOYUNCU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Metin ÖZER
Marmara Üniversitesi
Fen - Edebiyat 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 abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

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

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye doktora öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmalarım sırasında göstermiş oldukları anlayış ve hoşgörüden dolayı Tez izleme jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e ve Sayın Prof. Dr. İkbal KOYUNCU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, dostlarıma ve eşim Şule DİNÇ ZOR'a yürekten teşekkür ederim

Haziran 2019 Medet ZOR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiv**
SUMMARY ..... **xvi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **8**
2.1. ANTİOKSİDANLAR 8
2.1.1. E vitamini 10
2.1.2. Askorbik Asit (C vitamini) 11
2.1.3. Antioksidan Enzimler 11
2.1.4. Karotenoidler 12
2.1.5. Polifenoller 12
2.5.1.1. Flavonoidler *13*
2.5.1.2. Fenolik Asitler *15*
2.5.1.3. Fenolik Polimerler (Tanenler) *16*
2.1.6. Tiyol Grubu Antioksidanlar 16
2.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER 21
2.3. ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMLERİ 23
2.3.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi 27
2.3.2. Toplam Radikal Tuzaklama Parametresi (TRAP) Yöntemi 28
2.3.3. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi 29
2.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi 30
2.3.5. Fe^{3+} İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi (Fe^{3+}– Fe^{2+} Transformasyonu) 31
2.3.6. Folin Ciocalteu Yöntemi (FCR) 32
2.3.7. Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemleri 33

2.3.7.1. $DPPH^{\bullet}$ Süpürme Kapasitesi Yöntemi *33*
2.3.7.2. $ABTS^{\bullet+}$ Süpürme Kapasitesi Yöntemi *34*
2.3.7.3. $DMPD^{\bullet}$ Süpürme Kapasitesi Yöntemi *35*
2.3.7.4. Süperoksit Anyonu ($O^{2\bullet}$) Radikali Süpürme Kapasitesi Yöntemi *36*
2.3.7.5. Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$) Süpürme Kapasitesi Yöntemi *36*
2.3.8. Radikalik Olmayan Oksijen ve Azot Türlerin Süpürülme Kapasitesi Yöntemleri 37
2.3.8.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2) Süpürme Kapasitesi Yöntemi *37*
2.3.8.2. Singlet Oksijen ($^1O_2^{\bullet-}$) Sönümleme Kapasitesi Yöntemleri *38*
2.3.8.3. Metal–Şelatlama Yöntemleri *39*
2.3.8.4. Tiyobarbiturik Asit (TBA) Yöntemi *42*
2.3.9. Krosin Beyazlatma Yöntemi 42
2.3.10. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi 43
2.3.11. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler 43
2.3.12. Ellman Yöntemi 43
2.3.13. Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri (Tiyosiyanat Yöntemleri) 44
2.3.14. Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite (SNPAC) Yöntemi 46
2.4. NANOTEKNOLOJİ 47
2.4.1. Nanoyapılar 48
2.4.2. Soy Metal Nanoparçacıklar 48
2.4.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) 49
2.4.4. Gümüş Nanoparçacıklar 51
2.4.5. Gümüş Nanoparçacıkların (AgNPs) Sentezi 53
2.4.5.1. Fiziksel Yöntemler *53*
2.4.5.2. Kimyasal Yöntemler *54*
2.4.5.3. Biyo–temelli Yöntemler *58*
2.5. SENSÖRLER 60
2.5.1. Kimyasal Sensörler 61
2.5.2. Optik Sensörler 68
3. MALZEME VE YÖNTEM 78
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 78
3.2. KİMYASAL MADDELER 78
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 78
3.3.1. AgNPs için Gerekli Kimyasal Çözeltiler 78

3.3.2. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Tayininde (CUPRAC) Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 79
3.3.3. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması 79
3.3.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması 79
3.3.5. Yeşil Çay İnfüzyonunun Hazırlanması....79
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER 79
3.4.1. Gümüş Nanoparçacıkların (AgNPs) Sentezi 79
3.4.2. Nano–sensörün (AgNPs İçeren Modifiye Kitosan Esaslı Kompozit Film) Sentezi....80
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi 80
3.4.4. Geliştirilen Katı Faz Nano–sensör Yöntemi ve Optimum Deney Şartlarının Belirlenmesi 81
3.4.5. Nano–sensörün Standart Polifenolik Bileşiklere ve Sentetik Karışımlarına Uygulanması ile TEAC ve TAC Değerlerinin Elde Edilmesi 81
3.4.6. Nano–sensör ile Elde Edilen Verilerin Referans Yöntem (CUPRAC) Bulguları ile Kıyaslanması 83
4. BULGULAR....84
4.1. NANO-SENSÖRÜN SEM ANALİZİ İLE KARAKTERİZASYONU....84
4.2. OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ 84
4.2.1. Nano–sensör Yöntemi için Uygun İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi 84
4.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN GELİŞTİRİLEN KATI FAZ NANO-SENSÖR YÖNTEMİ İLE KALİBRASYON GRAFİKLERİNİN ELDE EDİLMESİ 86
4.3.1. Antioksidan Bileşiklerin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi ve CUPRAC Yöntemiyle Karşılaştırılması 88
4.3.2. Sentetik Antioksidan Karışımı Çözeltilerinin Nano–sensör ile TAC Ölçümü 89
4.3.3. Nano–sensörün Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımın Belirlenmesi 90
4.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI....90
4.4.1. Bazı Meyve Sularındaki TAC Tayini için Katı Faz Nano-sensör Yönteminin Uygulanması 90
4.4.2. Bazı Bitki Ekstrelerinin TAC Tayini için Katı Faz Nano–sensör Yönteminin Uygulanması 91
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 92
KAYNAKLAR....97
ÖZGEÇMİŞ 115

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: AgNPs'in ekstinksiyon spektrumunda lokalize yüzey plazmon bandlarının görünümü. 2

Şekil 1.2: Selüloz (a), kitin (b) ve kitosan (c)'ın yapısı. 6

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması. 9

Şekil 2.2: α–tokoferolün yapısı. 11

Şekil 2.3: C vitamininin yapısı. 11

Şekil 2.4: β–karotenin yapısı. 12

Şekil 2.5: Flavonoidlerin yapısı. 13

Şekil 2.6: Bazı fenolik asitlerin yapıları. 16

Şekil 2.7: Epikateşin esaslı fenolik polimerlerin yapısı. 16

Şekil 2.8: İndirgenmiş glutatyon (GSH). 18

Şekil 2.9: Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG). 18

Şekil 2.10: N–asetil sistein'in yapısı. 18

Şekil 2.11: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı. 19

Şekil 2.12: Sistein ve sistinin yapıları. 19

Şekil 2.13: Homosistein ve homosistinin yapısı. 20

Şekil 2.14: Sisteaminin yapısı. 20

Şekil 2.15: 1,4–ditiyoeritritolün yapısı. 20

Şekil 2.16: Glutatyon etil esterin yapısı. 21

Şekil 2.17: Metiyoninin yapısı. 21

Şekil 2.18: ORAC yöntemiyle antioksidanın koruyucu etkisinin, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan hesaplanması. 27

Şekil 2.19: $[Fe^{3+}–(TPTZ)_2]^{3+}$ ve $[Fe^{2+}–(TPTZ)_2]^{2+}$ komplekslerinin yapısı. 30

Şekil 2.20: Bir antioksidan molekülünün (HA) oksitlenmiş bir antioksidan molekülüne (A^+) dönüşmesiyle gerçekleştirilen CUPRAC reaksiyonu. 31

Şekil 2.21: $DPPH^•$'ın DPPH'a dönüşüm reaksiyonu. 34

Şekil 2.22: $K_2S_2O_8$ ile ABTS'nin oksidasyonu ve $ABTS^{•+}$ eldesi. 35

Şekil 2.23: $DMPD^{•+}$ radikalinin oluşum reaksiyonu. 35

Şekil 2.24: Ferrozin'in yapısı. 40

Şekil 2.25: Kurkumin'in Fe^{2+} ile kompleks oluşum mekanizması. 41

Şekil 2.26: Ferrozin'den önce iki resveratrol molekülünün bir Fe^{2+} iyonu ile şelat kompleksi oluşturması. 42

Şekil 2.27: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında 5–tiyo–2–nitrobenzoik aside dönüşümü. 44

Şekil 2.28: DTNB–Au–NP'nin tiyol bileşiği ile reaksiyonunun şematik gösterimi. 46

Şekil 2.29: Sentezlenen AgNPs'in antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu [18]. 47

Şekil 2.30: Nanoyapı şekillerinin şematik olarak gösterimi [18]. 48

Şekil 2.31: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı. 50

Şekil 3.1: Hazırlanan kitosan esaslı kompozit filmler. 81

Şekil 4.1: Elde edilen nano-sensörün yüzeyindeki gümüş nanoparçacıkların SEM görüntüsü. 84

Şekil 4.2: Gallik asit yokluğunda (a) ve varlığında (b) nano-sensörün UV–görünür bölge spektrumları. 85

Şekil 4.3: Etanol (referans çözelti) ve GA, CT, CFA ve AA varlığında nano–sensörün reaksiyon kinetiği. 85

Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda nano–sensöre pH'ın etkisi. 86

Şekil 4.5: Polifenolik bileşiklerden kateşin (CT), kafeik asit (CFA) ve gallik asitin (GA) nano–sensör yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri. 87

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Serbest radikaller ve reaktif oksijen, azot ve klor türleri. 10

Tablo 2.2: Bazı flavonoid sınıflarının temel yapıları.....14

Tablo 2.3: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon konumları ve besin kaynakları [26]. 15

Tablo 2.4: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri [20]. 17

Tablo 2.5: AgNPs sentezlemek ve stabilize etmek için kullanılan bazı önemli fiziksel, kimyasal ve fotokimyasal yöntemler [136, 137]. 52

Tablo 2.6: Gıda polifenolleri analizi için geliştirilen nanomalzemeye dayalı elektrokimyasal sensörler. 61

Tablo 2.7: Gıda polifenollerinin analizi için geliştirilen nanomalzemeye dayalı elektrokimyasal enzim sensörleri. 66

Tablo 2.8: Gıda polifenollerinin değerlendirilmesi için optik nanomateryal tabanlı analizlerin ana özellikleri. 69

Tablo 3.1: Ag solü içeren modifiye kitosan film sentezi için optimum sentez şartları. 80

Tablo 4.1: Antioksidan bileşiklerin nano–sensör yöntemiyle elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve molar absorptiviteleri. 87

Tablo 4.2: Bazı antioksidanların nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları. 89

Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin nano–sensör yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TAC değerlerinin karşılaştırılması.....89

Tablo 4.4: Geliştirilen nano–sensör yönteminin uygulanması ile yeşil çay örneklerinde RT, GA ve CT'nin geri kazanımı (N=3). 90

Tablo 4.5: Bazı meyve sularının nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mM–TR eşdeğeri) (N=3). 91

Tablo 4.6: Bazı bitki ekstrelerinin nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri (N=3). 91

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

ε : Molar absorplama katsayısı

Kısaltmalar **Açıklama**

AA : Askorbik Asit
AgNPs : Gümüş nanoparçacık
AOC : Toplam Antioksidan Kapasite
AOT : Aerosol–OT ticari adı ile bilinen sodyum bis(2–etilhekzil) sulfosüksinat molekülü
AuNPs : Altın naoparçacıklar
CdTe–QDs : Kadmiyum tellür kuantum dotları
CeNPs : Seryum naoparçacıklar
CeONPs : Seryum oksit nanoparçacıklar
CFA : Kafeik asit
CHA : Klorojenik asit
CMCTS : Karboksimetil kitosan
CNTs : Karbon nanotüpler
CPE : Karbon pasta elektrodu
CT : Kateşin
CUPRAC : Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)–Nc : Bakır(II)–neokuproin
Cu(I)–Nc : Bakır(I)–neokuproin
CV : Dönüşümlü voltametri
DDA : 1–dodesilamin
DHLA : Dihidrolipoik asit
DMF : N–dimetil formamid
DMSO : Dimetil sülfoksit
DPV : Diferansiyel puls voltametrisi
EC : Epikateşin
ECG : Epikateşin gallat

ESR : Elektron Spin Rezonans
EVOO : Ekstra virjin zeytinyağı
FCR : Folin Ciocalteu Yöntemi
FIA : Akış enjeksiyon analizi
FR : Ferulik asit
FRAP : Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi
FTIR : Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi
GA : Gallik asit
GCE : Camsı karbon elektrot
GCE–SWCVTs : Camsı karbon elektrot–tek duvarlı karbon nanotüpler
GPTMS : 3–Glisidiloksipropil trimethoksisilan
GRQDs : Grafen kuantum dotları
GSSG : Yükseltgenmiş glutatyon
GSH **:** İndirgenmiş glutatyon
GSH–Px : Glutatyon peroksidaz
IONPs : Demir oksit nano parçacıkları
LA : Lipoik asit
LLE : Sıvı–sıvı ekstraksiyonu
LOD : Tespit limiti
LOQ : Tayin limiti
LSPR : Lokalize yüzey plasmon rezonansı
MNPs : Soy metal nanoparçacıklar
MWCNTs : Çok duvarlı karbon nanotüpler
NAC : N–asetil sistein
NP : Nanoparçacık
PCA : Temel bileşen analizi (Principal Component Analysis)
PEI : Polietilenimin
PPO : Polifenol oksidaz
PVP : Polivinilprolidon
QR : Kuersetin
QDs : Kuantum dotları
RA : Rosmarinik asit
RhNPs : Rodyum nanoparçacıkları
ROS : Reaktif oksijen türleri

RT : Rutin
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
SEAC : Sinapik asit antioksidan kapasitesi
SEM : Taramalı elektron mikroskopisi
SNPAC : Gümüş nanoparçacık antioksidan kapasite
SOD : Süperoksit dismutaz
SPE : Katı faz ekstraksiyonu
SWCNTs : Tek duvarlı karbon nanotüpler
TA : Toplam aglikonlar
TAC : Toplam antioksidan kapasite
TEAC : Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TEM : Geçirimli elektron mikroskopisi
TG : Toplam glikozitler
TP : Toplam polifenol miktarı
TR : Troloks

ÖZET

POLİFENOLİK ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ İÇİN GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI YENİ BİR NANO–SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Medet ZOR

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ

Bu tez çalışmasında fenolik antioksidanların tayini için gümüş nanoparçacık-kitosan kompozit film esaslı bir nano-sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, (*i*) ilk aşamada 1.0 mM konsantrasyonda 50 mL'lik hacimde gümüş nanoparçacık çözeltisi (SNP) hazırlanmış, (*ii*) gümüş nanoparçacık çözeltisine asetik asit (%2, w/w) eklenmiş, (*iii*) %1.5 (w/w) olacak şekilde kitosan ve (*iv*) oda şartlarında mekanik karıştırıcıda karıştırılan bu çözeltiye 0.35 mL GPTMS çapraz bağlayıcısı ilave edilmiş, (*v*) son olarak teflon döküm kabına alınan bu çözeltinin film oluşturması için etüvde bir sıcaklık programı uygulanmıştır. Gümüş nanoparçacık katkılı modifiye kitosan kompozit filmler 4.5 x 0.5 cm boyutunda kesilerek antioksidan tayini için katı faz nano-sensörler hazırlanmıştır.

Çeşitli antioksidan bileşiklerin standart çözeltileri kullanılarak nano-sensör ile antioksidan çözeltilerinin reaksiyona girmesini sağlayacak uygun inkübasyon süresi ve çözelti pH'sı gibi

koşullar belirlenmiştir. Optimum reaksiyon süresi 60 dakika ve çözelti pH değeri 5 olarak belirlenen şartlarda farklı antioksidan konsantrasyonlarındaki gümüş nanoparçacıkların görünür bölge spektrumları alınmış ve 423 nm'de ölçülen absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Tekli antioksidan standart çözeltileri için nano-sensör cevaplarının elde edilmelerinin ardından, farklı kombinasyonlarda ikili ve üçlü sentetik karışımlar için beklenen cevaplar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmış ve bu değerler elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yeni katı faz nano-sensör yöntemi elma, şeftali, vişne, üzüm ve nar suyu ile biberiye, mercanköşk ve adaçayı bitki ekstrelerindeki antioksidan içeriklerinin tayinine uygulanmıştır. Gerçek örneklerdeki toplam antioksidan kapasite değerleri geliştirilen nano–sensör yöntemi ve referans yöntem olarak seçilen CUPRAC yöntemi bulguları ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçların uyumlu olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada geliştirilen katı faz nano-sensör, antioksidanların (özellikle fenolik asitler ve flavonoidler gibi polifenolik bileşikler) tayini için özel ekipman kullanılmasına gerek kalmadan saha analizlerinde portatif, düşük maliyetli, basit ve kolay kullanımlı olması açısından klasik spektroskopik yöntemlere alternatif olabilir.

Haziran 2019, 132 sayfa.

Anahtar kelimeler: Antioksidanlar, antioksidan kapasite, polifenolik bileşikler, gümüş nanoparçacıklar,sensör.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NOVEL NANO-SENSOR BASED ON SILVER NANOPARTICLE FOR DETERMINATION OF POLYPHENOLIC ANTIOXIDANTS

Ph.D. THESIS

Medet ZOR

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Kubilay GÜÇLÜ

In this thesis, it is aimed to develop a nano-sensor based on silver nanoparticle-chitosan composite film for the determination of phenolic antioxidants. In this context, (*i*) a 50 mL volume of silver nanoparticle solution (SNP) was prepared at a concentration of 1.0 mM in the first step, (*ii*) acetic acid (2%, w/w) was added to the silver nanoparticle solution; (*iii*) a chitosan solution was obtained by adding chitosan (1.5%, w/w), (*iv*) 0.35 mL of GPTMS crosslinker was added to this solution which was mixed in mechanical mixer under room conditions, (*v*) finally, a temperature program was applied in the oven to form a film of this solution after the solution is taken into the teflon casting vessel. Modified chitosan composite films with silver nanoparticle were cut to 4.5 x 0.5 cm and solid phase nano-sensors were prepared for the determination of antioxidants.

By using standard solutions of different antioxidant compounds, optimum incubation time and pH value for the nano-sensor were determined. Optimum UV-visible spectrum of nano-sensor at different antioxidant concentrations were obtained in 60 minutes and at pH value of 5 and calibration curves of absorbance values were measured at 423 nm. After obtaining the nano-sensor responses to the individual antioxidant standard solutions, the expected antioxidant capacity values of different combinations of double and triple synthetic mixtures were calculated in terms of the trolox equivalent and they were compared with measured antioxidant capacity values of these synthetic mixtures. Also, the solid phase nano-sensor method has been applied to the determination of the antioxidant content of apple, peach, cherry, grape and pomegranate juice and rosemary, marjoram and sage plant extracts. The total antioxidant capacity values of the real samples were compared with CUPRAC method which is selected as the reference method and the results were found to be consistent.

The nano-sensor developed in this study may be an alternative to conventional spectroscopic methods to design portable, low-cost, simple and easy-to-use field analyzes without the need for special equipment for the determination of antioxidants (especially polyphenolic compounds such as phenolic acids and flavonoids).

June 2019, 132 pages.

Keywords: Antioxidants, antioxidant capacity, polyphenolic compounds, silver nano particles,sensor.

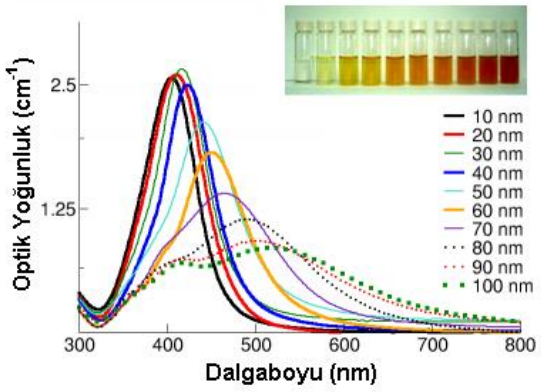
1. GİRİŞ

Son zamanlarda oksidatif stres koşullarında canlı organizmalardaki reaktif oksijen türlerinin (ROS) protein, lipid, DNA gibi biyolojik makromoleküllere hasar vermesinin önüne geçilmesinin önemi daha iyi farkedilmiş ve bu reaktif türlerinin organizmada oluşturduğu hasarları engelleyen bileşiklere olan ilgi giderek artmıştır. Oksidatif stres koşulları altında polifenolik antioksidanların (flavonoidler, hidroksisinnamik asitler, fenolik asitler vb.) organizmayı savunması çok önemlidir. Özellikle organizmada mevcut olan ve gıdalarla alınan antioksidan bileşiklerin seviyelerindeki artış, insanların hastalıklardan korunmasında ve hastalıkların tedavisinde oksidatif strese karşı olan toleransı arttırmaktadır.

Vücutta oksijen metabolizmasında meydana gelen reaktif oksijen türlerinin dengelenmemesinden kaynaklanan "oksidatif stres" kalp hastalığı, otizm, kanser, diabet, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara yol açmaktadır. Bu durumla mücadele etmenin en önemli yollarından biri, reaktif türleri süpürme özelliği olan antioksidan bileşiklerce zengin gıdaların mevcut olduğu bir beslenmedir. Ancak günümüzün yaşam şartları (güneş ışığına maruz kalma, radyasyon, hava, su ve yiyecek kirliliği vb.) ciddi oranda reaktif oksijen türlerini arttırmaktadır. Bilindiği gibi, hem hidroksil gruplarına hem de halka yapılarındaki pi elektronlarının delokalizasyonunu arttıran çifte bağlara sahip olmaları ile antioksidan özellik gösteren polifenolik bileşikler veya polifenoller serbest radikallerin oksidatif özelliklerini önemli ölçüde azaltarak hastalıklara karşı korunmada büyük rol oynamaktadır. Bu durum literatürde birçok antioksidan kapasite/aktivite tayin yöntemleri geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemlerin başlıcaları peroksil radikali süpürme, metal indirgeme gücü, organik radikal süpürme, lipid peroksidasyonu sırasında oluşan ürünlerin kantitatif tayini şeklinde özetlenebilir. Literatürde mevcut yöntemlerin çoğu sulu çözeltilerde veya uygun çözücü ortamlarında çalışıldığından karmaşık yapılı bir matrikse uygulanması zahmetli yöntemler olup; numune hazırlığı, kapsamlı kimyasal kullanımı, zaman–insan gücü gerektirmesi gibi uygulamada bazı kısıtlamalarına sahiptir. Bu kısıtlamaların giderilmesi için alternatif çözüm üreten nanoparçacık esaslı sensörlerin kullanımı günümüzde oldukça revaçtadır. Hızlı veri üretimi, düşük maliyet, işlem kolaylığı, yerinde ölçüm ve minimum çözücü gereksinimi vb. avantajlara sahip olduğundan dolayı ilgili amaca yönelik sensörlerin geliştirilmesi kaçınılmaz bir gereksinimdir. Gıda kimyasında, özellikle antioksidan

araştırmalarında nanomateryal esaslı yöntemler nadir kullanılmaktadır. Bu sebeple literatürdeki boşluğu doldurabilecek ve gümüş nanoparçacık içeren yeni bir polimer filmin antioksidan tayin sensörü olarak kullanılabileceği yeni bir yöntemin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Boyutu 100 nanometrenin (nm) altında olan nanoparçacıklar, hacimsel yapılı malzemelerden daha farklı ve üstün olarak kabul edilen özellikler sergilemektedirler. Nano yapılı parçacıklar gösterdikleri üstün özellikler sayesinde elektrik, elektronik, biyomedikal, otomotiv ve kimya sektörleri başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanıma sahiptirler. Bu nanoparçacıklar diğer materyallerle biraraya getirildiklerinde oluşan son ürün artan yüksek yüzey/hacim oranı sebebiyle daha üstün özelliklere kavuşmaktadır. Gümüş nanoparçacıklar da (AgNPs) küçük boyutları (1–100 nm) ve çok yüksek spesifik yüzey alanına sahip olmaları sebebiyle günümüzde tıp, kataliz, tekstil, biyoteknoloji, biyomühendislik, elektronik vb. farklı alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Gümüş nanoparçacıklar elektriksel iletkenlik, kimyasal stabilite, katalitik ve antibakteriyel aktivite, DNA sıralama ve yüzey–arttırılmış Raman saçılımı gibi çeşitli özelliklere ve uygulamalara sahiptir. Kararlı kolloidal AgNPs'nin üretimi için sodyum borhidrür, sodyum sitrat, askorbik asit ve elementel hidrojen indirgeme aracı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Konvansiyonel indirgeme araçlarının yanısıra çeşitli bitki ve biyolojik ekstraktlar da AgNPs sentezinde indirgeyici olarak kullanılmaktadır.



Şekil 1.1: AgNPs'in ekstinksiyon spektrumunda lokalize yüzey plazmon bandlarının görünümü.

Yukarıdaki şekildeki eksitasyon bandı, yüzeyde elektron yoğunluğundaki periyodik değişimle, parçacıkların içindeki elektron gazının toplu eksitasyonuna bağlı olarak oluşmaktadır [1]. AgNPs'in yüzey plazmon rezonans (SPR) absorpsiyonu çok yüksek molar

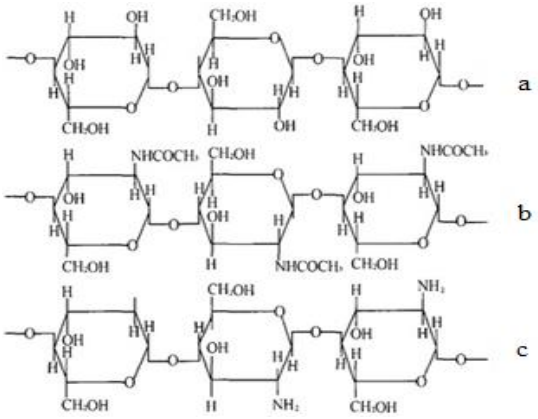
absorplama katsayısına ($\mathcal{E} \approx 3x10^{11}$ M^{-1} cm^{-1}) sahiptir ve bu durum optik tayin yöntemlerinde konvansiyonel reaktiflere nazaran yüksek hassasiyet sağlayacağı beklentisine yol açar. Ancak bu değer düzeltilmiş bir değer olup nanoparçacık esaslı toplam antioksidan kapasite yöntemlerinde ideal hassasiyete ulaşılamamaktadır. Çünkü reaksiyon stokiyometrisi, parçacık büyüklüğü ve şekli, metal ve çevreleyen ortamın dielektrik sabitleri gibi birçok faktör SPR absorpsiyonunu etkilemektedir [2].

Nano yapılı biyosensörler konusunda literatür taraması yapıldığında, karşımıza glikoz esaslı sensörler, polianilin esaslı sensörler, poröz silikon esaslı sensörler, hidrojel esaslı sensörler, grafit–epoksi kompozit esaslı sistemler, karbon nanotüpler ve grafen sistemler, poliimid sensörler ile ilgili çok sayıda çalışma çıkmaktadır. Doktora tezi kapsamında ise, katı faz nano–sensör olarak kullanılmak üzere gümüş nanoparçacık içeren kitosan esaslı polimerik membranların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu konuda yapılan ve aşağıda özetlenen literatür taramasında, kitosan esaslı sensörler ve membranlar ile ilgili çok sayıda ve farklı özellikte çalışmalar olmasına rağmen, gümüş nanoparçacık içeren kitosan esaslı polimerik hibrid membranlar ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Mevcut çalışmalarda, çinko oksit, demir oksit, altın ve bakır nanoparçacıklar ile hazırlanmış kitosan esaslı kompozit filmler sentezlenmiş olup, sentezlenen bu kompozit filmlerin kullanım alanları, bizim tez çalışmamızda amaçladığımız antioksidan tayininde optik sensör olarak kullanımından oldukça uzaktır. Khan ve ark. tarafından yapılan çalışmada, çinko oksit nanoparçacık ve kitosan kompozit filmleri, kolesterol biyosensörü olarak kullanılmıştır. Bu amaçla, çinko oksit nanoparçacıkları, kitosan içerisinde uniform olarak disperse edilmiş ve indiyum kalay oksit cam plaka üzerinde hibrid nanokompozit filmler üretilmiştir. Ardından, kolesterol oksidaz fiziksel adsorpsiyon tekniği kullanılarak kompozit film üzerine immobilize edilmiş ve serumda kolestrol miktarı ölçülmüştür [3]. Wang ve ark. demiroksit (Fe_3O_4) nanoparçacık–kitosan nanokompozit esaslı, amperometrik tirosinaz biyosensörü sentezlemişlerdir. Fe_3O_4 nanoparçacık–kitosan nanokompozit esaslı yeni tirosinaz biyosensörü fenolik bileşiklerin tespiti için geliştirilmiştir. Fe_3O_4 nanoparçacıkların geniş yüzey alanı ve kitosanın gözenekli morfolojisi, yüksek enzim yüklemesine yol açmakta ve tutuklanmış enzim kendi biyoaktivitesini koruyarak devam ettirmektedir. Bu tür yeni tirosinaz biyosensörler, çeşitli çevre şartlarında, fenolik kirleticilerin hızlı, basit ve düşük maliyetli analizi için gelecek vaat etmektedirler [4]. Kausik ve ark. yaptıkları bir çalışmada, nano demir oksit (Fe_3O_4) ve kitosan

içeren kompozit tabanlı glikoz biyosensör sentezlemişlerdir. Nano filmin hazırlanması için, demir oksit nanoparçacıkları, kitosan çözeltisi içinde disperse edilmiş ve birlikte çökeltme yöntemi kullanılarak, nano film indiyum kalay oksit cam plaka üzerinde üretilmiştir. Glukoz oksidaz (GOx), hazırlanan kitosan–Fe_3O_4 nanokompozit film üzerine fiziksel adsorpsiyon ile immobilize edilmiştir. Nanokompozit film ve GOx/kitosan–Fe_3O_4/ indiyum kalay oksit biyoelektrodu, UV–görünür bölge spektroskopisi, fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir [5]. Huang ve ark. yaptıkları bir çalışmada, altın–kitosan nanokompozitlerinin morfolojisini incelemişlerdir. Bu çalışmada öncelikle, altın nanoparçacıklar, kitosan varlığında, $HAuCI_4$'ün, sodyum borohidrit ile indirgenmesi suretiyle hazırlanmıştır. Altın–kitosan nanokompoziti, kitosan moleküllerinin, altın nanoparçacık yüzeylere adsorbe olmasıyla oluşturulmuştur. Altın nanoparçacıkların olası çekirdeklenmesi nedeniyle, nanokompozitten hazırlanan kristal kitosan yapının morfolojisi, kitosan çözeltisinden hazırlanan yapının morfolojisinden oldukça farklı elde edilmiştir. Sonuç olarak, çalışmadan elde edilen veriler, nanokompozit filmlerin dallanmış bir yapı ya da çapraz bağlı iğne benzeri bir yapı oluşturulabileceklerini göstermiştir [6]. Cardenas ve ark. yaptıkları çalışmada, gıda paket uygulamaları için mikrodalga ısıtma ile elde edilen, kolloidal Cu nanoparçacık/kitosan kompozit film sentezlemişlerdir. Bu çalışmada, mikrodalga ısıtma ve çözelti–döküm tekniği ile kolloidal Cu nanoparçacık/kitosan kompozit film hazırlanması ve karakterizasyonu incelenmiştir. Kolloidal Cu nanoparçacıkların yapıya girmesinin, kompozit filmlerin termal davranışı, yüzey, bariyer özelliği ve ışık geçirgenliği üzerine etkisi incelenmiştir. Kolloidal Cu parçacıkların, kitosan matriksi içine girmesi, filmin bariyer özelliklerini geliştirmiş, su buharı geçirgenliği yanı sıra oksijen geçirgenliğini azaltmış ve UV ışığa karşı koruyuculuğunu arttırmıştır. Bununla birlikte, filmlerin antimikrobiyal aktivitesi de test edilmiştir [7]. Shirosaki ve ark. yaptıkları bir çalışmada, kitosan–organosiloksan hibrid membranlarında, MG_{63} (human osteoblast–like cells) hücrelerinin, in vitro hücre uyumluluk (cytocompatibility) özelliğini incelemişlerdir. Kitosan–silikat hibridleri, kitosan zincirlerinin çapraz bağlanması için ajan olarak γ–glisidoksipropiltrimetoksilan kullanılarak sentezlenmiştir. Hücre yapışmasını geliştirmek ve hibrit yüzeylerde farklılaşma yaratmak için $CaCl_2$ ilave edilmiştir. Hibritlerin hücre uyumluluk ve hücre proliferasyonu özellikleri, osteoblastik hücre hattının (MG_{63}) çoğalması açısından araştırılmıştır. Kalsiyumsuz bir "kitosan–γ–glisidoksipropiltrimetoksilan" hibrid yüzeyi üzerinde, osteoblastik hücre (genç kemik hücresi) kültürünün adhezyonu ve

proliferasyonunun, kontrol kültür plakası üzerindeki ile benzer olduğu ve kitosan membranı üzerindekinden daha iyi olduğu gözlenmiştir. Hibrit üzerindeki hücre kültürünün alkalin fosfataz aktivitesi, kitosan membran üzerindekinden daha yüksek olduğu da görülmüştür. Ayrıca, hibrit içine kalsiyum iyonlarının ilave edilmesinin, yüzeylerde hücre yapışması ve çoğalmasını geliştirmediği de belirlenmiştir [8]. Fang ve ark. yaptıkları çalışmada, kitosan/jelatin hibrid membranlar için in vitro ilaç salım kinetiğini incelemişlerdir. Kitosan/jelatin hibrid membranlarından, in vitro yapılan kontrollü salım çalışmaları, farklı bir molekül ağırlığına sahip ilaçlar (5–fluorourasil, sodyum benzoat, sodyum salisilat, sodyum mandelat ve sülfasetamid sodyum) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [9]. Uragami ve ark. çalışmalarında, kuaternize kitosan ve tetraetoksilan esaslı yeni organik–inorganik hibrid membranlar ile etanol/su azeotropunun buharlaşmasını incelemişlerdir. Organik komponent olarak, kuaternize kitosan, inorganik bileşen olarak bir tetraetoksisilan; TEOS karışımı bir sol–jel reaksiyonu kullanılarak hazırlanmış ve yeni kitosan/TEOS hibrit membranları oluşturulmuştur. Etanol/su azeotropunun buharlaşması sırasında kitosan/TEOS hibrit membranların yapısı ve geçirgenlik ve ayrılma özellikleri arasındaki ilişki ayrıntılı olarak incelenmiştir. %45 mol oranında TEOS içeren hibrid membranlar, kitosan membrandan daha yüksek su/etanol seçiciliği sergilemiştir [10].

Doğal polimerler ve biyomoleküller toksik olmamaları ve biyo–uyumlu olmaları nedeniyle gümüş nanoparçacıkların elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır [11]. Kitin, [–(1–4)–poli–N–asetil–D–glukozamin], yengeç, karides, ıstakoz gibi eklembacaklıların iskeletlerinin esas maddesi olup bazı bakteri ve mantarların hücre duvarında da yer almaktadır. Selülozda C–2 karbonundaki hidroksil grubu yerine kitinde asetamido grubu bulunmaktadır [12].



Şekil 1.2: Selüloz (a), kitin (b) ve kitosan (c)'ın yapısı.

Kitosan ise kitinin alkali ortamda deasetilasyonu sonucu elde edilen, N–asetil–D–glukozamin ve D–glukozamin kopolimerlerinden oluşan ve doğada selülozdan sonra en yaygın olarak bulunan lineer bir polisakkarittir. Ortalama molekül ağırlığı 3.200–2.000.000 g/mol arasındadır. Kitinin aksine kitosan sulu asidik ortamlarda çözünür. Kitosan C–2 pozisyonunda bulunan $–NH_2$ gruplarının protonlanması sonucu çözünür ve böylelikle asidik ortamlarda polielektrolite dönüşür.

Kitosan atık suların arıtımı gibi alanlarda ve ilaç, gıda ve kozmetik üretimi gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır [12]. Kitosandan gıda paketlemede kullanılan filmler, kemik yerine kullanılan medikal malzemeler, yapay deri ve pH'a duyarlı ilaç salınım malzemesi de yapılmaktadır [13].

Gümüş nanoparçacıklar çeşitli kimyasal veya fiziksel yöntemlerle elde edilmekte olup; elektrokimyasal teknikler, kimyasal indirgeme ve fotokimyasal indirgeme gibi kimyasal yöntemler daha sıklıkla kullanılmaktadır. Kimyasal indirgeme yöntemi oluşturulan gümüş nanoparçacıkların kararlı olması ve sulu veya susuz ortam içinde kollodial olarak iyi dağılmaları nedeniyle en sık kullanılan yöntemdir [14]. Bu yöntemde gümüş iyonlarının indirgenmesi yüksüz gümüş atomları (Ag^0) oluşumu ve bu atomların oligomerik kümeler şeklinde aglomerasyon ile birikmesi vasıtasıyla gümüş nanoparçacıklar elde edilir [1]. Bu kümeler çözelti içinde sarı renkli kollodial gümüş nanoparçacıkları oluştururlar.

Antioksidan bileşiklerin insan sağlığı bakımdan önemli olmasından dolayı son yıllarda antioksidan kapasite/aktivite tayinleri literatürde geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu tayinlerde kullanım alanı bulan sensörlerle ilgili araştırma, finansal yatırım, bilimsel yayın ve

aktif araştırmacı sayıları artmaktadır. Özellikle kolorimetrik ve florometrik ölçüm esaslı sensörler arasında nano–malzemeli sensörler günümüzde oldukça ilgi çekmektedir. Bu nano malzemelerden günümüzde en sık kullanılanı altın ve gümüş olup, bu nanoparçacıkların polifenolik bileşiklerle doğrudan ve kendiliğinden bağ oluşturmasına dayanan basit, seçici, duyarlı ve geniş bir aralıkta analize olanak sağlayan yeni tayin yöntemlerinin geliştirilmesi çok önem kazanmaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

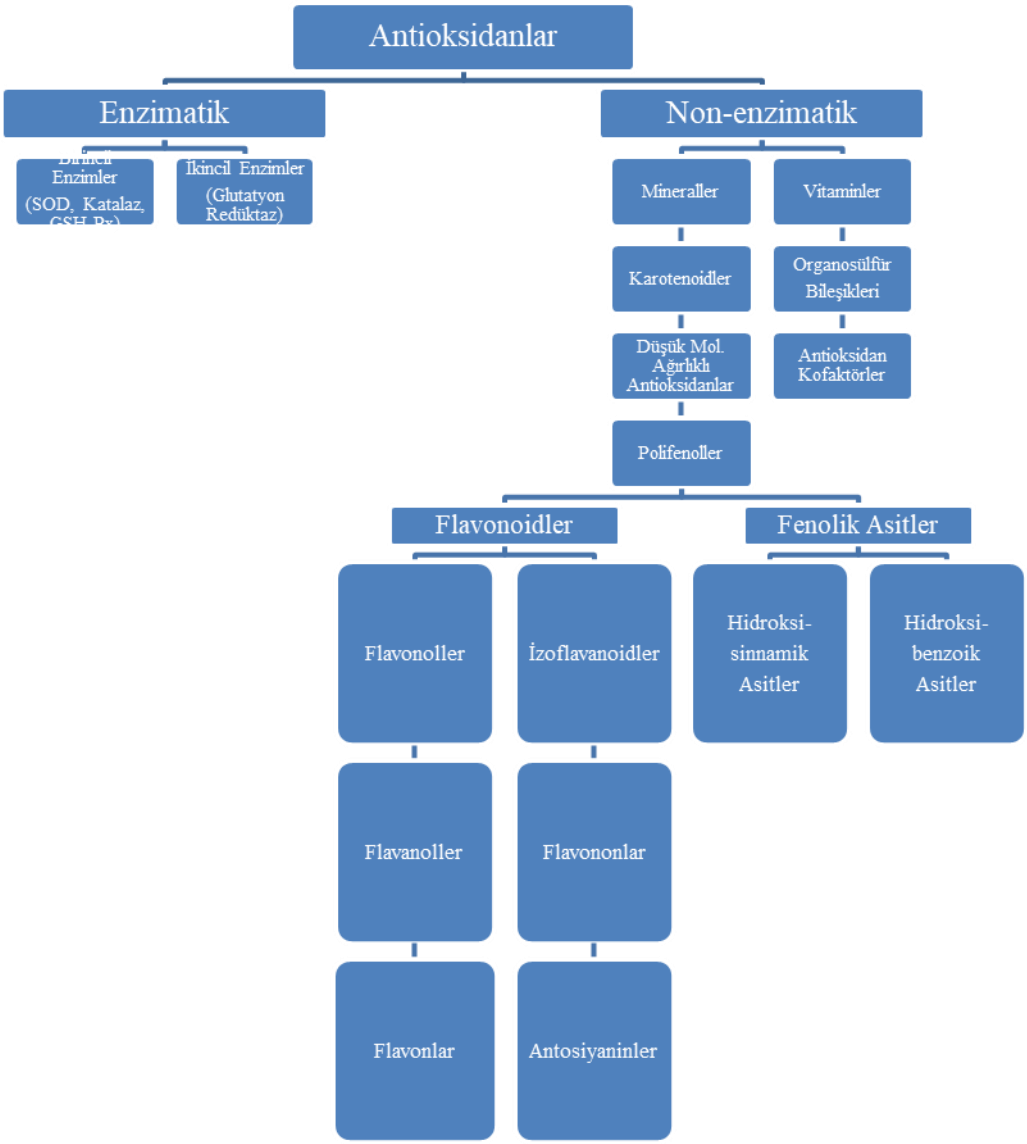
2.1. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, oksidasyon hızını engelleyen veya yavaşlatan maddelerdir. Antioksidan aktivitesi, hidroksil radikalleri, süperoksit anyonları, nitrik oksit, hidrojen peroksit vb. gibi reaktif oksijen ve azot türlerini nötralize etmek (ya da süpürmek) için antioksidan molekülün elektronlarını verebilmesine dayanır. Ayrıca, antioksidan aktivite, aromatik halka üzerindeki hidroksilasyon düzeninin sayısı ile ilgilidir. Genellikle, hidrojen donörü olarak hareket etme ve oksidasyonun engellenme kabiliyeti, fenol halkasındaki hidroksil gruplarının sayısındaki artışla doğru orantılı olduğu düşünülür. Fenolik bileşikler meyveler, sebzeler, çay, zeytinyağı, tütün ve benzeri gibi bitkilerde yaygın olarak bulunan çok çeşitli fitokimyasal gruplardır. Antioksidatif ve farmakolojik özelliklere sahip olan bitkilerdeki bu özelliklerin fenolik bileşiklerdeki fenolik asitlerin ve flavonoidlerin varlığı ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Günümüzde gıda bileşenleri veya spesifik koruyucu ilaç ve gıda takviyesi olarak kullanılan ve antioksidan özellik gösteren maddelere artan bir ilgi vardır. Sonuç olarak, antioksidanlar koruyucu ve tedavi edici çağdaş sağlık hizmetleri ile birlikte gıda koruma teknolojisinin önemli bir parçası haline gelmiştir.

Canlı organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmakta olup bu sistemler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asid, α–tokoferol, β–karoten, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismütaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerirler [15]. Bu antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif türleri etkin bir biçimde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu reaktif bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikleri ve enzimleri önemli kılmaktadır [16]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin ($^{\bullet}OH$, $O_2^{\bullet-}$, ve H_2O_2) süpürücüleri olarak bilinirler.

Günlük diyetler ve beslenme, antioksidan aktiviteye sahip olan veya yapısal özelliklerine dayanılarak ROS'u süpüreceği tahmin edilen birçok farklı türde bileşikleri içerir. Bunların en önemlileri vitamin C, tokoferol, karotenoidler ve flavonoidlerdir (Şekil 2.1). C vitamini hariç olmak üzere bu antioksidanların her bir grubu yapısal olarak farklı bileşiklerden oluşur. Örnek

olarak bugüne kadar 600'den fazla farklı karotenoid tanımlanmıştır ve bunların yaklaşık beşte biri günlük diyet ve beslenmede vardır [17].



Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.

Antioksidanlar, ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı biçimde etki ederler:

• Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif olan yeni bir moleküle çevirme "toplayıcı" etkidir. Antioksidan enzimler; Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve Glutatyon peroksidaz (GSH–Px) bu biçimde etkilidir.

• Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, "bastırıcı" etkidir. Askorbik asit (C vitamini), α–tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.

• Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki, "zincir kırıcı" etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu biçimde etki ederler.

• Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ise "onarıcı" etkidir.

Antioksidanların en önemli gruplarından olan polifenollerin ve bunların türevlerinin oksidatif sistemde farklı şekillerde davrandığı bilinmektedir. Örneğin, oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali gibi ROS türlerini sönüme uğratabilirler. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler ve metal iyonu katalizörlerini bağlayabilirler [18]. Reaktif oksijen türleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir. Tüm reaktif moleküller, serbest radikaller olsun ya da olmasın, bir oksijen atomu üzerinden reaktifliklerini gösterirler. İçinde oksijen varlığının verdiği sınırlamalara rağmen bu terim farklı kimyasalları da içerir ve kimyasal reaktiviteye sahip türler farklı atomlardan türetilebilir; azot veya klor içeren türler için böyle bir durum söz konusudur [19].

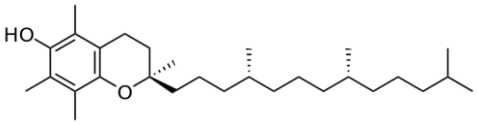
Tablo 2.1: Serbest radikaller ve reaktif oksijen, azot ve klor türleri.

Serbest radikaller	**Radikalik olmayan reaktif türler**
Süperoksit → $O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit → H_2O_2
Hidroksil → $HO^{\cdot -}$	Hidroperoksit → ROOH
Alkoksi → $RO^{\cdot -}$	Hipoklorit → ClO^-
Peroksi → $OOH^{\cdot -}$	Singlet oksijen → $^1O_2^{\cdot -}$
Nitrit oksit → $NO^{\cdot -}$	Ozon → O_3
Nitrit dioksit → $NO_2^{\cdot -}$	Peroksi nitrit → $ONOO^-$

2.1.1. E vitamini

E vitamin yağda çözünen bir antioksidandır. E vitamininin 8 moleküler formu vardır ve bunlar dört tokoferol ve dört tokotrienol'dür. Bunlardan α–, β–, γ– ve δ– tokoferoller antioksidan aktivite için gerekli olan hidroksil gruplarını içerirler. En fazla antioksidan özellik α–tokoferolde bulunur (Şekil 2.2). Tokoferollerin gösterdiği antioksidatif aktivitenin esası,

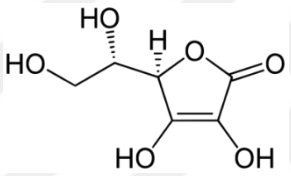
hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline aktarma yolu ile serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini süpürerek onların vücutta yaptıkları hasarı onarmaktır [20].



Şekil 2.2: α–tokoferolün yapısı.

2.1.2. Askorbik Asit (C vitamini)

Askorbik asit en etkili ve en az toksik etki gösteren antioksidandır (Şekil 2.3). Askorbik asit suda çözünebilen bir vitamindir ve gıdalarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Askorbik asit, zincir radikal reaksiyonlarını elektron transfer ederek durdurabilir.



Şekil 2.3: C vitamininin yapısı.

2.1.3. Antioksidan Enzimler

Gıdalarda ve bu gıdaları tüketen insanlarda bazı enzimler oksidatif hasara yol açan aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak oksidatif stresi azaltmaktadır. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz bu gruba giren enzimler arasında yer almaktadır [21].

Süperoksit dismutaz enzimi dokularda ve hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\bullet -}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü aşağıdaki gibi katalizler [22].

$$2\ O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2 \qquad (2.1)$$

Glutatyon peroksidaz (GSH–Px) enzimi sitozol ve mitokondride bulunur ve hücredeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda anahtar rol oynar. Glutatyon peroksidaz, glutatyonu hidrojen donörü olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmekte ve oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücre membranlarını korumaktadır.

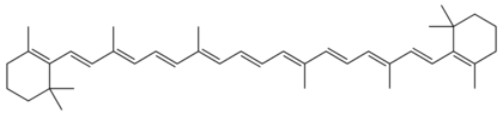
$$2\,GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GSH\text{–}Px} GSSG + 2H_2O \quad (2.2)$$

Katalaz enzimi, hücrelerin aktiviteleri sonucu oluşan hidrojen peroksiti vücut dokularına dağılmadan önce su ve moleküler oksijene ayrıştırır. Hidrojen peroksit katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalinin öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olabilir.

$$H_2O_2 \xrightarrow{katalaz} H_2O + 1/2\,O_2 \quad (2.3)$$

2.1.4. Karotenoidler

Karotenoidler, yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir (Şekil 2.4). Karotenoidlerin en önemlileri β–karoten, likopen, lutein ve zeaksantindir. Çifte bağların konjuge olması nedeniyle renklidirler. Birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. En yaygın kullanılanı A–provitamini olarak da bilinen β–karotendir [23].



Şekil 2.4: β–karotenin yapısı.

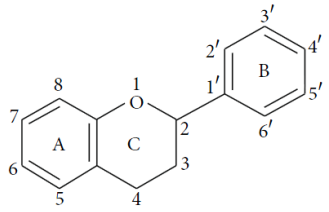
2.1.5. Polifenoller

Fenolik bileşikler, aromatik hidroksil çekirdeklerinden oluşan aynı genel yapıyı paylaşırlar ve doğada yaklaşık 8000 çeşit civarında bulunurlar [24]. Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolik bileşikleri; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler olarak üç sınıfa ayrılırlar. Bitki fenolikleri birincil antioksidanlar veya serbest radikal sonlandırıcılar olarak işlev gören ana bileşik gruplarından birini oluşturmaktadır. Bitki polifenolleri indirgeyici maddeler, hidrojen atomu donörü ve tekli oksijen tutucuları olarak hareket edebilmeleri açısından çok işlevlidir. Bazı polifenoller ayrıca, serbest hallerinde fenton tipi oksidasyon reaksiyonlarını indükleyebilen geçiş metali iyonlarını şelatlama yeteneğine sahip antioksidanlar olarak da etkilidir. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için okside olabilen substratlara oranla düşük

derişimlerde bulunduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu geciktirebilmeli veya önleyebilmeli ya da süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [25].

2.5.1.1. Flavonoidler

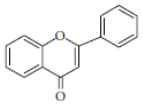
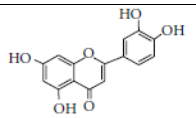
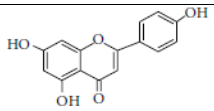
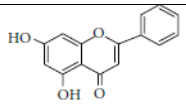
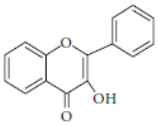
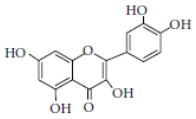
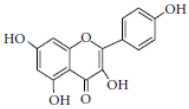
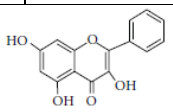
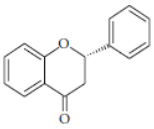
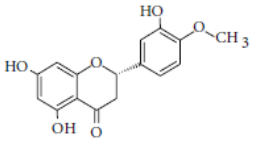
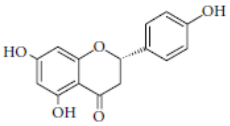
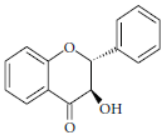
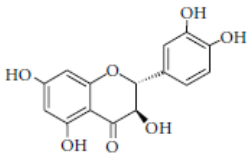
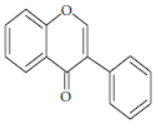
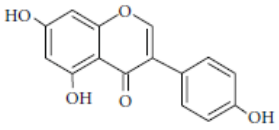
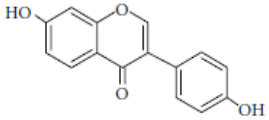
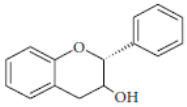
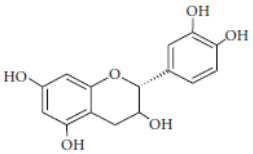
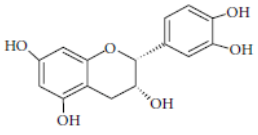
Flavonoidler 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşiklerdir ve hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar (Şekil 2.5). Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır. Doğada, 4 000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri inhibe etme özellikleri vardır [26].



Şekil 2.5: Flavonoidlerin yapısı.

Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve şekerleri sübstituent olarak içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır. Bunlar antoksantinler (flavanoller, flavonlar, flavonoller, flavanonlar ve izoflavonlar) ile antosiyanin ve antosiyanidinler olmak üzere ikiye ayrılır. Bazı flavonoidlerin temel yapıları Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2: Bazı flavonoid sınıflarının temel yapıları.

Flovanoid grubu	Flovanoid yapısı	Örnek		
Flavon		  		
		Luteolin	Apigenin	Krisin
Flavonol		  		
		Kuarsetin	Kaemferol	Galangin
Flavanon		 		
		Hesperetin	Naringenin	
Flavanol				
		Taksifolin		
İzoflavon		 		
		Genistein	Daidzein	
Flavan–3–ol		 		
		Kateşin	Epikateşin	

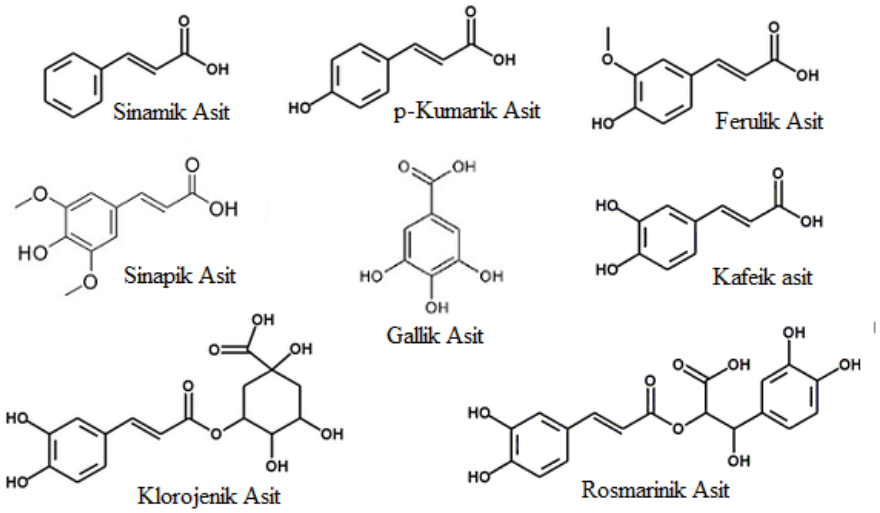
Flavonoidlerin sınıflandırılmasının yanı sıra sübstitüsyon konumları ve hangi besin kaynaklarında bulunabilecekleri ile ilgili olarak Tablo 2.3'te de bilgiler verilmiştir.

Tablo 2.3: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon konumları ve besin kaynakları [26].

Sınıfı	Adları	Sübstitüsyon Konumları	Besin Kaynakları
Flavanol	(+)–Kateşin (–)–Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin gallat Epigallokateşin gallat	3,5,7,3',4'–OH 3,5,7,3',4'–OH 3,5,7,3',4',5'–OH 3,5,7,3',4'–OH, 3–gallat 3,5,7,3',4',5'–OH,3–gallat	Çay Çay Çay Çay Çay
Flavon	Apigenin Rutin Luteolin	5,7,4'–OH 5,7,3',4'–OH, 3–rutinoz 5,7,3',4'–OH	Maydonoz, kereviz sapı, k.şarap, domates kabuğu, turunçgiller Kırmızı biber
Flavonol	Kaempferol Kuersetin Mirisetin Morin	3,5,7,4'–OH 3,5,7,3',4'–OH 3,5,7,3',4',5'–OH 3,5,7,3',4',5'–OH	Brokoli, greyfurt, çay Soğan, brokoli, domates, çay, k. şarap, elma Üzüm, böğürtlen
Flavanon	Naringin Naringenin Hesperidin Hesperetin	5,4'–OH, 7–ramnoglukoz 5,7,4'–OH 3,5,3'–OH,4'–OMe,7–rutinoz 3,5,3'–OH,4'–OMe	Turunçgiller, greyfurt Turunçgiller Portakal Portakal
İzoflavon	Genistin Genistein Daidzin Daidzein	5,4'–OH,7–glukoz 5,7,4'–OH 4'–OH, 7–glukoz 7,4'–OH	Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi
Antosiyanidin	Apigenidin Siyanidin Malvidin	5,7,4'–OH 3,5,7,3',4'–OH 3,5,7,4'–OH, 3', 5'–OMe	Renkli meyveler Vişne, çilek Kırmızı üzüm, şarap

2.5.1.2. Fenolik Asitler

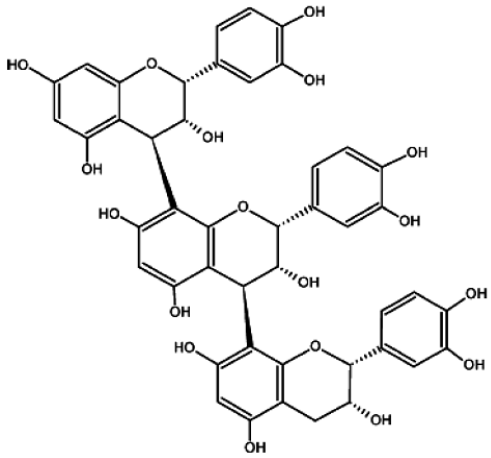
Hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki farklı gruba sahip olan fenolik asitler bitkilerde çok miktarda bulunabilen yapılardır. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur [27]. Yapılarındaki –CH=CH–COOH gruplarının varlığı, hidrojen atomu verebilme yeteneklerini arttırmanın yanısıra benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çok farklı çeşitte olabilirler (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Bazı fenolik asitlerin yapıları.

2.5.1.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

Fenolik polimerler, tanen adı da verilen yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Şekil 2.7). Çoğunlukla kateşin ve epikateşinin polimerleri olarak bulunurlar ve koyu renkli ve buruk bir tada sahiplerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda mevcutturlar [27].



Şekil 2.7: Epikateşin esaslı fenolik polimerlerin yapısı.

2.1.6. Tiyol Grubu Antioksidanlar

Tiyoller merkaptanlardır (R–SH) ve biyolojik merkaptanlar çoğu zaman biyotiyoller olarak adlandırılırlar. Biyotiyoller, büyük molekül ağırlıklı protein tiyolleri ve düşük molekül ağırlıklı serbest tiyoller olarak sınıflandırılır. Biyolojik sistemlerde bulunan tiyoller antioksidan savunma sistemlerinin koordinasyonunda esas rolü oynar ve sayısız fonksiyona

sahiptir [28]. Bir tiyol (R–SH), –SH grubundan bir H atomu kaybıyla ve kükürtten bir elektron kaybıyla bir tiyol radikali (R–S$^{\bullet}$) oluşur. Fizyolojik pH'ta tiyol radikalleri kararsızdır ve disülfür haline dönüşür.

$$RSH \longrightarrow RS^{\cdot} + H^{+} + e^{-} \qquad (2.4)$$

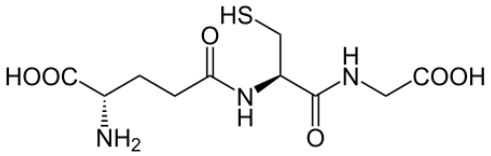
Tablo 2.4: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri [20].

İndirgenme yarı reaksiyonu	**Standart redüksiyon potansiyeli (V)**
$1/2\ O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$	+ 0.816
$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	+ 0.771
Sistin + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ 2 sistein	– 0.220
GSSG + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ 2 GSH	– 0.230
Lipoik asit + $2H^+ + 2e^- \rightarrow$ 2 dihidrolipoik asit	– 0.290

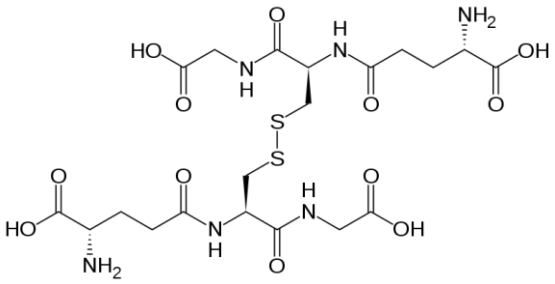
Kükürt içeren bileşiklerin antioksidan aktiviteleri genel bir eğilim izler. Bileşiğin yapısındaki indirgenmiş grup (–SH grubu) ne kadar fazla ise bileşik o kadar güçlü antioksidan etki gösterir [29]. Canlı dokulardaki tiyol bileşiklerinin önemli özelliklerinden bir diğeri de tiyol/disülfür bileşimini düzenleyici görev yapmalarıdır. Disülfür bağlarının oluşumu ve kırılması, ortamın redoks potansiyelini tayin eden elektron donör ve akseptörlerin varlığına bağlıdır. Böylece hücre içi veya hücre dışı ortama tiyol ilavesi protein yapı ve fonksiyonunda kuvvetli etkilere neden olabilir.

$$2\ R–SH \longleftrightarrow R–SS–R + 2\ e^- + 2H^+ \qquad (2.5)$$

Tiyol grubu içeren endojen antioksidan bileşiklerden en önemlisi glutatyondur. Glutatyonun (GSH), yükseltgenmiş formu olan GSSG'ye oranı biyolojik bir sistemde oksidatif stresin etkili bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır [30]. Hücreler oksidatif strese karşı GSH ve tiyoredoksin gibi tiyollerin hücre içindeki düzeylerini artırmak için bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon molekül şekilleri Şekil 2.8 ve 2.9'da görülmektedir.



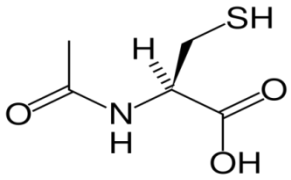
Şekil 2.8: İndirgenmiş glutatyon (GSH).



Şekil 2.9: Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG).

Kanser, diyabet, alkolik karaciğer hastalığı, katarakt, AIDS ve Parkinson hastalığı da dâhil olmak üzere birçok dejeneratif durumun ve hastalığın nedeni olarak GSH/GSSG dengesinin bozulması gösterilmektedir. Ayrıca GSH'ın serbest radikallerin genotoksik etkilerine karşı koruduğu düşünülmektedir [31].

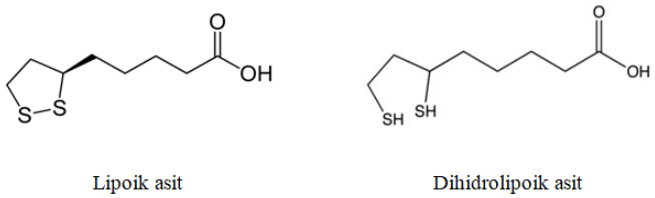
Tiyol grubu bileşiklerden olan N–asetil sistein, doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellikler gösterir (Şekil 2.10). Ayrıca bu bileşik, bir GSH ön maddesi olarak dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir. N–asetil sistein, kuvvetli bir hipokloröz asit süpürücü iken hidrojen peroksitle ise yavaş bir şekilde reaksiyona girer [32].



Şekil 2.10: N–asetil sistein'in yapısı.

Lipoik asit (LA) ve indirgenme ürünü olan dihidrolipoik asidin (DHLA) antioksidan özellikleri son birkaç yıldan beri yaygın bir şekilde incelenmektedir (Şekil 2.11). α–lipoik asit (LA:1,2–ditiyolan–3–pentanoik asit), prüvat dehidrojenaz ve ketoglutarat dehidrojenaz için koenzim olarak mitokondride bulunan bir disülfür bileşiğidir [33]. Birçok hayvan ve bitki dokusunda olduğu kadar çoğu prokaryot ve ökaryot mikroorganizmalarda da bulunur.

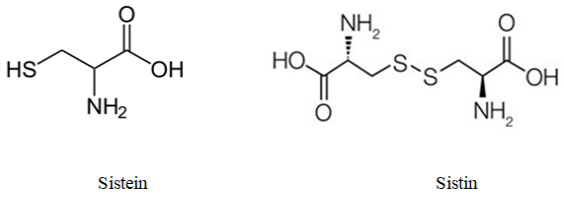
Hücresel lipoik asidin dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenmesinin memeli hücre ve dokularında olduğu belirtilmiştir [34].



Şekil 2.11: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

Yükseltgenmiş hal olan lipoik asit, hidroksil radikali, hipokloröz asit ve singlet oksijen süpürücü olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda geçiş metallerini kelatlayıcı olarak da rol oynamaktadır. Lipoik asidin GSH'a göre en önemli avantajı, lipoik asidin gıdalardan hızlıca absorbe edilebilmesi ve çoğu hücre tarafından kullanılabilmesidir. Hâlbuki GSH'ın çoğu doku tarafından kullanılmadan önce parçalanması ve yeniden sentezlenmesi gerekmektedir [35].

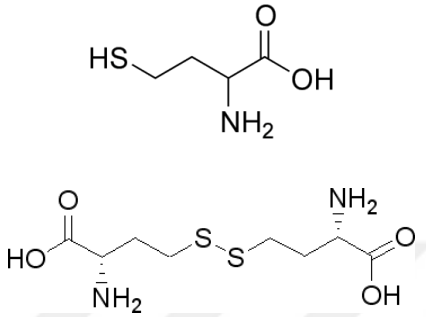
Glutatyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar açısından önemlidir (Şekil 2.12) [36]. Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında önemli rolü olan GSH'ın sentetik bir ön maddesidir. Sülfidril grubu içeren bir aminoasit olan sisteinin dokulardaki miktarı diğer aminoasitlerin miktarından daha azdır. Sisteinin oksijene karşı olan kendine has reaktifliği ve tehlikeli reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla birlikte yürüyen sisteinin sistine yükseltgenmesi, dokudaki sistein miktarının düşük olmasının nedenidir. Sistein, hem reaktif oksijen süpürücü hem de reaktif oksijen kaynağı olabilir [37].



Şekil 2.12: Sistein ve sistinin yapıları.

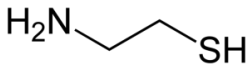
Tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden bir diğeri olan homosistein temel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasında oluşan bir ara üründür. Homosisteinin yükseltgenmiş hali homosistindir (Şekil 2.13). Homosistin ve protein bağlı homosistein gibi homosisteinin yükseltgenmiş formlarını içeren toplam plazma homosisteinindeki artış kalp

rahatsızlıklarında başlı başına bir risk faktörüdür. Toplam plazma homosisteini düzeyindeki azalma damar tıkanıklığı hastalığının azalmasında tedavi edici bir etki gösterebilir. Homosisteinin kalp rahatsızlıklarına neden olduğu patolojik mekanizma hala bilinmemektedir. Bu nedenle biyolojik örneklerdeki bu tiyol bileşikleri ve bunların disülfürlerinin tayin edilmesi gereklidir [38].



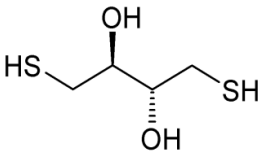
Şekil 2.13: Homosistein ve homosistinin yapısı.

Sisteamin (2–aminoethanthiol), koenzim A (CoA)'nın bozunmasıyla oluşmakta olup sisteamin memeli hücrelerinde bulunan doğal bir üründür ve farmakolojik olarak yararlı olduğu görülmüştür (Şekil 2.14). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu şizofreni hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [39].



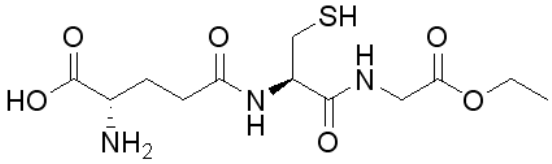
Şekil 2.14: Sisteaminin yapısı.

1,4–ditiyoeritritol (DTE) de, tiyol grubu içeren önemli antioksidan bileşiklerden biridir (Şekil 2.15). Genellikle enzim çözeltilerinin hazırlanması sırasında oksidatif hasarı engellemek amacıyla koruyucu antioksidan olarak kullanılmaktadır [40].



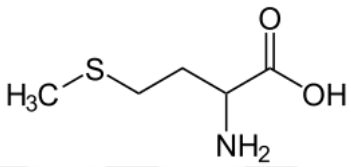
Şekil 2.15: 1,4–ditiyoeritritolün yapısı.

Glutatyon etil ester (GSHEE), glutatyon biyosentezinde bir ön maddedir ve glutatyon düzeyini artırır (Şekil 2.16). Glutatyon esterlerinin antioksidan etkileri "in vivo" [41] ve "in vitro" [42] koşullarda olmak üzere birçok çalışmada gösterilmiştir.



Şekil 2.16: Glutatyon etil esterin yapısı.

Serbest tiyol grubu değil, fakat Me–S– grubu içeren antioksidan bileşiklerden bir diğeri de metiyonindir (Şekil 2.17). Kükürt içeren bir amino asit olan metiyonin vücudumuzda sentezlenemez. Bu nedenle besin yoluyla vücuda alınmak zorundadır [43].



Şekil 2.17: Metiyoninin yapısı.

Selenyum, vücudun en önemli antioksidan enzimi olan glutatyon peroksidazın (GSHPx) bir komponenti olması nedeniyle, lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin yıkımında önemli rol oynar. Böylece, hücre zarlarının bütünlüğünün sağlanması ve korunmasında etkin fizyolojik bir görev üstlenir. Organizmada eser miktarda bulunduğu için dışardan alınması gerekmektedir. Selenyum, bitkilerde selenometionin, Se–metil–selenometionin, selenosistin ve selenosistein, hayvan dokularında ise genellikle selenometiyonin ve selenosistein olarak bulunur [44]. Yüksek konsantrasyonlarda toksik olan bu yarı metalin eser element olarak düşük konsantrasyonları vücut için esansiyeldir. Vücudumuzda birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir iz elementtir.

2.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşimi, flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesini etkilemektedir. Bu yerleşimler sebebiyle polifenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu aktiviteden daha yüksek olabilmektedir. Ayrıca polifenolik antioksidanlar içinde hem konfigürasyon hem de toplam hidroksil gruplarının sayısı antioksidan aktivitesini büyük oranda etkiler [45].

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

$$A–OH + R^{\cdot} \longrightarrow A–O^{\cdot} + RH \qquad (2.6)$$

Flavonoidlerin antioksidan kapasitelerini etkileyen faktörler; B halkasındaki o–dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan), 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalin B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran) ile C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal–süpürme potansiyeli için gerekli olan) olmak üzere üç tanedir (Şekil 2.5). Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır [46].

Reaktif oksijen ve azot türlerinin süpürülmesinde B halkası hidroksil konfigürasyonu en önemli faktördür. B halkasındaki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirirler [47].

Birçok antioksidanın B halkasındaki 3',4'–kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır ve güçlü antioksidan özellik gösterirler [48]. Örneğin luteolin ve kaemferol benzer hidroksil sayılarına sahip olmalarına rağmen, luteolin B halkasındaki kateşol yapısına sahip olduğundan daha güçlü bir antioksidandır. Yine kateşol yapısına sahip olan kateşinde de radikal süpürme gücü fazladır. Kateşol veya pirogallol sistemlerinden yoksun flavonlar kararsız radikaller oluşturur ve zayıf süpürücülerdir [49].

Fazla sayıda serbest 3–OH grubu bulunan ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler güçlü antioksidan özellik sergilerler ve serbest radikallere karşı daha etkilidirler. Bu flavonoidlere örnek olarak kuersetin, siyanidin ve kateşin verilebilir. Çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinde de kateşol veya orto–dihidroksillenmiş B halkası bulunmaktadır. Ayrıca bir antioksidanın yapısındaki doymamış bağlar, 4–okso ve diğer fonksiyonel grupların varlığı (kelatlama yeteneğinin artışı) onun antioksidan özelliklerinin artmasına sebep olmaktadır [48].

2.3. ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMLERİ

Bir kimyasalın indirgenmesi elektron eldesi olarak tanımlanır. Bir indirgeyici veya bir indirgen madde elektronları veren ve böylece başka bir reaktantın indirgenmesine neden olan bir maddedir. Yükseltgenme ise elektron kaybı olarak tanımlanır. Bir yükseltgen veya oksitleyici madde ise elektronları alan ve bir başka reaktantın oksitlenmesini sağlayan bir maddedir. Herhangi bir sistemde bir indirgeme olmadan yükseltgenme olması imkânsızdır. Redoks reaksiyonları biyolojik oksidasyonun ana tepkimesidir. İndirgen ve yükseltgen kimya terimleri iken antioksidan ve prooksidan terimleri biyolojik sistemler için kullanılırlar. Ek olarak, prooksidanları etkili bir şekilde indirgeyebilen bir antioksidan örneğin Fe^{3+}'yı etkili bir şekilde indirgemeyebilir. Bu nedenle bir antioksidan mutlaka bir indirgeyicidir denilebilirken ancak bir indirgeyici mutlaka bir antioksidandır denilemez [50].

Birçok çalışmada gösterildiği gibi hastalıkların engellenmesine katkıda bulunan doğal antioksidanların aktiviteleri DNA hasarı, mutajenik ve karsinojenik etki ile patojenik bakteriyel büyümenin inhibisyon yeteneği ile yakından ilişkilidir [51]. Son yıllarda kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların, yaşlanma ve kanserin gelişmesi ve ilerlemesinde radikallerin bilinen etkileri nedeniyle gıdaların antioksidan aktivitesi ile ilgili çalışmalara artan bir ilgi vardır. Bu yüzden antioksidanların analizi için güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, gıda maddelerinin toplam antioksidan kapasitesini test etmek için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir [52]. Geliştirilen biyoanalitik yöntemler, reaksiyon mekanizmaları, oksidan ve hedef türler, reaksiyon koşulları ve sonuçların ifade biçimi açısından birbirinden farklıdır. Ayrıca, toplam antioksidan kapasite çok sayıda faktöre bağlıdır. Bununla birlikte, antioksidanların davranışının tam bir antioksidan profili oluşturması tavsiye edilir. Farklı çalışmalardan elde edilen verilerin karşılaştırılması da zordur. Bu bağlamda, bir metot seçildiğinde reaksiyon mekanizmasının temel faktörü göz önünde bulundurulmalıdır. İn vitro analitik yöntemlerin belirlenmesi için, oksidasyon kaynakları, konsantrasyonlar, diğer oksidan türleri ve biyolojik hedefler ile etkileşimleri gibi bazı bilgiler bilinmelidir. Bir gıda bileşeninin antioksidan aktivitesi için standartlaştırılmış bir yöntem aşağıdaki ideal gereksinimleri karşılamalıdır [53]:

- potansiyel uygulamalarda gerçekte meydana gelen kimyasal reaksiyonları ölçmeli,
- biyolojik açıdan ilgili olan bir radikal kaynağı kullanmalı,

- tanımlanmış bir kimyasal mekanizmaya sahip bir yöntem kullanmalı,
- yöntem için gerekli kimyasallar ve enstrümanlar kolayca bulunabilir olmalı,
- gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğe sahip olmalı,
- hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanların tayini ve farklı radikal kaynakların kullanımı için uyarlanabilir olmalı,
- rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabilecek basit, hızlı, ekonomik vb. özelliklere sahip olmalıdır.

Genel olarak, gıda bileşenlerinin antioksidan kapasitesinin belirlenmesine yönelik yöntemlerde, radikaller iki ana mekanizma ile deaktive edilebilir. Bunlar tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (SET) veya hidrojen transferine dayanan reaksiyonlardır (HAT). Sonuç, mekanizmaya bakılmaksızın aynıdır, ancak kinetik ve yan reaksiyon potansiyeli açısından farklıdır. SET–tabanlı analiz yöntemleri, potansiyel bir antioksidanın metaller, karboniller ve radikaller dâhil herhangi bir bileşiği indirgemek için bir elektronu transfer etme yeteneğini algılar. SET–tabanlı yöntemlerde oksidan indirgendikçe renk değişimi ile görülebilir [54].

HAT–temelli analiz yöntemleri, serbest radikalleri süpürmek için bir antioksidanın hidrojen verme yeteneğini ölçer. HAT reaksiyonları, çözücü ve pH'dan bağımsızdır ve genellikle oldukça hızlıdır; tipik olarak saniyeler veya dakikalar içinde tamamlanır. Metaller de dâhil olmak üzere indirgeyici maddelerin varlığı, HAT analizlerinde bir girişim kaynağıdır ve hatalı olarak yüksek cevap alınmasına neden olabilir. HAT reaksiyonuna dayalı yöntemlerde, antioksidan hidrojen vererek serbest radikalleri süpürebilir:

$$AH + X^{\cdot} \longrightarrow A^{\cdot} + XH \qquad (2.7)$$

Bu yöntemlerin bağıl reaktivitesi antioksidanın H–verici grubunun bağ ayrışma enerjisi ile belirlenir ve antioksidanların genellikle bağ ayrışma enerjisi (–10 kcal/mol) ve iyonizasyon potansiyeli (–36 kcal/mol) aralığındadır. Bu yöntemlerde metal iyonları gibi indirgeyici ajanların varlığı, yüksek bir reaktivite oluşturabileceği için tavsiye edilmez [55]. HAT reaksiyonuna dayanan yöntemler aşağıda sıralanmıştır [54]:

- Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- Toplam radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP)
- İndüklenen LDL oksidasyonunun inhibisyonu
- Toplam oksidan süpürme kapasitesi analizi (TOSCA)
- Crocin ağartma yöntemi
- Kemilüminesans yöntemi

SET–temelli yöntemler bir bileşiğin antioksidan etki gösterme yeteneğini gösterir. Bu yöntemler metal iyonları, karbonilleri ve radikalleri de içeren herhangi bir bileşiği indirgemek için bir elektron aktarır [56].

$$AH + X^{\cdot} \longrightarrow AH^{\cdot +} + X^{\cdot} \qquad (2.8)$$

$$AH^{\cdot +} + H_2O \longrightarrow A^{\cdot} + H_3O^{+}$$

$$X^{-} + H_3O^{+} \longrightarrow XH + H_2O$$

$$AH + M^{3+} \longrightarrow AH^{+} + M^{2+}$$

SET yöntemlerinde bağıl reaktivite, esas olarak deprotonasyona ve reaktif fonksiyonel grubun iyonizasyon potansiyeline dayanmaktadır [57]. Bu bakımdan değerlendirildiğinde SET reaksiyonları pH'a bağımlıdır. Genel olarak iyonlaşma potansiyeli değerleri artan pH ile azalmakta ve deprotonasyon ile elektron verici kapasitede bir artış görülmektedir.

Redoks potansiyeli ile SET yöntemi arasında bir korelasyon olduğu görüşü önerilmiş ancak bu görüş tutarlı bir şekilde ispatlanamamıştır. SET reaksiyonları genellikle yavaştır ve tamamlanması uzun zaman gerektirebilir, bu nedenle antioksidan kapasite hesaplamaları kinetiğe göre değil, ürün başına yüzde düşüşüne dayanmaktadır. AH^{+} katyonu yeterli bir ömre sahip ise ikincil reaksiyonlar analizlerde önemli girişimleri ortaya çıkarır ve hatta in vivo toksisiteye veya mutajeniteye yol açabilir [58]. SET yöntemleri, plazma redoks sisteminin korunmasında önemli olan ve polifenolleri indirgeyen askorbik asit ve ürik aside çok duyarlıdır. Özellikle metaller gibi iz elementler ve kirletici maddeler SET yöntemlerinde girişimlere neden olup sonuçlarda tutarsızlıklara, yüksek değişkenliğe ve kötü tekrarlanabilirliğe sebep olabilirler. İyonlaşma potansiyel değerleri –45 kcal/mol'ü aştığında

antioksidan mekanizma ağırlıklı olarak elektron transfer tipindedir. SET temelli yöntemler aşağıda gösterilmiştir.

- Folin–Ciocalteu reaktif testi ile toplam fenolik analizi
- Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) analizi
- Ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP)
- Bir oksidan olarak Cu^{2+}–kompleks kullanılan toplam antioksidan potansiyel testi
- 2,2–Difenil–1–pikrilhidrazil radikal (DPPH) süpürücü
- 2,2–Azinobis 3–etilbenztiazolin–6–sülfonik asit radikali ($ABTS^{\bullet+}$) süpürme testi
- N, N–dimetil–p–fenilendiamin radikali ($DMPD^{\bullet+}$) süpürme testi
- Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi.

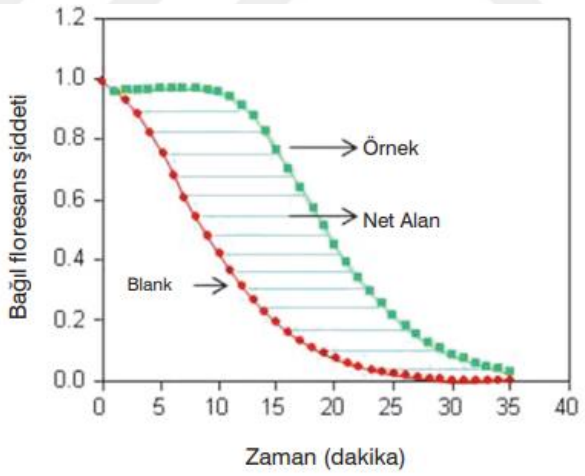
ABTS yöntemlerinin hem HAT hem SET mekanizmalarını kullandığı rapor edilmiştir [59]. Numunenin oksidanlar için süpürme kabiliyetini ölçen diğer analiz yöntemleri de vardır; ancak bunlar biyolojik sistemler veya gıda maddelerindeki büyük makromoleküllerin etkileşime girmesine ve zarar görmesine neden olur.

- Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$) süpürme yöntemleri
- Hidrojen peroksit (H_2O_2) süpürme yöntemleri
- Hidroksil radikal ($HO^{\cdot}$) süpürüme yöntemleri
- Singlet oksijen söndürme yöntemleri
- Peroksinitrit ($ONOO^{-}$) süpürme yöntemleri

Sıklıkla kullanılan antioksidan tayin yöntemlerinin ayrıntıları aşağıda verilmiştir:

2.3.1. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

ORAC birçok bitkisel içerikli materyalin çalışmalarında antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde geniş bir şekilde kullanılmaktadır. ORAC, Ghiselli ve ark. [60] ve Glazer'ın [61] öncül çalışmaları sonrasında Cao ve ark. [62] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem ORAC analizinde okside edilebilir protein maddesi olarak beta–fikoeritrin ve peroksi radikal üreticisi olarak 2,2–azobis (2–aminopropan) diklorit (AAPH) veya Cu^{2+}– H_2O_2 hidroksi radikal sağlayıcısı olarak kullanılır. Yöntemde temel olarak 37 ºC'de bulunan AAPH'ın uyarılarak peroksi radikallerine karşı antioksidan özelliğinin ölçümüne dayanmaktadır. Yöntemde ışıma (florosan) probu olarak fluoresein kullanılmakta olup bu ışımadaki azalma peroksi radikalleri ile reaksiyon vererek fluoreseinin bozulma derecesi hakkında bilgi verir. Bu nedenle bu yöntem tek bir antioksidanın ölçülmesi için yeterli değildir. Yöntemde eğri altındaki bir alan kullanılır ve böylece hem inhibisyon süresi hem de bir antioksidan tarafından serbest radikalin inhibisyon derecesi tek bir şekilde ölçülür (Şekil 2.18). Bu önemlidir çünkü diğer benzer yöntemler ya sabit bir inhibisyon derecesinde ya da belirli bir süredeki inhibisyon derecesini kullanır.



Şekil 2.18: ORAC yöntemiyle antioksidanın koruyucu etkisinin, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan hesaplanması.

Ayrıntılı olarak değinmek gerekirse ORAC yönteminin temelinde peroksil radikalinin floresans özellikte olmayan bir ürün oluşturmak için floresans özellikteki prob ile reaksiyona girmesi sağlanır ve antioksidan kapasite zamanla oluşan ürünün oranı veya miktarı ile belirlenir:

$$R - N = N - R \xrightarrow{O^2} N_2 + 2\,ROO^{\cdot} \quad (2.9)$$

$$ROO^{\cdot} + Prob_{(floresans)} \longrightarrow ROOH + Prob_{(non-floresans)}$$

$$ROO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROOH + A^{\cdot}$$

$$ROO^{\cdot} + A^{\cdot} \longrightarrow ROO - A$$

Zincir kırıcı antioksidanlar içeren bir numunenin varlığında, floresans şiddetindeki azalma engellenir [61]. İlk başlarda Porphyridium cruentum'den izole edilen bir protein olan β–fikoeritrin (β–PE) ROO• ile reaksiyona giren floresan prob olarak kullanılmış ve reaksiyon sonucunda floresan olmayan bir ürün oluşturulmuştur [62]. Günümüzde tercih edilen floresan problar 30,60–dihidroksispiro [izobenzofuran–1 [3H], 90 [9H] –ksanten] –3–on (floresein) ve 20,70–dikloro–dihidrofloresin diasetat (diklorofluorescein) olup daha kararlı ve daha az reaktiftirler [63].

ORAC yöntemi yağ içeriği olan hem gıda hem de fizyolojik sistemlerde antioksidanların reaksiyonlarını modelleyen kontrol edilebilir bir peroksil radikal kaynağı sağlar. Bu sayede radikal kaynağını ve çözücüyü değiştirerek hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidanları tespit etmek için ORAC yöntemi uyarlanabilir. Aseton veya bir su–çözünürlük arttırıcı olarak kullanılan % 7'lik rasgele metillenmiş b–siklodekstrin içeren su karışımı kullanılarak hem lipofilik hem de hidrofilik zincir–kırıcı antioksidanlara ORAC yöntemi uygulanmıştır [64]. Ayrıca, lipofilik bileşiklerin ya bir organik ortam ya da lipozomlar kullanılarak ORAC yöntemiyle miktar tayini yapılmıştır [65]. Bu yöntemi geliştirmek için bir mikroplaka floresan okuyucu ile birleştirilmiş çok kanallı bir sıvı taşıma sistemi kullanılarak yüksek verimli bir yöntem geliştirilmiştir [64]. Mikroplakanın dış tarafındaki küçük sıcaklık farkları yöntemin tekrarlanabilirliğini azaltabilmektedir. Gıda maddelerinin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için ORAC yönteminin kullanılmasının bir yararı antioksidan kapasitelerinin gecikme fazları olan ve olmayan örnekleri hesaba katmasıdır. Bu durum özellikle yavaş ve hızlı etkili antioksidanlar içeren karmaşık içerikler içeren besinleri ve takviyeleri ve ayrıca önceden hesaplanamayan birleşik etkilere sahip bileşenleri ölçerken faydalıdır.

2.3.2. Toplam Radikal Tuzaklama Parametresi (TRAP) Yöntemi

TRAP yöntemi Wayner ve ark. tarafından 1985 yılında kullanılmaya başlanmış ve Ghiselli ve ark. tarafından geliştirilmiştir [66]. TRAP yönteminde 2,2'–azobis (2–aminopropan) diklorit (APPH)'den peroksi radikali üretilmektedir. Numuneye APPH eklendikten sonra

oksitlenebilir materyalin oksidasyonu reaksiyon boyunca tükenen oksijenin miktarının ölçülmesi ile izlenir. Başlatma periyodu süresince bu oksidasyon plazmadaki antioksidanlar tarafından yavaşlatılır. Başlatma periyodunun uzunluğu iç standart olarak kullanılan trolox (6–hidroksil–, 5, 7, 8, tetramethilikroman–2–karboksilik asit) ile karşılaştırılır ve numunenin antioksidant kapasitesiyle miktar bakımından ilişkilendirilir [67]. Floresan probu olarak R–fikoeritrin (R–PE) kullanılan bu yöntemde APPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinden R–PE'yi koruyabilme özelliği ölçülmektedir. Yöntem, zaman gerektiren kompleks bir yöntem olup tecrübe de gerektirmektedir. Orjinal TRAP testi ile ilgili en büyük problemlerden biri oksijen elektrodunun gerekli süre boyunca stabilitesini koruyamaması nedeniyle dedektör olarak kullanılmasıdır [68]. Daha sonra bu analiz floresan prob olarak β–PE kullanılarak geliştirilmiştir. Plazmanın β–PE'yi ROO• oksidasyonundan koruma yeteneği florimetrik olarak izlenmiştir [69]. Troloks eşdeğerleri (TE) olarak ifade edilen antioksidan kapasite, hesaplanırken,

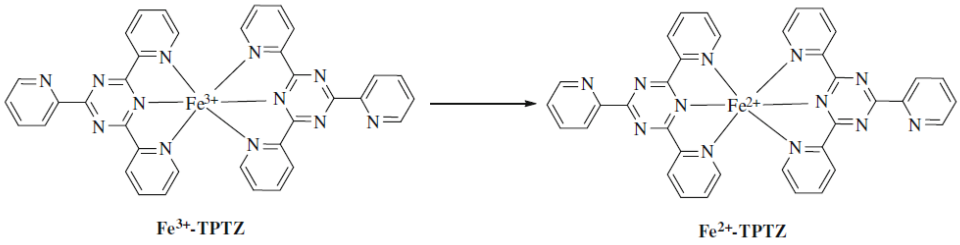
$$\text{Troloks Eşdeğeri (TE)} = (A_{troloks} / B_{troloks}) \times A_{AO} \quad (2.10)$$

kullanılmakta olup; Atroloks troloks konsantrasyonunu, Btroloks troloksun varlığında hedeflenen oksidasyonun kinetik eğrisinin gecikme süresini ve AAO ise gıda bileşenleri gibi antioksidan moleküller varlığında hedeflenen oksidasyonun kinetik eğrisinin gecikme süresini gösterir.

2.3.3. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi

Benzei ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde demir (III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanlarının toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük miktarlarda oluşan Fe(III)'ün, tripiridiltriazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)–TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)–tripiridiltriazin [Fe(II)–TPTZ] kompleksine indirgenmektedir (Şekil 2.19).

Bu yöntem plazma analizleri için geliştirilmiş olup sonrasında farklı yiyecek veya içecekler, çay, baharatlar, sebzeler, meyve suyu ve meyveler üzerinde çalışılarak uygulanmış ve kullanılmıştır [70-72].



Şekil 2.19: $[Fe^{3+}–(TPTZ)_2]^{3+}$ ve $[Fe^{2+}–(TPTZ)_2]^{2+}$ komplekslerinin yapısı.

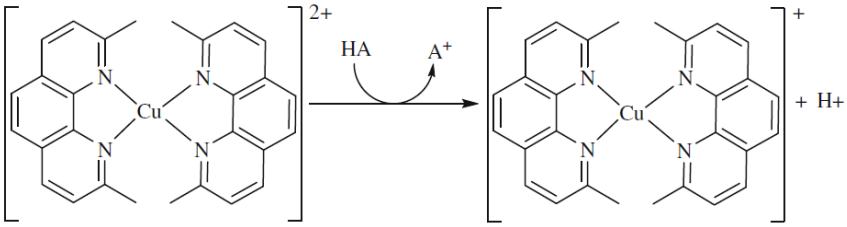
Meydana gelen Fe(II)–TPTZ kompleksinin rengi koyu mavi olup 593 nm'de maksimum absorbans verir. Sonuçlar troloks eşiti olarak ifade edilir. Orijinal yöntemde absorbans 4 dakika kadar izlenir. Ancak, bu süre içerisinde reaksiyon tamamlanamaması nedeniyle izlenme zamanının 30 dakikaya uzatılması tavsiye edilir [73]. Yöntem sadece demir iyonunu temel almakta olup mekanik ve fizyolojik antioksidan aktiviteleri için uygun değildir. Ancak, diğer yöntemlere oranla daha basit, hızlı ve ucuzdur [59]. FRAP analizi demir çözünürlüğünü korumak için asidik pH 3.6'da gerçekleştirilir. Düşük pH'ta reaksiyon dominant reaksiyon mekanizmasında bir kaymaya neden olup elektron transferini harekete geçiren ve redoks potansiyelini artıran iyonizasyon potansiyelini azaltır [74].

2.3.4. Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

İlk olarak Apak ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntemde temel olarak 2,9–dimetil–1,10–fenantrolin (Neokuproin; Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)–neokuproin kompleksinin (Cu(II)–Nc), 450 nm'de maksimumu absorbans veren bakır(I)–neokuproin (Cu(I)–Nc) şelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır (Şekil 2.20) [75]. CUPRAC yönteminin toplam antioksidan kapasite (TAC) analizinde diğer elektron transferi (SET) yöntemlerinden üstün özellikleri, pH'ın kolay ayarlanabilmesi, reaktanların kolay kullanılabilmesi ve stabil olması, düşük maliyetli olması ve hidrofilik antioksidanların yanında lipofilik antioksidanlara da uygulanabilen basit bir yöntem olmasıdır [76].

Neokuproin, bir heterosiklik organik bileşik ve şelatlama ajanıdır. CUPRAC yöntemi antioksidanlar tarafından Cu^{2+}'nin Cu^{+}'e indirgenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem eş zamanlı olarak, kimyasal tip veya hidrofiliklikten bağımsız olarak çeşitli antioksidanlar için uygun maliyetli, hızlı, kararlı, seçici ve uygundur. Ayrıca, kuprik iyonunun (Cu^{2+}) "in vitro"

şartlarda elde edilen indirgenme sonuçlarına bakılarak antioksidanların in vivo şartlardaki reaksiyonlarında da verimli bir şekilde ölçümler yapılabileceğinin olası olduğu gösterilmiştir. CUPRAC kromojenik redoks reaksiyonu, SH grubu antioksidanlara [24] cevap vermeyen FRAP yönteminden farklı olarak glutatyon ve nonprotein tiyoller gibi tiyol–tipi antioksidanları fizyolojik pH'a yakın bir pH (7.0)'da gerçekleştirilebilir [77].



Şekil 2.20: Bir antioksidan molekülünün (HA) oksitlenmiş bir antioksidan molekülüne (A^+) dönüşmesiyle gerçekleştirilen CUPRAC reaksiyonu.

CUPRAC reaktifi seçicidir, çünkü Folin veya ferrik iyon bazlı oksidatif reaktiflerden daha düşük bir redoks potansiyeline sahiptir ve $ABTS^+$/ABTS redoks çiftininkine yakındır. Ayrıca, gerçek antioksidanlar olarak sınıflandırılmayan basit şekerler ve sitrik asit CUPRAC reaktifi ile oksitlenmezken çoğu fenolik antioksidanlar uygun redoks potansiyelleri nedeniyle kolaylıkla oksitlenir. Bazı antioksidanlar (tiyoller gibi) FRAP yöntemi gibi Fe^{3+}'e dayalı reaktiflere karşı inert kalmaktadır ama bunlar CUPRAC reaktifi ile kolayca oksitlenir [78]. CUPRAC yöntemi için optimum pH 7.0'dır ve gerçek koşullar altında antioksidan etkisini simüle eden fizyolojik pH'a (7.4) yakındır. Bu yöntem ile hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar ölçülebilmektedir [79].

2.3.5. Fe^{3+} İndirgeme Antioksidan Gücü Yöntemi (Fe^{3+}– Fe^{2+} Transformasyonu)

Antioksidan etkileri olan biyoaktif bileşikler indirgenebilir ve oksidanları inaktive edebilir. Bir biyoaktif bileşiğin indirgeme kapasitesi doğrudan $Fe[(CN)_6]_3$'ü $Fe[(CN)_6]_2$'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürünlere serbest Fe^{3+} ilavesi Perl'in Prusya mavisi kompleksi, $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$, oluşumuna neden olurki bu bileşik 700 nm'de güçlü absorbansa sahiptir [80].

$$Fe(CN)_6^{3-} \xrightarrow{\text{indirgeyici}} Fe(CN)_6^{4-} \qquad (2.11)$$

$$Fe(CN)_6^{4-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$$

Reaksiyon karışımının absorbansındaki bir artış, kompleksin oluşumundaki bir artışa bağlı olarak indirgeme kapasitesinde bir artışa işaret eder. Toplam antioksidan aktivitesini ölçmek ya da potansiyelini indirgemek için serbest radikal stresine dayanacak ve toplam kapasitenin bir göstergesi olarak kullanılabilecek birçok yöntem vardır. Ferrik iyonlara (Fe^{3+}) dayanan antioksidan yöntemleri bir demir (III) tuzunun bir oksidan olarak kullanıldığı bir SET'ten yararlanır [81]. Bu yöntemde test çözeltisinin sarı rengi antioksidan örneklerinin indirgenme gücüne bağlı olarak yeşilin ve mavinin çeşitli tonlarına dönüşür. Antioksidan bileşikler ferrisiyanid komplekslerini (Fe^{3+}) Fe^{2+} formuna indirger. Prusya mavisi renkli kompleks oluşturulur. Bu nedenle, indirgeme miktarı, Perl Prusya mavisi oluşumunun 700 nm'de ölçülmesiyle belirlenebilir [82]. Bu yöntemde test çözeltisinin sarı rengi antioksidanın indirgenme gücüne bağlı olarak yeşil veya maviye dönüşür. Daha yüksek absorbans, daha yüksek ferrik indirgeme gücünü gösterir.

2.3.6. Folin Ciocalteu Yöntemi (FCR)

Bu yöntem; Singleton ve ark. tarafından antioksidanların toplam fenol miktarını ölçmek için geliştirilmiştir [83]. Yöntemin temeli kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır.

$$Mo(VI) + e^{-} \longrightarrow Mo(V) \qquad (2.12)$$

Mavi renkli kompleks oluşumu 750–765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılsa ve sonuçlar gallik asit eşiti olarak verilse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda gallik asit yerine tannik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, protokateşik asit vanilik asit ve ferrulik asit de kullanılmaktadır [59].

FCR'nin tam kimyasal yapısı bilinmemektedir, ancak fosfomolibdik / fosfotungstik asit kompleksleri içerdiği kabul edilmektedir [83]. Test sistemi, tungstat ve molibdatın, oldukça bazik ortamda (% 5–10 sulu Na_2CO_3) karışımıdır. Fenolikler bazik ortamda enerjik olarak okside olurlar, bu da $O_2^{\bullet -}$'nin oluşmasına neden olur. Bu da molibdat ile reaksiyona girer ve molibden oksit oluşur ve bu iyon 750 nm civarında çok yoğun bir absorbansa sahiptir. 1927'de geliştirilen orijinal FCR yöntemi, tirosin analizi için kullanılan kimyasal tepkime maddeleri (Folin 1927) referans alınarak geliştirilmiş olup burada bir molibdotungtat reaktifi ile fenollerin oksidasyonu ile 745–750 nm'de absorbansa sahip renkli bir ürün vermektedir:

$$Na_2WO_4 / Na_2MoO_4 + \text{Fenol} \longrightarrow (\text{Fenol–}MoW_{11}O_{40})^{4-} + Mo^{5+}{}_{(sarı)} + e^- + Mo^{4+}{}_{(mavi)} \quad (2.13)$$

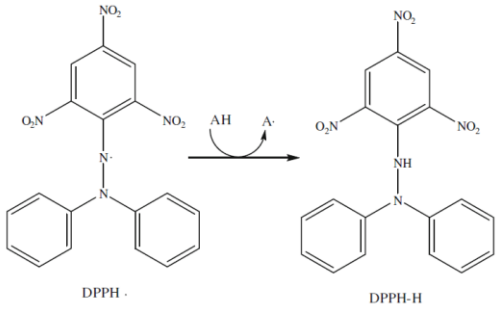
2.3.7. Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemleri

Serbest radikal zincir reaksiyonu yaygın bir lipit peroksidasyonu mekanizması olarak kabul edilir. Radikal süpürücüler peroksidasyon zinciri reaksiyonlarını sona erdirmek ve gıda ürünlerinin kalitesini ve stabilitesini geliştirmek için peroksit radikalleri ile doğrudan reaksiyona girebilir ve bunları temizleyebilir [84]. Serbest radikal süpürücü yöntemleri antioksidanların lipit oksidasyonunu inhibe ettiği bilinen mekanizmalardan biridir. Bu yöntem antioksidan aktivite çalışmalarında standart bir testtir ve spesifik bileşiklerin radikal süpürücü aktivitesini tespit etmek için hızlı bir tekniktir. $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, $DMPD^{\bullet+}$ ve $O_2^{\bullet-}$ kullanımına dayalı yöntemler gıdaların, içeceklerin ve bitkisel ekstrelerin antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için kullanılan en popüler spektrofotometrik yöntemler arasındadır. Hem kromojenler hem de radikal bileşikler doğrudan antioksidanlarla reaksiyona girebilir. Ayrıca $DPPH^{\bullet}$ ve $ABTS^{\bullet+}$ süpürücü yöntemler basit, hızlı, duyarlı ve tekrarlanabilir prosedürleri nedeniyle bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için kullanılmıştır [85].

2.3.7.1. $DPPH^{\bullet}$ Süpürme Kapasitesi Yöntemi

$DPPH^{\bullet}$ süpürme yöntemi antioksidan aktiviteyi dolaylı yolla belirlemek için kullanılan en eski yöntemdir. İlk olarak 1950'lerde doğal malzemelerdeki H donörlerinin keşfedilmesi ile önerildi. Daha sonra yöntem hem tekli olarak fenoliklerin hem de yiyeceklerin ve ayrıca bazı biyolojik örneklerin antioksidan potansiyelini belirlemek için ölçülmüştür [51]. DPPH radikali, koyu mor bir renge sahip olan birkaç kararlı organik azot radikalinden biridir. Ticari olarak temin edilebilir ve $ABTS^{\bullet+}$ gibi testten önce üretilmek zorunda değildir. DPPH yönteminde antioksidanlar stabil radikal DPPH'yi sarı renklendirilmiş difenil–pikrilhidrazine indirgemektedir (Şekil 2.21). Bu yöntem radikal olmayan bir hidrojen içeren antioksidanın varlığında DPPH–H'nin oluşmasına bağlı olarak DPPH'nin alkolik çözelti içindeki indirgenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem antioksidanların $DPPH^{\bullet}$'ye karşı indirgeme kabiliyetinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu kabiliyet ESR tarafından veya absorbansındaki azalmanın ölçülmesiyle değerlendirilebilir. DPPH genellikle antioksidanların serbest radikal süpürücü aktivitesini değerlendirmek için bir reaktif olarak kullanılmakta olup; 517 nm'de

maksimum absorbans gösteren stabil bir serbest radikaldir. DPPH radikalleri antioksidan gibi proton verici bir substratla karşılaştıklarında radikaller süpürülür ve absorbans azalır [86].



Şekil 2.21: DPPH$^{\bullet}$'ın DPPH'a dönüşüm reaksiyonu.

$$AR - OH + DPPH^{\cdot} \longrightarrow AR - O^{\cdot} + DPPH - H \quad (HAT) \qquad (2.14)$$

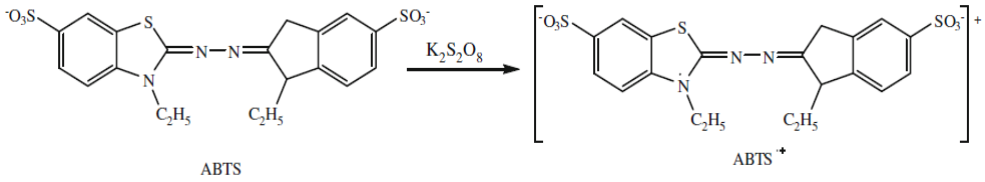
$$AR - OH + H_2O \longrightarrow AR - O^{-} + H^{+} \qquad (SPLET)$$

$$AR - O^{-} + DPPH^{\cdot} \longrightarrow AR - O^{\cdot} + DPPH^{-}$$

$$DPPH^{-} + H^{+} \longrightarrow DPPH - H$$

2.3.7.2. ABTS$^{\bullet+}$ Süpürme Kapasitesi Yöntemi

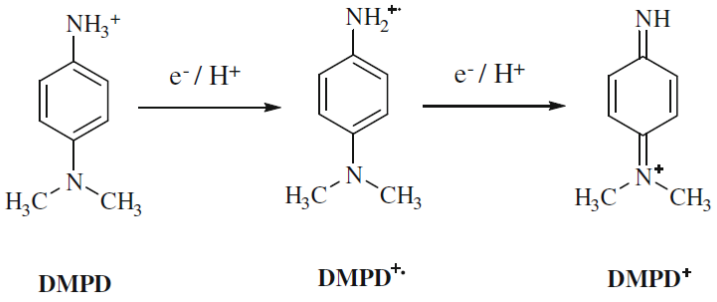
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi ilk defa Miller ve ark. tarafından raporlanmış [87] olup sonrasında Re ve ark. tarafından da geliştirilmiştir [88]. TEAC analizi 2,2'–azinobis (3–etil–bezotiazolin 6 sulfonat) (ABTS) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanır. TEAC'ın karakteristik dalga boyu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum absorbasyon yapar [59]. Radikal katyon formunda üretilen ABTS, spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan aktivitesini ölçme de uygulanır. Deneyler renksiz sıvı potasyum persülfit ile ABTS'nin oksidasyonu aracılığında ABTS'deki renk üretimini içermekte olup hem lipofilik bileşenlere hem de hidrofilik bileşenlere uygulanabilir (Şekil 2.22). ABTS çözeltisi seyreltilir ve yaklaşık 10 dakika içinde absorbansı ölçüldükten sonra 1 ml çözeltiler ile farklı konsantrasyonlardaki ekstraktların ilk karışımları ölçülür. Troloks, vitamin E'nin suda çözünen analoğu olup referans standart olarak kullanılır. Analiz geniş bir şekilde bitkilerin antioksidan özelliklerini tespit etmek için kullanılmaktadır.



Şekil 2.22: $K_2S_2O_8$ ile ABTS'nin oksidasyonu ve $ABTS^{\bullet+}$ eldesi.

2.3.7.3. DMPD• Süpürme Kapasitesi Yöntemi

$ABTS^{\bullet+}$ kullanımına çok benzeyen başka bir yöntem N,N–dimetil–p–fenilendiamin veya DMPD• yöntemidir. Fogliano ve ark. geleneksel ABTS testine kıyasla daha basit, daha verimli ve daha ucuz olan ABTS testinin yeni bir versiyonu olan DMPD• yöntemini önermiştir [89]. Bir oksidan veya bir asidik pH varlığında DMPD stabil ve renkli bir DMPD radikal katyonu olan $DMPD^{\bullet+}$'ya dönüştürülür (Şekil 2.23). $DMPD^{\bullet+}$'nin UV–görünür spektrumu 505 nm'de maksimum absorbansı gösterir. Bununla birlikte, stokiyometrisinin antioksidan standardı ve radikal kararlılığı ile ilgili verileri mevcut değildir. Diğer bir problem, DMPD'nin sadece suda çözünür olduğu ve hidrofobik antioksidanlarla kullanılamayacağıdır.



Şekil 2.23: $DMPD^{\bullet+}$ radikalinin oluşum reaksiyonu.

Bir hidrojen atomunu $DMPD^{\bullet+}$'ya transfer edebilen antioksidan bileşikler absorbansta azalmaya sebep olurlar. Bu reaksiyon hızlıdır ve stabil olan son nokta antioksidatif verimin bir ölçüsü olarak alınır. Bu nedenle bu yöntem radikal hidrojen donörlerinin $DMPD^{\bullet+}$'dan tek elektronu süpürme kabiliyetini yansıtır. Ön denemeler oksidant çözeltisi seçiminin ve $DMPD^{\bullet+}$ konsantrasyonu ile oksidatif bileşiğin konsantrasyonu arasındaki oranın yöntemin etkinliği için çok önemli olduğunu göstermektedir. Aslında, radikal katyonun oluşumu çok

yavaştır ve absorbansta sürekli bir artışa neden olur. En iyi sonuçlar, 0.1 mM'lik son konsantrasyona kadar renkli bir çözelti veren $FeCl_3$ ile elde edilmiştir [90].

2.3.7.4. Süperoksit Anyonu ($O^{2\bullet}$) Radikali Süpürme Kapasitesi Yöntemi

Süperoksit anyon radikalleri ($O^{2\bullet}$) biyolojik olarak oldukça zehirlidir ve istilacı mikroorganizmaları öldürmek için bağışıklık sistemi tarafından oluşturulur. Fagositlerde, istilacı patojenlerin oksijen vasıtasıyla öldürme mekanizmalarında kullanılmak üzere NADPH oksidaz enzimi tarafından büyük miktarlarda üretilir. Süperoksit anyon radikali seçici reaktiviteye sahip oksijenle yüklü bir radikaldir. İn vivo olarak bir elektronun oksijene bağlanması sonucu üretilir. Bu radikal ya çeşitli metabolik süreçlerden ya da ışınlama ile oksijen aktivasyonundan sonra ortaya çıkar [91]. Süperoksit anyonu enzimatik ve nonenzimatik mekanizmalar ile H_2O_2'ye dönüştürülmekte olup; H_2O_2 daha az demir veya bakır [92] gerektiren Fenton reaksiyonu [93] tarafından daha reaktif olan $HO^{\bullet}$'ya dönüştürülür. Nispeten zayıf bir oksidan olmasına rağmen, süperoksit anyonu lipidler, proteinler ve DNA'da oksidatif hasara neden olan H_2O_2, $^1O^{2-}$ ve $HO^{\bullet}$ 'nin öncüsüdür. Ayrıca, süperoksidin doğrudan lipit peroksidasyonunu başlattığı gözlenmiştir [94].

2.3.7.5. Nitrik Oksit Radikali ($NO^{\bullet}$) Süpürme Kapasitesi Yöntemi

Nitrik oksit, insanlar dâhil olmak üzere memelilerde önemli bir hücre sinyal molekülüdür [95]. Düşük NO üretim seviyeleri, karaciğer gibi bir organın iskemik hasardan korunmasında önemlidir. Metabolizmada NO, çeşitli nitrik oksit sentaz enzimleri tarafından L–arginin, oksijen ve NADPH'den endojen olarak biyosentezlenir. Nitrik oksit oldukça reaktiftir ve birkaç saniyelik ömre sahiptir. Membranlarda kolayca yayılır.

Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$), farklı fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [96]. Vriesman ve ark. [97] kükürt içeren bileşiklerin $NO^{\bullet}$ süpürme kapasitesinin, bir amperometrik NO sensörü kullanılarak sulu çözelti içindeki miktarının belirlenmesi için nispeten basit bir yöntem geliştirmiştir. $NO^{\bullet}$ konsantrasyonu doğal logaritması ve geçen zamanın doğrusal olarak ilişkili olduğu tespit edilmiştir. $NO^{\bullet}$'nin kendiliğinden bozulması için düzeltme yapıldıktan sonra süpürme reaksiyonunun ikinci dereceden hız kinetiği belirlenmiştir. Bu yöntemde reaksiyon ortamında sadece $NO^{\bullet}$ ve süpürücü moleküller gibi reaktif türler bulunduğundan, rekabetçi olmayan bir reaksiyon mekanizması vardır. Ayrıca, $NO^{\bullet}$ süpürme kapasitesinin değerlendirilmesi ESR spektrometrisi

kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. 3–(2–hidroksi–1–metil–etil–2–nitrozohidrazino)–N–metil–1–propanamin vericisiden üretilen $NO^{\bullet}$, karboksi–PTIO olarak adlandırılan 2–(4–karboksifenil)–4,4,5,5–tetrametilimidazolin–l–oksil–3–oksit ile NO_2'ye oksitlenmesi ESR ile ölçülmüştür. Yöntem steroidal olmayan anti–enflamatuar ilaçlara uygulanmıştır. Bu yöntemin kusuru yaklaşık 2 saatlik uzun reaksiyon süresine sahip olmasıdır.

2.3.8. Radikalik Olmayan Oksijen ve Azot Türlerin Süpürülme Kapasitesi Yöntemleri

Bu reaktif türler genelikle doğal olarak oluşmakta olup; bir radikal değildirler ve radikal mekanizmalarla reaksiyona girmezler. Güçlü bir oksitleyici ajan olarak kabul edilirler ve oksidatif stresi arttırırlar.

2.3.8.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2) Süpürme Kapasitesi Yöntemi

Hidrojen peroksit (H_2O_2), doğal yollarla oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak organizmalarda üretilir. Hemen hemen tüm canlılar peroksidazlar olarak bilinen ve düşük H_2O_2 konsantrasyonlarını su ve oksijene zararsız ve katalitik olarak parçalayan enzimlere sahiptir. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilir ancak düşük konsantrasyonlarda reaksiyona girmez ve çoğu bileşikle oldukça yavaş reaksiyona girer. Ayrıca H_2O_2'nin toksik olduğu ve hücre ölümünü in vitro indüklediği bilinmektedir. H_2O_2 birçok hücresel enerji üreten sisteme saldırabilir. Örneğin, glikolitik enzim gliseraldehid–3–fosfat dehidrojenazını etkisizleştirir [98].

Yarı–fizyolojik koşullar altında polifenol bakımından zengin içeceklerden de üretilir ve daha uzun inkübasyon süresine sahip olanlarda miktarı artar. Aktif fagositlerle H_2O_2 üretiminin birkaç bakteri ve fungal suşun öldürülmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. H_2O_2 genellikle güçlü bir oksitleyici ajan olarak kabul edilir. H_2O_2'nin ya doğrudan ya da dolaylı olarak indirgeme ürünü olan OH– yoluyla, enflamatuar medyatörlerin sentezinde ve aktivasyonunda haberci bir molekül olarak hareket ettiğine dair kanıtlar artmaktadır. Bu moleküle karşı süpürme kapasitesini değerlendirmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biri, 230 nm'de UV bölgesinde H_2O_2'nin içsel absorbansına dayanmaktadır [99]. H_2O_2 konsantrasyonu süpürücü bileşikler tarafından azaltıldıkça, 230 nm'de absorbans değeri de azalır. Yine de numuneler içinde bulunabilecek diğer bileşenlerin bu "dalgaboyu" ölçüsünün performansını etkileyecek şekilde bu dalga boyunda da absorbans yapması oldukça normaldir

ve bu durumun yöntemin hem kesinliğini hem de doğruluğunu tehlikeye atabileceğini bildirmiştir. Bundan dolayı kör numune ölçümlerinin de alınması gerekmektedir. Zorluklar sadece bununla sınırlı değildir. İlk olarak, yüksek miktarda arka plan absorbansı olduğunda küçük değişiklikler arasında ayrım yapmak zor olabilir. İkincisi, örneklerin absorpsiyonu H_2O_2 ile reaksiyondan sonra değişebilir ve kör ölçüm geçerli olmaz.

Hidrojen peroksitin kendisi çok reaktif değildir; bununla birlikte, bazen hücreler için zehirli olabilir, çünkü hücreler içinde $HO^{\bullet}$'a neden olabilir. Toksisitesi $HO^{\bullet}$'ya dönüşümden kaynaklanmaktadır. H_2O_2 kültürdeki hücrelere oksidatif DNA hasarına aracılık eden geçiş metali iyonuna bağımlı OH radikallerine yol açabilir. Yaklaşık 20–50 μg / hücre seviyesinde veya daha düşük H_2O_2 seviyeleri, birçok hücre tipinde sınırlı sitotoksisiteye sahiptir. Bu nedenle H_2O_2'nin in vivo olarak çok toksik olduğu ve hızlı bir şekilde ortadan kaldırılması gerektiği ve bunun için katalazlar, peroksidazlar ve tioredoksin gibi enzimler ile bağlantılı sistemlerin kullanıldığı düşünülmektedir [100]. Bundan dolayı H_2O_2'nin yanı sıra süperoksit anyonunun giderilmesi, farmasötik ve gıda sistemlerinin korunmasında çok önemlidir [101]. H_2O_2 tehlikesi büyük ölçüde ya ultraviyole ışığa maruz kalmakla ya da en önemlisi demir olan geçiş metali iyonları ile etkileşime girerek, rastlantısal olarak reaktif $HO^{\bullet}$'ne olan dönüşümünden kaynaklanmaktadır.

2.3.8.2. Singlet Oksijen ($^1O_2^{\bullet-}$) Sönümleme Kapasitesi Yöntemleri

Singlet oksijen genellikle ışık varlığında oluşur. Singlet oksijenin UV radyasyonu cilt hasarından, göz merceklerinde katarakt oluşumundan, maküler dejenerasyondan ve fotosensitizör olarak işlev gören fitokimyasalların, ilaçların ve pestisitlerin emiliminden veya yutulmasından elde edilen ışığa duyarlılıktan sorumlu olduğu düşünülmektedir [102]. Singlet oksijen ($^1O_2^{\bullet-}$) bir radikal değildir ve radikal mekanizmalarla reaksiyona girmez ancak çoğunlukla çift bağlara eklenerek reaksiyona girip radikal zincir reaksiyonlarını başlatan alkoksil radikallerine indirgenebilen endoperoksitler oluşturur [59]. Eşlenmemiş elektronları bulunmayan uyarılmış bir moleküler oksijen halidir ve çok çeşitli biyomoleküller ile doğrudan reaksiyona giren güçlü bir oksitleyici ajan olduğu bilinmektedir [103]. Düşük enerjili durumuna geçtiğinde, tekli oksijen 270 nm'de karakteristik fosforesansı absorbe eder. Bu nedenle, birkaç bileşiğin $^1O_2^{\bullet-}$ süpürme kabiliyeti, ışık şiddetindeki azalma oranları aracılığıyla ölçülmüştür [104]. Bununla birlikte, $^1O_2^{\bullet-}$'nin kendisinden lüminesansın şiddeti sulu ortamda bile tekrarlanabilir niceliksel bilgi sağlamak için genellikle yetersizdir. Tetra

tert–bütilftalosiyaninin $^1O_2^{\bullet-}$ gecikmeli floresansının süpürülmesine dayanan daha duyarlı bir yöntem geliştirilmiştir [105]. Yöntem β–karoten, α–tokoferol ve laurik asit gibi $^1O_2^{\bullet-}$ süpürücüler olarak görev yapan bileşiklere uygulanmıştır.

2.3.8.3. Metal–Şelatlama Yöntemleri

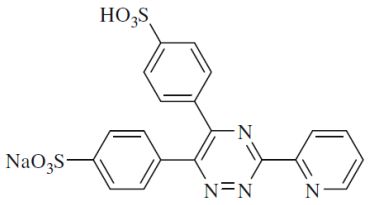
Fe^{2+} gibi elementel türler, hayvan ve insan sistemlerinde ROS üretimini kolaylaştırabilir ve maddelerin demir şelatlama kabiliyeti antioksidan özellik açısından değerli olabilir. Demir normal fizyoloji için vazgeçilmez bir mineraldir, ancak aşırı hücre hasarına yol açabilir. Geçiş metalleri arasında demir, yüksek reaktivitesi nedeniyle en önemli lipid oksidasyonu olan proksidan olarak bilinir. Fe^{2+} içeren etkin şelatlayıcılar aynı zamanda, $HO^{\bullet}$ üreten Fenton–tipi reaksiyonlara katılabilecek demir iyonlarını ortaya çıkararak oksidatif hasara karşı da koruma sağlayabilir. Fenton reaksiyonuna maruz kalırlarsa, bu indirgenmiş metaller yüksek oranda reaktif hidroksil radikalleri oluşturabilir ve böylece oksidatif strese katkıda bulunabilir ve Fe^{2+} iyonları peroksitlerden radikalleri de üretmektedir, ancak bu oran, Fe^{2+} iyonlarına nazaran on kat daha azdır [106].

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\cdot} \qquad (2.15)$$

Fenton, düşük konsantrasyonlu demir tuzları ve H_2O_2 varlığında, tartarik asitin (1894) dihidroksimaleik aside oksitlendiğini keşfetmiştir. "Fenton reaktifi" adı çok çeşitli organik substratların etkili bir oksidanı olan H_2O_2 ve demir tuzlarının bir karışımını ifade eder. Daha sonra, Haber ve Weiss, demir tuzları ile katalize edilen H_2O_2'nin ayrışmasında, aktif bir ara madde olarak OH•'nin oluştuğunu öne sürdüler (1934). Fenil reaktifinde $HO^{\bullet}$'ın reaktif bir ara ürün olarak bulunması bunun etkili bir hidroksilleme maddesi olmasıyla ilişkilendirildi. Daha sonra, H_2O_2 ile benzer şekilde Cu^+, Ti^{3+}, Cr^{2+} ve Co^{2+} gibi daha düşük oksidasyon değerine sahip çok sayıda metal iyonunun ve komplekslerinin bulunduğu bulunmuştur. Bu metallerin H_2O_2 ile karışımlarına da böylelikle "Fenton–benzeri" reaktifler olarak ad verilmiştir [107]. Çalışmalar, bir geçiş metali ve H_2O_2 arasındaki elektron transfer reaksiyonunun bir dış küre elektron transfer mekanizmasını takip etmediğini göstermiştir. Bunun yerine, reaksiyon elektron transferi gerçekleşmeden önce H_2O_2'nin geçiş metalleri ile bir kompleks oluşturduğu bir iç küre elektron transfer işlemi ile gerçekleşir [108]. Bu nedenle geçiş metali reaktif oksijen türleri vermek için H_2O_2 ile reaksiyona girmez ve demir şelatlayıcıların Fe^{2+}–aracılı

Fenton reaksiyonunu inhibe ettiğini ve bu nedenle Fe^{2+}/ H_2O_2'nin neden olduğu oksidatif hasarı önlediğini göstermiştir [25].

Fe^{2+} iyonunu en aza indirmek, ROS ve moleküler hasarı oluşumunu engelleyerek oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilir. Bunu sağlamak için Ferrozin Fe^{2+} iyonu ile kantitatif olarak kompleks oluşturabilir mi diye düşünülmüş ve ferrozin yönteminde reçineler üzerinde önceden konsantre edildikten sonra nanomolar konsantrasyona kadar demir içeriği tespit edilmiştir (Şekil 2.24). Şelatlama maddelerinin varlığında kompleks oluşumu bozulur ve bu da kompleksin kırmızı renginde bir azalmaya neden olur. Bu nedenle renk indirgemesinin ölçümü ile kullanılan şelatlayıcının metal–şelatlama aktivitesi tahmin edilebilir. Düşük absorbans daha yüksek metal–şelatlama aktivitesini gösterir [109].

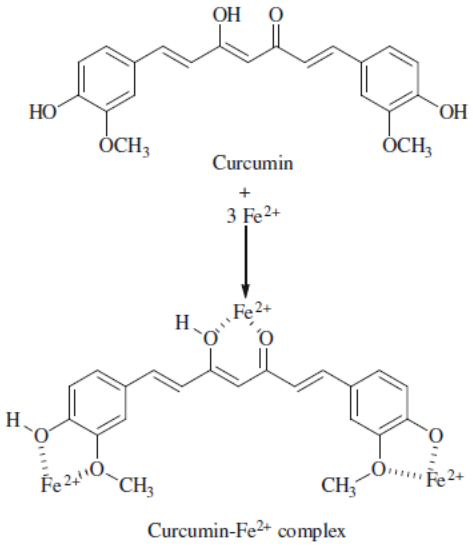


Şekil 2.24: Ferrozin'in yapısı.

Bir antioksidanın metal–şelatlama aktivitesinin diğer bir ölçüm yolu bir demir iyonu çözeltisinin test materyali ile önceden muamele edilmesinden sonra ferrozin–Fe^{2+} kompleksinin absorbans ölçümüne dayanır. Ferrozin serbest Fe^{2+} ile bir kompleks oluşturur, ancak başka bir şelatlayıcılara bağlanmış Fe^{2+} ile reaksiyona girmez. Bundan yararlanarak ortamda başka şeklatlayıcıların varlığı tespit edilebilir. Ferrozin– Fe^{2+} kompleksi λ562 nm'de ölçülen absorbansa sahip bir kırmızı renkli kromofor üretir. Antioksidan şelatlama maddesinin varlığını ölçmek için bu kompleksleşme reaksiyonunun önemli bir dezavantajı ise kompleks oluşum sabitleri ve iki şelatlama maddesi arasındaki demir bağlama rekabeti nedeniyle reaksiyonun hem antioksidan–Fe^{2+} hem de ferrozin–Fe^{2+}'den etkilenmesidir. Bu nedenle, zayıf bir antioksidan demir şelatlayıcısı varlığı kantitatif tayinde ciddi olarak göz ardı edilecektir. Beslenme açısından bakıldığında, zayıf bir antioksidan demir şelatlayıcısının Fenton reaksiyonunu in vivo ortamda önlemedeki rolünü değerlendirmek henüz mümkün değildir. Bununla birlikte, bu reaksiyon antioksidanın demirle şelatlama aktivitesini değerlendirmek için uygun bir analiz görevi görür.

$$3 \text{ ferrozin} + Fe_2(H_2O)_6^{2+} \longrightarrow Fe\text{–(ferrozin)}_3^{4-} + 6\ H_2O \qquad (2.16)$$

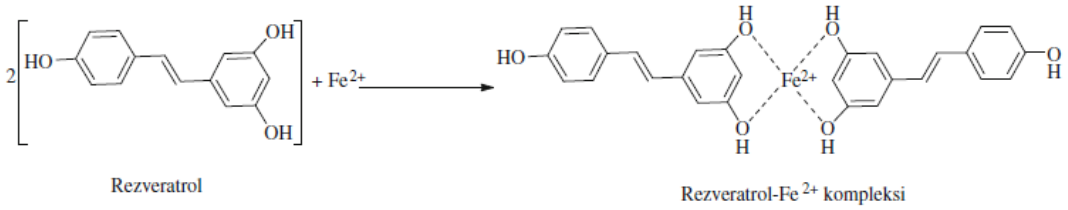
Metal–şelatlama kapasitesi lipit peroksidasyonunda katalizör geçiş metali konsantrasyonunu azalttığı için önemlidir. Şelatlama maddelerinin ikincil antioksidanlar olarak da etkili oldukları bildirilmiştir, çünkü bunlar redoks potansiyelini azaltırlar ve böylece metal iyonlarının oksitlenmiş formunu stabilize ederler. Bir gıda bileşeninin demir bağlanmasında belirli bir kapasiteye sahip olduğu ve bunun da bir peroksidasyon inhibitörü olarak etkisinin ana demir bağlama kapasitesine bağlı olabileceği bildirilmiştir [98]. Bu yöntemde bir gıda bileşeni olan kurkumin ferro–ferrozin kompleksinin oluşumuna girişim yapmış olup ferrozine göre daha yüksek bir şelatlama aktivitesine bağlanma afinitesi sahiptir ve ile demirli iyonu yakalayabilmiştir. Şekil 2.25'te gösterildiği gibi, kurkumin Fe^{2+} iyonunu –OH ve $–OCH_3$ fonksiyonel grupları ile şelatlayabilir. Buradan hareketle C–OH ve C = O fonksiyonel grupları içeren yapılara sahip bileşiklerin metal iyonlarını şelatlayabileceği bildirilmiştir. Kazazica ve ark. kaempferol gibi flavonoidlerin karbonil fonksiyonel grupları vasıtasıyla Cu^{2+} ve Fe^{2+} iyonunu şelatlayabildiğini göstermiştir [110].



Şekil 2.25: Kurkumin'in Fe^{2+} ile kompleks oluşum mekanizması.

–OH, –SH, –COOH, $–PO_3H_2$, C = O, $–NR_2$, –S– ve –O– fonksiyonel gruplarının iki veya daha fazlasını içeren bileşikler: uygun bir yapı işlevi konfigürasyonunda metal şelasyonu gösterebilir [111]. Yakın zamanlarda, Fiorucci ve ark. kuarsetin–şelatlı metal iyonlarının aynı şekilde olduğunu göstermiştir [112].

Başka bir çalışmada, L–karnitin'in karbonil ve hidroksil fonksiyonel grupları vasıtasıyla Fe^{2+} iyonlarını şelatladığı gösterilmiştir. Aynı şekilde, karbonil ve hidroksil fonksiyonel gruplardan kurkumine bağlı Fe^{2+} iyonlarının olduğu da belirtilmiştir [90]. Benzer şekilde, L–adrenalin'in amin ve hidroksil grupları vasıtasıyla Fe^{2+} iyonlarını bağlamaktadır. İki resveratrol molekülü de hidroksil grupları üzerinden Fe^{2+} iyonlarını bağlamaktadır (Şekil 2.26). Resveratrol Fe^{2+} iyonları için belirgin bir kapasite gösterir, bu da bir peroksidasyon inhibitörü olarak ana etkisinin, onun demir bağlama kapasitesi ile ilişkili olabileceğini gösterir.



Şekil 2.26: Ferrozin'den önce iki resveratrol molekülünün bir Fe^{2+} iyonu ile şelat kompleksi oluşturması.

Bu yöntemde resveratrol ferro–ferrozin kompleksinin oluşumuna etki etmektedir. Bu, resveratrolün iyi bir şelatlama aktivitesine sahip olduğunu ve ferrozin'den önce Fe^{2+} iyonlarını yakalayabildiğini göstermektedir.

2.3.8.4. Tiyobarbiturik Asit (TBA) Yöntemi

Tiyobarbiturik asit malonaldehit organik bileşiktir. ROS doymamış lipitleri bozarak malondialdehid (MDA) oluşturur ve bir organizmada oksidatif stres düzeyini ölçmek için bir biyobelirteç olarak bu aldehitin üretimi kullanılır [113]. Glikasyon son ürünlerine benzer şekilde, bu bileşik reaktif bir aldehittir ve hücrelerde toksik strese neden olan ve gelişmiş lipoksidasyon son ürünleri olarak adlandırılan kovalent protein katkı maddelerini oluşturan çok sayıda reaktif elektrofilik türden biridir [114].

2.3.9. Krosin Beyazlatma Yöntemi

Krosin beyazlatma yöntemi ilk olarak Lussignoli ve ark. tarafından geliştirilen klorometrik bir yöntemdir [73]. Tekli bileşenleri analiz etmenin yanında kompleks yapıları da analiz etmekte kullanılabilmektedir. Çok sık olarak kullanılmayan bu metot, diazo bileşenlerinin sıcaklıkla bozunması sonucunda ortaya çıkan peroksi radikallerinin karatenoid krosini tarafından

beyazlatma derecesini paralel reaksiyonlarla karşılaştırma yoluyla ölçer. Bu metot çözücüler değiştirerek lipofilik bileşenlerin yanında hidrofilik bileşenlere de uygulanabilir ve antioksidan kapasite daha sonra α–tokoferol veya troloks C ile göreceli olarak hesaplanır [115].

2.3.10. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi

Toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) yöntemini ilk olarak Winston ve ark. kullanmış olup [116] sonraları birçok araştırmacı tarafından bitki dokularında antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu analiz alfa–keto–γ–methiobutirik asidin (KMPA) oksidasyonunun peroksi radikalleri tarafından üretilen AAPH'dan etilene üretilmesini temel alır. Oluşan etilen formasyonu (bu formasyon antioksidanların varlığında kısmi olarak bir şekilde engellenir) reaksiyon hücresindeki head space'in gaz kromotografisi analizleri sayesinde izlenir.

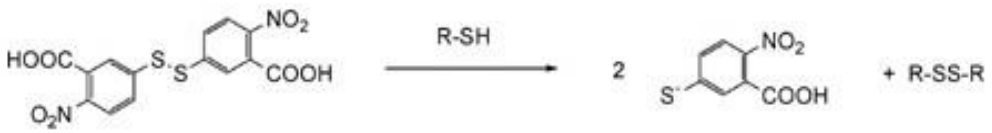
2.3.11. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler

Ghiselli ve ark. [60] tarafından 1994 yılında yayınlanan bu yöntemin bir kısmı daha önce Glazer [61] tarafından 1990 yılında ifade edilmiştir. Glazer, peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikallerini oluşturmak için Cu(II)–askorbat, yükseltgenebilir substrat olarak B– veya R–PE kullanmıştır. B– veya R–PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla doğrusal olarak azaldığı belirtilmiştir. Bir numunedeki antioksidanların, peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı tam koruma süresi troloksun sağladığı tam koruma süresine oranlanarak troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Yeni bir yöntem olarak yayınlanan Ghiselli'nin yönteminde Glazer'ın geliştirmiş olduğu yönteme atıf yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada R–PE floresansındaki azalmanın floresansın %80 tamamlanana kadar zamanla doğrusal olarak azaldığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma Cao ve ark. tarafından tekrar yapıldığında aynı sonuçlar alınamamıştır [117].

2.3.12. Ellman Yöntemi

Bu yöntemde tiyol grupları Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB (5,5'–ditiyo–bis(2–nitrobenzoik asit)) ile kantitatif olarak türevlendirilirler ve reaksiyon sırasında eşdeğer miktarda 5–tiyo–2–nitrobenzoik asit serbest kalır (Şekil 2.27). Oluşan sarı renkli ürünün

absorbansı 412 nm de ölçülür. Hızlı ve çok yönlü bir yöntem olmasına karşılık yöntemin çeşitli kısıtlamaları vardır. DTNB reaktifi tiyol bileşiklerinden yalnızca –SH içerenlerle reaksiyon verebilir, reaksiyon hızı tiyol grubunun pKa ve pH değerleri ile yakından ilişkilidir. Bunun anlamı reaksiyonun normal olarak en az pH 7 de olması demektir. Ancak bu pH değerinde tiyolat anyonu alkilasyon ya da oksidasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonlar verebilir. Ellman yöntemi suda çözünebilir küçük tiyol grupları için oldukça iyi sonuç vermekle beraber protein sülfhidrilleri ile reaksiyon sıklıkla yüksek polarite ve Ellman reaktifinin eksi yükü nedeniyle engellenmektedir [118]. Bu nedenle Ellman yönteminin tiyol içerdiği bilinen protein örneklerine uygulanmasında yöntemde bir takım modifikasyonlar yapıldığı çeşitli literatürlerde görülmektedir. Örneğin Sava ve ark. β–laktoglobulin tayininde yöntemi çeşitli şekillerde modifiye ederek kullanmışlardır [119].



Şekil 2.27: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında 5–tiyo–2–nitrobenzoik aside dönüşümü.

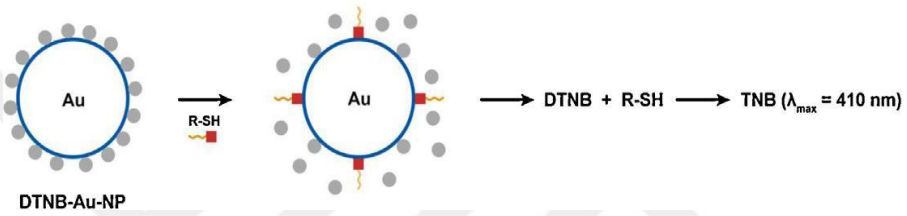
2.3.13. Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri (Tiyosiyanat Yöntemleri)

Bu yöntem gıda ve tıbbi biyoaktif bileşenler için bir parametre olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite tayini bir bileşiğin lipid peroksidasyonu gibi oksidatif bozunmayı önleme yeteneği olarak tanımlanmaktadır [51]. Lipit peroksidasyonu, herhangi bir sayıda karbon–karbon çift bağı içeren lipitlerin oksidatif bozulması olarak tanımlanabilir. Genel olarak, bir biyoaktif bileşiğin olası etkisinin belirlenmesi için bir linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu kısıtlama eğilimi test edilmiştir. Linoleik asitin oksidasyonu, ikincil oksidasyon ürünlerine ayrışan linoleik asit hidroperoksitler üretir. Yapılan bir çalışmada lipit oksidasyonunun başlangıç aşamasında peroksit seviyesini ölçmek için tiyosiyanat yöntemi kullanılmıştır [77]. Fe^{3+} oluşturmak için Fe^{2+} ile reaksiyona giren linoleik asit oksidasyonu sırasında peroksitler oluşur. Oluşan iyonlar tiyosiyanat (SCN^-) ile bir kompleks oluşturur ve bu kompleks 500 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Antioksidanların varlığında linoleik asitin oksidasyonu yavaş olacağından tiyosiyanat oluşumundan dolayı renk gelişimi yavaş olur.

Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunun uzun zamandan beri çeşitli patolojik sonuçlara yol açabilen toksikolojik bir olgu olduğu düşünülmektedir [120]. Elde edilen lipid hidroperoksitler, membran akışkanlığını ve membran proteinlerinin işlevini etkileyebilir. Ek olarak, lipid hidroperoksitler serbest radikal aracılığıyla gerçekleşen lipit peroksidasyonunun bir zincir reaksiyonunu tetikleyen epoksialkil peroksil radikallerini oluşturmak üzere tek elektronlu bir indirgeme ve oksijenasyona uğrayabilir. Lipit peroksidasyonunun son ürünleri, çoğu hücre için oldukça toksik olan 4–hidroksil nonenal ve malondialdehid gibi reaktif aldehidlerdir [121]. Bunların haricinde lipid peroksidasyonu ile üretilen reaktif aldehidler de proteinler ve DNA gibi diğer hücresel moleküllere saldırmasıyla hücresel membranlardaki ilk hasar yayılabilir ve diğer makromoleküllerde çeşitli hasarlar oluşabilir. Oksidatif strese bir organizmanın dayanabilmesinin nedeninin oksidanların detoksifikasyonu olduğu görülmektedir [122]. Bu nedenle antioksidanlar lipit peroksidasyonunun inhibisyonunda veya serbest radikallerin hücresel zarara karşı korunmasında hayati bir rol oynar.

Üzerinde DTNB (5,5'–ditiyo–bis–(2–nitrobenzoik asid) adsorplanmış AuNPs'in (DTNB–AuNPs) oluşturduğu sol çözeltisi kullanarak yeni bir spektrofotometrik tiyol tayin yöntemi geliştirilmiştir [123]. Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB çözelti fazında serbest sülfhidril gruplarının kantitatif belirlenmesinde kullanılan suda çözünür bir bileşiktir. DTNB, bir disülfür karışımı ve pH 7.27'de sarı renkli dianyon formunda bulunan ve 412 nm dalgaboyunda $1.415x10^{-4}$ L $mol^{-1}cm^{-1}$ molar absorpsiyon katsayısına sahip 5–tiyo–2–nitrobenzoat (TNB^{2-}) vermek üzere serbest bir sülfidril grubuyla reaksiyona girer. Bu nedenle nötral pH'da –SH gruplarına karşı özgüllüğü, yüksek molar absorpsiyon katsayısı ve reaksiyon süresinin kısalığı açılarından önemli bir tiyol tayin reaktifi olan DTNB, Au–NP'lerin modifikasyon aracı olarak seçilmiştir. Nanoparçacık yüzeyindeki kimyasal etkileşimlerin (yani Au–NP'lerin yüzeyinde DTNB desorpsiyonu ile elele yürüyen tiyol adsorpsiyonu, yüzey elektrostatik çift–tabakası değişen NP'lerin agregasyonu ve desorbe olan DTNB ile adsorplanan tiyoller arasındaki TNB kromoforu oluşturma tepkimesi olaylarının bütününün) hem soğurma dalgaboyunu değiştirmesi (yani kırmızı ya da maviye kayma), hem de çözelti fazındaki TNB sönüm katsayısını çok daha arttırarak tayin duyarlılığını yükseltmesi beklenmiştir. Öncelikle altın nanoparçacıklar Turkevich ve Frens [124] yöntemlerine göre, indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat varlığında altın (III) bileşiklerinin altın atomlarına indirgenmesiyle sentezlenmiştir. Bu yöntem parçacık yüzeylerindeki sitratların gevşek kabuğundan dolayı istenen liganlarla kolayca yer

değiştirebilmesinden dolayı sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [125]. İkinci aşamada toksik olmayan ve kararlı, tiyollere karşı yüksek bir afinite ve bağlanma kapasitesi gösteren DTNB [126] bağlı Au–NP'ler hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemde DTNB–Au–NP probunun duyarlılığı artırması ve tiyol değişim reaksiyonunun özgünlüğü kullanılarak biyotiyollerin diğer antioksidanlar arasından seçimli olarak tayini mümkün kılınmıştır. Geliştirilen altın nanoparçacık esaslı DTNB–Au–NP yönteminin [123] esası, trisodyum sitrat indirgemesiyle sentezlenen Au–NP'lere DTNB adsorbe edilerek hazırlanan DTNB–Au–NP'lerin tiyol antioksidanı varlığında oluşan TNB absorbansının 410 nm dalgaboyunda ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.28).



Şekil 2.28: DTNB–Au–NP'nin tiyol bileşiği ile reaksiyonunun şematik gösterimi.

2.3.14. Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite (SNPAC) Yöntemi

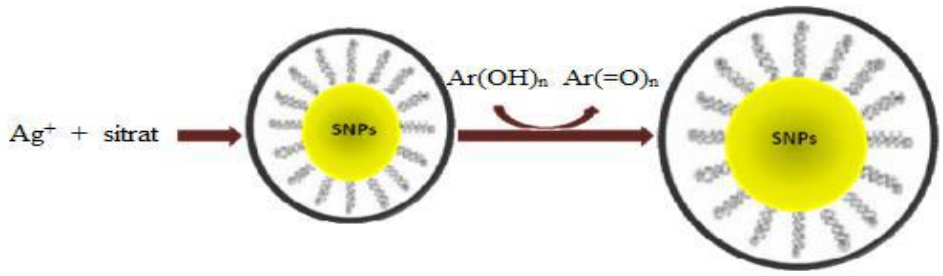
Polifenolik bileşiklerin, bu bileşiklerin sentetik karışımlarının ve gerçek örneklerin (meyve suları, bitki çayları gibi gıda örneklerinin) toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için gümüş nanoparçacık esaslı bir yöntem geliştirilmiştir. Polifenolik bileşiklerin Ag (I) iyonu indirgeyebilme yeteneği ölçülmesi sebebiyle yöntem SNPAC yani "Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite" yöntemi olarak adlandırılmıştır [18]. Geliştirilen SNPAC yönteminde tek gümüş nanoparçacıklar Ag (I) iyonlarının trisodyum sitratla kimyasal olarak indirgenmesi sonucu hazırlanır. Bu prosesin ikinci aşamasında, ikincil indirgeyici ajan olarak kullanılan polifenoller Ag (I) iyonlarının gümüş çekirdeklerine (Ag0) indirgenmesi ve çekirdek–kabuk halindeki AgNP'lerin oluşumu için ortama ilave edilir. Son olarak meydana gelen çekirdek–kabuk halindeki AgNP'ler karakteristik SPR absorpsiyonu gösterir. Geliştirilen yöntemin bulguları, polifenol (veya vitamin) gibi antioksidan ortamındaki nanoparçacık oluşumunda optik özelliklerin ilgili bileşiklerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılı olduğunu göstermiştir. SNPAC yönteminin ilk aşamasında $AgNO_3$ trisodyum sitratla indirgenerek küçük boyutlu, küresel AgNPs (ortalama çap = 66 nm) sentezlenir.

$$2\ Ag^{+} + (CH_2COONa)–C(OH)(COONa)–(CH_2COONa) \longrightarrow 2\ Ag^{0} + (CH_2COONa)–CO–(CH_2COONa) + Na^{+} + H^{+} + CO_2\uparrow \quad (2.17)$$

İkinci aşamada, sentezlenen AgNP'lere polifenolik bileşiğin ilave edilmesiyle, Ag (I) iyonları 423 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon gösteren renkli AgNP'lere (çekirdek–kabuk oluşumu) indirgenirken, polifenollerin reaktif Ar–OH grupları ilgili bileşiğin kinonlarına yükseltgenir (Standart potansiyel, E°, fizyolojik açıdan önemli antioksidanlar için: 0.2–0.6 V, E° Ag(I)/Ag = 0.8 V).

$$n\ Ag^{+} + Ar(OH)_n \longrightarrow n\ Ag^{0} + Ar(=O)_n + n\ H^{+} \quad (2.18)$$

Toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı SNPAC yönteminin esası, trisodyum sitratla sentezlenen gümüş nanoparçacıkların polifenolik bileşik ortamında büyümesine ve bu büyüyen nanoparçacıkların (çekirdek–kabuk oluşumu) plazmon absorbansının 423 nm dalgaboyunda ölçümüne dayanmaktadır. Bu şekilde polifenol ortamında büyümüş gümüş nanoparçacıkların optik özellikleri, ilgili fenolik asitlerin antioksidan kapasitesiyle doğru orantılıdır.



Şekil 2.29: Sentezlenen AgNPs'in antioksidanlarla (Ar(OH)n) reaksiyonu [18].

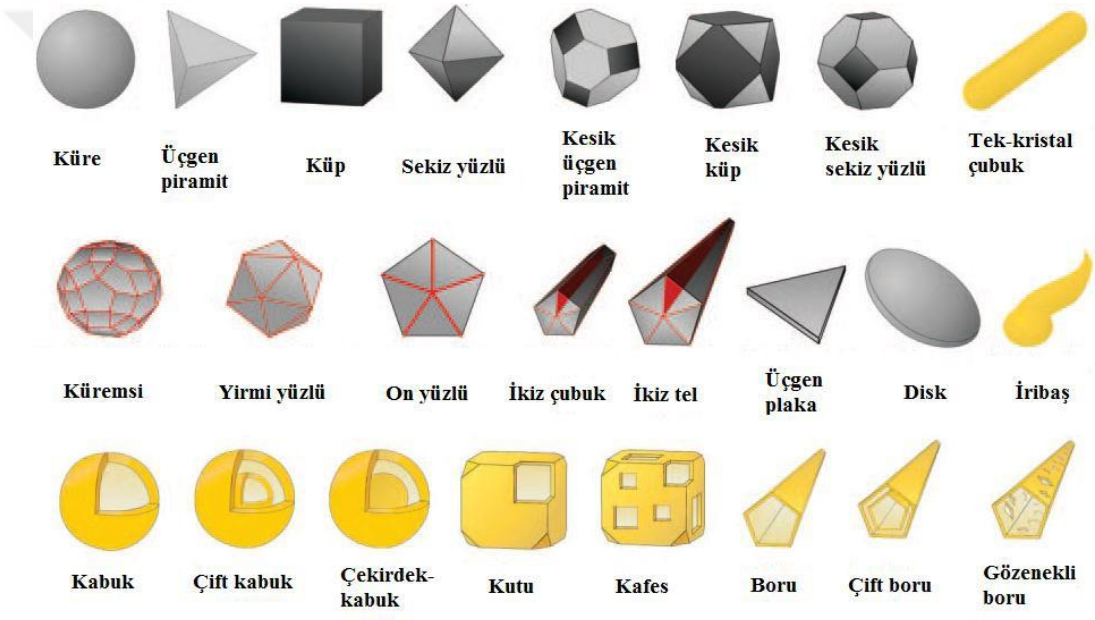
2.4. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji 1–100 nm boyutlardaki tanecikli yapıların tasarım, sentezlenmesi ve organizasyonunu kapsayan önemli ve güncel araştırma sahalarından biridir. Nanoparçacıklar (NPs) sağlık, kozmetik, gıda, yem, çevre, mekanik, optik, biyomedikal bilimler, kimya endüstrisi, elektronik, uzay sanayisi, enerji bilimleri, optoelektronik, katalizörler ve elektrokimyasal uygulamalar gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [127]. Nanometre

boyut aralığında tek bir kristal katı parçacık nanokristal olarak adlandırılmaktadır. Bir nano boyutlu malzeme, nanometre boyut aralığında herhangi katı bir malzemedir ve bunlar tek boyutlu (ince tel), iki boyutlu olanlar (ince film) ve üç boyutlu (parçacık) olabilir [128].

2.4.1. Nanoyapılar

Farklı şekil ve boyutlarda nanoyapılar sentezlenebilir ve böylelikle özellikleri kontrol altına alınabilir. (Şekil 2.30). Birinci sıradaki şekiller tek kristallerdir. İkinci sıradaki şekiller düzensiz dizilişteki parçacıklardır. Üçüncü sıradaki şekiller ise kabuk ve boru şeklindeki nanoyapılı malzemelerdir [129].



Şekil 2.30: Nanoyapı şekillerinin şematik olarak gösterimi [18].

2.4.2. Soy Metal Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar gösterdikleri üstün özellikler sayesinde birçok endüstriyel alanda kullanıma sahiptirler. Nano boyutta parçacıkların özelliklerinin bilinen nedenleri; kuantum boyut etkileri, elektronik yapının boyuta bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranıdır [130].

Soy metal nanoparçacıklar ve bunların yüzey plazmon rezonans absorpsiyonundan kaynaklanan renkleri geniş bir araştırma alanı oluşturur. Nanoparçacığın rengi,

nanoparçacığın boyutuna, şekline ve bunların etrafını çevreleyen ortamın dielektrik sabitine bağlıdır. Nanoparçacığın boyutu veya şekli değiştiğinde gözlenen renk de değişir. Altın küreler karakteristik bir kırmızı renge sahipken gümüş küreler sarı renklidir. Son çalışmalar göstermiştir ki renk, yüzey plazmon titreşimi olarak bilinen iletim bandındaki elektronların kolektif osilasyonundan kaynaklanmaktadır. Osilasyon frekansı, altın ve gümüş için genellikle güçlü yüzey plazmon rezonans absorpsiyonuna neden olur [6].

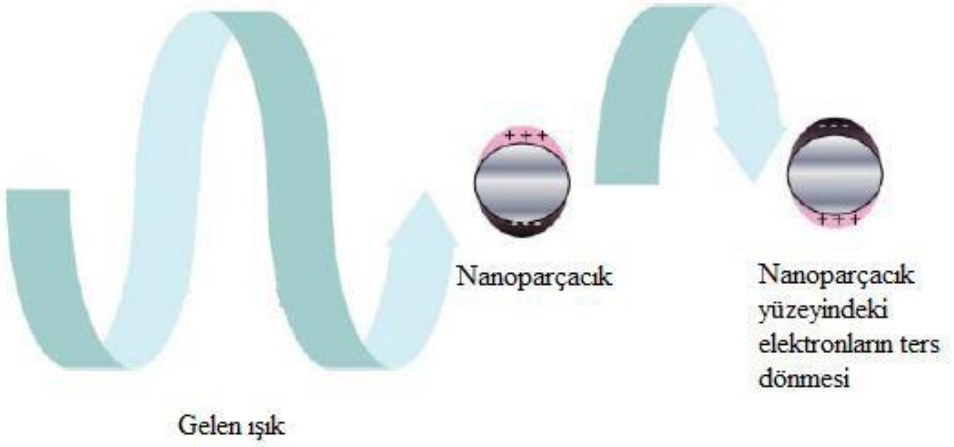
NPs'in kendilerine özgü özelliklerinden yararlanılan kimyasal analizler ve algılama yöntemleri yoğun olarak çalışılan bir araştırma alanıdır. NPs'in büyüklüğü, şekli ve aglomerasyonun kapsamını basitçe ayarlandığında boyutlara bağlı özel termal, mekanik, optik, elektrik, manyetik ve biyolojik özelliklere sahip olur. Gıda endüstrisi ve araştırma amaçlı yeni sensörler ve biyosensörlerin geliştirilmesi nanobiyoteknoloji ve nanomateryal bilimi için temel alanlardan biridir. Son yıllarda gıda örneklerinin antioksidan kapasitesi ve toplam plifenol içeriğini bulmak için yeni analitik yaklaşımlar denenmiştir. Özellikle basit ve göreceli olarak pahalı olmayan enstrümantasyon gerektiren duyarlılık, hızlılık, küçük örnek hacimleri gerektiren ve araştırma kaynaklarının kullanımını rasyonalize etmeyi amaçlayan yöntemlere özel ilgi gösterilmiştir. Bu açıdan NPs ve işlevselleştirilmiş NPs katalitik araçlar, immobilizasyon platformları veya daha yüksek hassasiyet, stabilite ve seçicilik gerektiren biyoalgılama performansını geliştirmek için optik veya elektroaktif gösterge olarak kullanılırlar [131].

2.4.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

Bir metaldeki (ya da katkılanmış yarı iletkendeki) iletim elektronlarının toplam osilasyonu plazmonik davranış olarak tanımlanır [132]. Metallerin çoğu; özellikle alkali metaller ve altın ve gümüş gibi soy metaller, elektronik ve optik özellikleri açısından sadece iletim elektronlarıyla belirlenen serbest elektron sistemleri olarak görülebilir. Drude–Lorentz modelinde böyle bir metal, eşit sayıda pozitif iyon (sabit pozisyonda) ve iletim elektronu (serbest halde ve oldukça hareketli) içerdiğinden plazma olarak ifade edilir. Elektromanyetik dalga ışıması altında serbest elektronlar, bir plazma frekansında tutarlı bir şekilde salınım yapmak üzere elektrik alan tarafından harekete geçirilirler. Kuantize plazma osilasyonları plazmon olarak adlandırılır. Metal yüzeyini etkileyen bir elektromanyetik dalga belli bir nüfuz etme derinliğine sahip olduğundan (Ag ve Au için 50 nm'nin altında), sadece yüzeydeki elektronlar önem teşkil eder. Bu elektronların kolektif osilasyonları yüzey plazmon

polaritonları (SPPs) olarak isimlendirilir fakat çoğunlukla yüzey plazmonları (SPs) olarak ifade edilir [129].

Nanoparçacık boyutundan daha büyük bir dalgaboyunda ışıma geldiğinde rezonans olayı meydana gelir. Yüzey plazmon osilasyonuyla birlikte rezonanstaki ışık metaldeki serbest elektronların osilasyonuna neden olur. Rezonans olayı, absorpsiyon ve saçılma spektroskopisiyle belirlenir ve şekil, boyut ve hem metal hem de etrafındaki malzemenin dielektrik sabitine bağlı olarak bulunur ve yüzeyde meydana geldiği için yüzey plazmon rezonansı (SPR) olarak ifade edilir (Şekil 2.31). Meydana gelen bu olayda, parçacık gelen ışığın dalga boyundan çok daha küçük olmalıdır. Gelen ışığın elektrik alanı, delokalize elektronların metal nanoparçacıktan uzakta bir doğrultuda yer değiştirmesiyle metal nanoparçacıkta bir elektrik dipole neden olur ve böylece bir kenarda net negatif bir yük oluşur. Negatif yükün karşısındaki kenar net pozitif bir yüke sahiptir [129].



Şekil 2.31: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı.

Nanoparçacığın çevresindeki malzemenin dielektrik sabitinin değişmesi, nanoparçacıklardan yük yoğunluğunu sağlayarak yüzeyin değişebilmesi nedeniyle osilasyon frekansını etkileyecektir. Çözücünün değişmesi dielektrik sabitini değiştirecektir fakat kaplama malzemesi plazmon rezonansındaki kaymanın belirlenmesinde en önemli etkendir. Kimyasal olarak bağlı moleküller, yüzey plazmon absorpsiyon maksimumunda bir kaymaya neden olan yüzeydeki elektron yoğunluğunda meydana gelen değişimin gözlenmesiyle tayin edilebilir. Bu ise soy metal nanoparçacıkların hassas sensörler olarak kullanılmasında esastır [6].

Drude modeli ve Mie teorisi yüzey plazmon bandının ve bu bandın pozisyonu, şiddeti ve genişliğini belirleyen faktörlerin tanımlanmasında kullanılır [133]. Işığın küresel metal parçacıklarla etkileşimleri Mie teorisiyle tanımlanabilir. Bu teori aynı zamanda kolloidal metal parçacıklar üzerine uygulanan ışığın bir kısmının absorbe edileceğini ve bir kısmının da saçılacağını öngörür. Absorpsiyon ve saçılmanın toplamı, yüzey plazmon bandı (SPB) veya plazmon absorbansı olarak bilinen ışığın absorpsiyonudur [134]. Yüzey plazmon absorbansının şiddeti, parçacık boyutuna bağlı band genişliğine ve bandın pozisyonuna bağlıdır.

Soy metal nanoparçacıklar, lokalize yüzeye duyarlı spektral cevap verebilmesi, ışık sinyalinin gözlemlenebilme kolaylığı ve güçlü ışık saçılması ve absorpsiyonundan kaynaklanan yüzey plazmon absorpsiyonları sayesinde kimyasal ve biyolojik tayinlerde birçok uygulama alanı bulmuştur [129]. Rezonans dalgaboyundaki ilgili kayma olarak tanımlanan spektral duyarlılık, yüzey plazmon absorpsiyonunun pozisyon ve genişliğine ayrıca metalin cinsine ve parçacıkların şekline bağlıdır. Gümüş, altına göre yüzeyin çevresine karşı daha duyarlıdır. Nanoçubuklar ise nanokürelerden plazmon absorpsiyon bandlarının daha kuvvetli ve keskin olması açısından daha iyidir [135].

2.4.4. Gümüş Nanoparçacıklar

Gümüş nanoparçacıklar (AgNPs) sahip oldukları kendilerine özgü özellikler sebebiyle antimikrobial uygulamalar, biyosensör materyalleri, kompozit fiberler, kriyojenik süper iletken materyaller, kozmetik ürünleri ve elektronik malzemelerde kulanılmaya başlanmıştır. AgNPs'in sentezlenmesi ve stabilize edilmesine ilişkin kullanılan birçok fiziksel ve kimyasal yöntem vardır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: AgNPs sentezlemek ve stabilize etmek için kullanılan bazı önemli fiziksel, kimyasal ve fotokimyasal yöntemler [136, 137].

Yöntem	Başlangıç Maddesi	İndirgen Madde	Stabilizitör	Boyut (nm)
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	DMF	–	< 25
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	$NaHB_4$	Sürfaktin	3 – 28
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	Trisodyum sitrat (başlangıçta) + SFS (ikinci aşamada)	Trisodyum sitrat	< 50
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	Trisodyum sitrat	Trisodyum sitrat	30 – 60
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	Askorbik asit	–	200 – 650
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	$NaHB_4$	DDA	**7**
Kimyasal indirgeme	$AgNO_3$	Parafin	Oleylamin	10 – 14
Kimyasal indirgeme (termal)	$AgNO_3$	Dekstroz	PVP	22 ± 4.7
Kimyasal indirgeme (termal)	$AgNO_3$	Hidrazin	–	2 – 10
Kimyasal indirgeme (glukozun oksidasyonu)	$AgNO_3$	Glukoz	Glukonik asit	40 – 80
Kimyasal indirgeme (poliol prosesi)	$AgNO_3$	Etilen glikol	PVP	5 – 25
Elektrokimyasal (poliol prosesi)	$AgNO_3$	Katot: Ti Anot: Pt	PVP	~11
Kimyasal indirgeme (Tollen)	$AgNO_3$	m–Hidroksi benzaldehit	SDS	15 – 260
Fiziksel yolla sentez	Ag tel	Elektriksel ark boşalımı, su	–	~10
Fiziksel yolla sentez	$AgNO_3$	Elektriksel ark boşalımı	Sodyum sitrat	14 – 17
Kimyasal indirgeme (Mikroemülsiyon)	$AgNO_3$	Hidrazin hidrat	AOT	2 – 5
Fotokimyasal redüksiyon (*puls* radyolizi)	$AgClO_4$	Etilen glikol	–	17 – 70
Fotokimyasal redüksiyon (mikrodalga)	$AgNO_3$	Etilen glikol	PVP	5 – 10
Fotokimyasal redüksiyon (fotoredüksiyon)	$AgNO_3$	UV ışık	–	4 – 10
Fotokimyasal redüksiyon (X ışını radyolizi)	Ag_2SO_4	X ışını	–	~28
Fotokimyasal redüksiyon (X ışını radyolizi)	$AgNO_3$	CMCTS, UV	CMCTS	2 – 8

Organik veya inorganik ajanların kullanılması, elektrokimyasal teknikler, fizikokimyasal indirgeme ve radyoliziz gibi yöntemler AgNPs'in sentezinde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemlerin çoğu hala geliştirilme aşamasındadır ve genel olarak karşılaşılan problemler nanoparçacıkların düşük stabiliteye sahip olması, agregasyona uğraması, kristal gelişimi, morfolojisi, boyutu ve boyut dağılımıyla ilgilidir. Bunların yanında nanoparçacıkların farklı

uygulamalarda kullanımı için ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinin geliştirilmesi konusu da önemlidir.

2.4.5. Gümüş Nanoparçacıkların (AgNPs) Sentezi

Son birkaç yıl içinde AgNPs'in sentezine ilişkin birçok yöntem geliştirilmiştir [5]. Bunlar genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyo–temelli yöntemler olarak üçe ayrılır.

2.4.5.1. Fiziksel Yöntemler

Buharlaştırma–sıvılaştırma ve lazer ablasyon en çok kullanılan fiziksel yöntemlerdir. Kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında hazırlanan ince filmlerde çözücü kontaminasyonu sorunu olmaması ve nanoparçacıkların dağılımının tekdüze olması en önemli avantajlarıdır. AgNPs'in sentezinde atmosferik basınçta çalışılarak tüp biçimli fırın kullanımı tüp biçimli fırının büyük hacim kaplaması, büyük miktarda enerji tüketimi olması ve termal stabilitenin sağlanması için çok uzun süre gerektirmesi nedenleriyle çeşitli dezavantajlara sahiptir [137, 138]. AgNPs sentezi lokal bir ısıtma alanına sahip olan ufak bir seramik ısıtıcı kullanılarak da gerçekleştirilmiştir [139]. Bu seramik ısıtıcı materyallerin buharlaştırılmasında kullanılmış olup ısıtıcı yüzeyine yakın alandaki sıcaklık gradientinin tüp fırınınkine göre çok daha fazla olması sebebiyle oluşturulan buhar daha uygun bir hızda soğuyabilmektedir. Böylece yüksek konsantrasyonda ve küçük boyutta nanoparçacıkların eldesi mümkün olmaktadır. Bu fiziksel yöntem, bir nanoparçacık jeneratörü olarak kulanılıp uzun süre gerektiren inhalasyon toksisite çalışmalarında veya nanoparçacık ölçüm ekipmanlarının kalibrasyonunda kullanılabilir [139]. Bu yöntemde elde edilen AgNPs'in geometrik ortalama çapı ve geometrik standart sapması sırasıyla 6.2–21.5 nm ve 1.23–1.88 nm aralığındadır.

AgNPs çözelti içindeki metalik malzemelerin lazerle ablasyonu yolu ile de sentezlenebilirler [140-142]. Ablasyon verimi ve elde edilen nano–gümüş parçacıkların özellikleri metalik hedefe gönderilen lazerin dalga boyu, lazer darbelerinin süresi (femto, piko ve nanosaniyede rejim), lazer akıntısı süresi, ablasyon süresi ve sürfaktanların varlığında veya yokluğunda kullanılabilen sıvı ortamın etkileri gibi birçok parametreye bağlıdır [143, 144]. Metal kolloidlerin üretimi için kullanılan diğer yöntemlere kıyasla lazer ablasyon tekniğinin önemli bir avantajı, solüsyonlardaki kimyasal reaktiflere gerek duyulmamasıdır. Bu nedenle, başka uygulamalar için saf ve kontamine olmamış metal kolloidler bu teknik kullanılarak hazırlanabilir [145]. Küre şekilli gümüş nanoparçacıklar (20–50 nm), 800 nm'de femtosaniye

lazer darbeleri ile suda lazer ablasyonu ile Tsuji ve ark. tarafından elde edilmiştir. Oluşum verimi ve kolloidal parçacıkların büyüklüğü, nanosaniye lazer darbeleriyle hazırlanan kolloidal parçacıklarınkiyle karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, femtosaniye darbeleri ile elde edilen oluşum verimliliği nanosaniye darbeleriyle elde edilene göre daha düşük olduğu görülmüştür. Ancak femtosaniye darbeleri ile hazırlanan kolloidlerin boyutu nanosaniye darbeleri ile hazırlanan kolloidlere göre daha az dağılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada sudaki femtosaniye ablasyon için ablasyon veriminin havaya göre daha düşük olduğu, nanosaniye atımları durumunda ise ablasyon veriminin hem su hem de havada benzer olduğu bulunmuştur. Tien ve ark. ilave surfaktanlar içermeyen deiyonize suda AgNPs süspansiyonu elde etmek için ark deşarj yöntemini kullanmışlardır [146]. Bu çalışmada gümüş teller (1 mm) deiyonize suya daldırılmış ve elektrot olarak kullanılmıştır. Gümüş çubuk tüketim hızı 100 mg / dk iken, yaklaşık 10 nm büyüklüğünde metalik AgNPs ve iyonik AgNPs sırasıyla 11 ppm ve 19 ppm konsantrasyonlarda çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir.

Siegel ve ark. AgNPs sentezini, sıvı ortama doğrudan metal püskürtme yaparak gerçekleştirmiştir [147]. Yöntem propan–1,2,3–triol (gliserol) içine metalin fiziksel olarak hızlıca biriktirilmesine dayanır ve zaman alan ve ıslak bazlı diğer kimyasal sentez tekniklerine ilginç bir alternatif sunmaktadır. Elde edilen AgNPs yuvarlak şekle sahiptir ve ortalama çap yaklaşık 3.5 nm olup standart sapması ise 2.4 nm'dir. Ayrıca, çalışmada AgNPs boyut dağılımının ve tekdüze partikül dispersiyonunun, 1:20 gliserol–su oranına kadar seyreltilmiş sulu çözeltiler için değişmeden kaldığı gözlenmiştir.

2.4.5.2. Kimyasal Yöntemler

AgNPs'in sentezi için en yaygın yaklaşım, organik ve inorganik indirgeyici ajanlar ile kimyasal indirgemedir. Genel olarak, sulu veya sulu olmayan çözeltilerde gümüş iyonlarını indirgemek için sodyum sitrat, askorbat, sodyum borohidrit (NaBH), element hidrojen, polyol işlemi, Tollens reaktifi, N, N–dimetilformamid (DMF) ve poli (etilen glikol)–blok kopolimerleri gibi farklı indirgeyici maddeler kullanılır. Bu indirgeyici maddeler gümüşü indirger ve metalik gümüşün (Ag^0) oluşumuna yol açar ve bunu oligomerik kümelere aglomerasyon izler. Bu kümeler sonunda metalik kolloidal gümüş parçacıklarının oluşumuna yol açar [129, 148, 149].

Metal nanoparçacık eldesi sırasında dispersiyona uğrayan AgNPs'i stabilize etmek ve AgNPs'e absorbe olma veya nanoparçacık yüzeylerine kimyasal yolla bağlanma yoluyla aglomerasyonlarından kaçınmak için koruyucu ajanların kullanılması önemlidir [150]. Nanoparçacıkların yüzeyleri arasındaki etkileşimleri engellenmek için çeşitli türlerde yüzey aktif maddelerin (örneğin tiyoller, aminler, asitler ve alkoller) mevcudiyeti partikül gelişimini stabilize edebilir ve partikülleri sedimantasyondan, aglomerasyondan veya yüzey özelliklerini kaybetmekten koruyabilir. Poli (vinil alkol), poli (vinilpirolidon), poli (etilen glikol), poli (metakrilik asit) ve polimetilmetakrilat gibi polimerik bileşiklerin, nanoparçacıkları stabilize etmek için etkili koruyucu maddeler olduğu bildirilmiştir. Oliveira ve ark. [150] tarafından yürütülen bir çalışmada bir Au–kompleksinin bir sulu fazdan organik faza iki fazlı (sıvı–sıvı sistemdeki) faz transferi, sonrasında stabilize edici ajan olarak dodekanethiol varlığında sodyum borohidrid ile indirgenmesi yoluyla AgNPs yüzeylerine bağlanması ve bunların agregasyonunu önleyip bazı çözücüler içinde çözünür hale getirmeye dayanan Brust prosedürüne [151] göre dodekanethiol–kaplanmış AgNPs hazırlanmıştır. Bu çalışmada faktörlerdeki küçük değişikliklerin, nanoparçacık yapısında, ortalama büyüklüğünde, boyut dağılım genişliğinde, stabilitede ve kendiliğinden birleşme modellerinde dramatik modifikasyonlara yol açtığını bildirilmiştir.

Kim ve ark. [152] poliol prosesi ve modifiye prekürsör enjeksiyon tekniği kullanılarak kontrol edilebilir boyut ve yüksek monodispersite ile küresel AgNPs sentezinin yapılabileceğini tespit etmişlerdir. Prekürsör enjeksiyon yönteminde, enjeksiyon oranı ve reaksiyon sıcaklığı, daha küçük boyutlu, eşit boyutlu AgNPs üretilmesi için önemli faktörlerdir. 17 ± 2 nm büyüklüğünde AgNPs 2.5 mL/s'lik bir enjeksiyon oranında ve 100 °C'lik bir reaksiyon sıcaklığında elde edilmiştir. Prekürsör çözeltisinin sıcak bir çözeltiye enjeksiyonu, hızlı nükleasyonun kısa sürede indüklenmesi için etkili bir araçtır ve daha küçük boyutlu ve daha dar bir boyut dağılımı ile AgNPs üretilmesini sağlamaktadır.

Zhang ve ark. [153] gümüşün kolloidlerini üretmek için terminal dimetilamin gruplara (HPAMAM–N (CH)) sahip bir hiper dallı poli (metilen bisakrilamid aminoetil piperazin) kullandılar. HPAMAM–N (CH) içerisindeki tersiyer amin grupları ve hiper–dallı yapı içeren amid kısımları (piperazin halkaları) poli (metilen bisakrilamid aminoetil piperazin)'in etkili bir stabilizasyon ve indirgeme kabiliyeti göstermesi için önemlidir.

Chen ve ark. [154] basit oleylamin–sıvı parafin sistemini kullanarak monodispers AgNPs elde edilebilineceğini göstermiştir. Yapılan çalışmada AgNPs oluşum sürecinin üç aşamaya ayrılabileceği bildirilmiş olup bunlar büyüme, inkübasyon ve Oatwald olgunlaşma aşamalarıdır. Yöntemde kullanılan parafinin kaynama noktası 300 °C olması daha geniş bir reaksiyon sıcaklığı aralığı sağlar ve çözücüyü değiştirmeden tek başına ısıtma sıcaklığını değiştirerek AgNPs boyutunu etkili bir şekilde kontrol etmeyi mümkün kılar. Buna ek olarak, kolloidal gümüş nanoparçacıkların büyüklüğü sadece ısıtma sıcaklığını veya olgunlaşma süresini değiştirerek değil, aynı zamanda oleylaminin gümüş prokürsörüne oranını ayarlayarak da düzenlenebilir. İstenirse AgNPs, indirgeme ve stabilize edici olarak işlev gören indirgenmiş polioksometalatlar ile metal iyonlarının basit bir şekilde karıştırılmasıyla oda sıcaklığında bile hazırlanabilir.

AgNPs sentezi için sitrat, polivinilpirrolidon, poli (akrilik asit) ve kollajen varlığında UV ile başlatılmış foto – indirgeme yönteminin basit ve etkili bir yöntemi olduğu bildirilmiştir. Örneğin, Huang ve Yang [155] nanoparçacıkların agregasyonunun önlenmesi için stabilize edici ajan olarak görev yapan tabakalı inorganik laponit kil süspansiyonlarında gümüş nitratın foto–indirgenmesi yoluyla AgNPs üretmiştir. Üretilen AgNPs'in özellikleri, UV ışınlama süresinin bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. UV ile 3 saat boyunca ışınlandığında bimodal büyüklük dağılımı ve nispeten büyük AgNPs elde edilmiştir. Daha fazla süreli ışınlama gümüş nanoparçacıkları tek bir boyutta daha küçük boyutlara bölmüştür ancak dağıtım modu nispeten stabil bir boyut ve boyut dağılımı elde edilmiştir. Gümüş nanoparçacıklar (nanoküre, nanotel ve dendrit) poli (vinilalkol) (koruyucu ve stabilize edici ajan olarak) kullanılarak da oda sıcaklığında UV ışınlama foto–indirgeme tekniği ile hazırlanmıştır [156]. Yapılan çalışmada poli (vinilalkol) ve $AgNO_3$ konsantrasyonları nano ve dendritlerin büyümesinde önemli rol oynamıştır.

AgNPs çeşitli foto–indüklenmiş veya fotokatalitik indirgeme yöntemleri kullanılarak da sentezlenebilir. Fotokimyasal sentez, yüksek uzamsal çözünürlüğe, kullanım kolaylığına ve çok yönlülüğe sahip temiz bir süreçtir. Ayrıca, fotokimyasal sentez hücreler, emülsiyon, polimer filmler, sürfaktan miselleri, cam vb. gibi çeşitli ortamlarda nanoparçacıkların üretilmesine olanak sağlar. Ortalama 8 nm büyüklükte olan nano boyutlu gümüş parçacıkları poli (stiren sülfonat)/poli (allilamin hidroklorür) polielektrolit kapsülleri mikro–reaktör olarak kullanılarak foto–indüklenmiş indirgeme yöntemi ile hazırlanmıştır [157]. Ayrıca, gümüş

nanoküreciklerin 30–120 nm aralığında olmak istenen kenar uzunluklarına sahip üçgen nanokristallere (nanoprizma) dönüştürülmesi için foto–indüklenmiş yöntemin kullanılabileceği gösterilmiştir [158]. Parçacık büyüme süreci, nanoparçacıkların çift ışınlı aydınlatılması yöntemi kullanılarak kontrollü olarak gerçekleştirildi. Sitrat ve poli (stiren sülfonat) ise stabilize edici maddeler olarak kullanıldı. Başka bir çalışmada, 2–substitue edilmiş tiyoksanton serisinin bir alifatik amin bileşiği uyarılmış triplet durumundan (TX–O–CH–COO– ve TX–S–CH–COO–) hidrojen abstraksiyonu ile elde edilen a–aminoalkil radikalleri tarafından çok hızlı bir biçimde Ag^{+}'nın indirgenmesi yoluyla AgNPs hazırlanmıştır [159].

AgNPs sentezlemek için elektrokimyasal sentetik yöntem de kullanılabilir. Elektroliz parametrelerini ayarlayarak partikül boyutunu kontrol etmek ve elektrolitik çözeltilerin bileşimini değiştirerek AgNPs'in homojenliğini arttırmak mümkündür. Örneğin polifenilpirol kaplı gümüş nanoküreciklер (3–20 nm), sıvı / sıvı arayüzünde elektrokimyasal indirgeme ile sentezlenmiştir. Bu nano–bileşik, gümüş metal iyonunu sulu fazdan organik faza transfer ederek hazırlanmış ve burada pirol monomeri ile reaksiyona sokulmuştur [160]. Bir diğer çalışmada, dar boyutlu dağılımlara sahip küresel AgNPs (10–20 nm) sulu çözeltide elektrokimyasal bir yöntemle uygun şekilde sentezlenmiştir [161]. Bu çalışmada gümüş kümeler için stabilitör olarak poly N–vinilpirolidon seçilmiştir. Poli N–vinilpirolidon, nanoparçacıkları aglomerasyondan korur, gümüş biriktirme oranını önemli ölçüde azaltır ve gümüş nükleasyonunu ve gümüş parçacık oluşum hızını arttırır. Yöntemde döner platin katodun kullanılması katot çevresinden metalik nanoparçacıkların hızlı bir şekilde transfer edilmesinin teknolojik zorluğunu etkin bir şekilde çözerek katodun yakınında flokülatların oluşmasını engelleyerek parçacıkların tekdüze olmasını sağlar. Sodyum dodesil benzen sülfonatın elektrolitlere ilave edilmesi, partikül boyutunun ve AgNPs partikül büyüklüğü dağılımının iyileştirilmesini sağlar.

Mikrodalga destekli sentez AgNPs sentezi için ümit vaat eden bir yöntemdir. Mikrodalga ısıtma ile daha küçük boyutlarda, daha dar boyut dağılımlarında ve daha yüksek bir kristalizasyon derecesinde sürekli olarak AgNPs üretilirken, bu yöntem geleneksel bir yağ banyosundan daha iyidir [162]. Mikrodalga ısıtmanın daha kısa reaksiyon süresine sahip olması nedeniyle daha az enerji tüketimi değerleri ve oluşan parçacıkların kümelenmesini önleyen daha iyi ürün verimleri vardır [163].

2.4.5.3. Biyo–temelli Yöntemler

Literatürdeki bazı çalışmalar, nanoparçacıkların kimyasal yaklaşımlarla sentezlenmesinin ekolojik açıdan kötü sonuçlar doğurduğunu ve pahalı olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sentez yöntemlerinde toksik kimyasallar kullanılmayan çevre ve ekonomi dostu süreçlerin geliştirilmesi ihtiyacı giderek artmaktadır. Bu durum araştırmacıların organizmalarla ilgilenmelerine neden olmuştur. Nanoparçacık sentezindeki organizmalardan yararlanılması potansiyeli, basit prokaryotik bakteriyel hücrelerden ökaryotik mantarlara ve bitkilere kadar değişmektedir [164]. Nanoparçacık üretiminin bazı örnekler vermek gerekirse altın, gümüş, kadmiyum, çinko, manyetit ve demir nanoparçacık eldesi için bakterilerin; gümüş, kurşun ve kadmiyum nanoparçacık eldesi için mayaların; altın, gümüş ve kadmiyum nanoparçacık eldesi için mantarların; gümüş ve altın nanoparçacık eldesi için alglerin; gümüş, altın, paladyum, çinko oksit, platin ve manyetit nanoparçacık eldesi için bazı bitkilerin kullanılması örnek verilebilir [165].

Biyo–temeli yöntemlerde organizmaların tipleri, organizmaların kalıtsal ve genetik özellikleri, hücre büyümesi ve enzim aktivitesi için optimal koşullar, optimal reaksiyon koşulları ve seçilim gibi kritik yönlere göre değerlendirerek oldukça kararlı ve iyi karakterize edilmiş nanoparçacık sentezi için kullanılabilir. AgNPs boyutları ve morfolojileri, substrat konsantrasyonu, pH, ışık, sıcaklık, tampon mukavemeti, elektron verici (örneğin glikoz veya fruktoz), biyokütle ve substrat konsantrasyonu, karıştırma hızı ve maruz kalma süresi dâhil olmak üzere bazı kritik koşulları değiştirerek kontrol edilebilir.

AgNPs sentezinde bakterilerin kullanımı araştırılmıştır. Yüksek kararlılığa sahip AgNPs'in (40 nm) sulu gümüş iyonlarının, patojenik olmayan bir bakteri olan *Bacillus licheniformis* kültür süpernatanı ile biyolojik olarak indirgenmesi ile sentezlenebileceği bildirilmiştir. İyi dağıtılmış gümüş nanokristaller (50 nm) ise *B. licheniformis* [166] bakterisi kullanılarak sentezlenmiştir.

Saifuddin ve ark. *Bacillus subtilis* kültür süpernatantı ve suda mikrodalga ışınlanmasının bir kombinasyonu kullanılarak AgNPs'in oluşumu için yeni bir kombinasyon sentez yaklaşımı elde etmişlerdir [167]. Bu yöntemde *B. subtilis*'in supernatantlarını kullanılarak monodispers AgNPs'in (5–50 nm) ekstraselüler biyosentezini gerçekleştirilmiş ve reaksiyon oranını arttırmak ve üretilen AgNPs'in agregasyonunu azaltmak için homojen ısıtma sağlayan

mikrodalga radyasyonu kullanılmıştır. Başka bir çalışmada, *Klebsiella pneumonia, Escherichia coli* ve *Enterobacter cloacae* kültür süpernatanları ile sulu gümüş iyonlarının indirgenmesi yöntemi kullanılarak gümüşün metalik nanoparçacıklarının hızlı biyosentezi bildirilmiştir [168].

Korbekandi ve ark. *Fusarium oxysporum* kullanarak AgNPs'in biyo–redüktif sentezinin mümkün olduğunu göstermiştir [169]. Önceki araştırmacılar, *F. oxysporum* tarafından AgNPs'in kalitatif üretimini rapor ettiler, ancak reaksiyon karışımını optimize etmediler. SEM mikrograflarında AgNPs biyokütlenin yüzeyine neredeyse bitişik ve küresel, tek (25–50 nm) veya agregatlar (100 nm) şeklinde idi. Ancak metal iyonlarının indirgenmesi ve AgNPs'in stabilizasyonunun enzimatik bir işlemle gerçekleştiği doğrulandı. Öyle görünüyorki ilk adım gümüş iyonlarının *F. oxysporum* hücreleri tarafından yakalanmasını içermektedir. Bu mantarda AgNPs üretiminin yeri ile ilgili daha fazla bilgi ortaya çıkarılmış ve önceki teoriler düzeltilmiştir. Önceki çalışmaların aksine, *F. oxysporum*'daki nanoparçacık üretiminin veziküllerdeki nanoparçacıkların yutulması, taşınması ve hücrelerin dışında ekzositoz yoluyla atılması yoluyla hücre içi olduğu iddia edilmektedir.

Chaetoceros calcitrans, Chlorella salina, Isochrysis galbana ve *Tetraselmis gracilis* gibi deniz yosunları da gümüş iyonlarının indirgenmesi ve dolayısıyla AgNPs sentezlenmesi için kullanılabilir. Deniz siyanobakteri, *Oscillatoria willei* NTDM01, AgNPs'in (100–200 nm) sentezi için kullanılmıştır. Yıkanmış deniz siyanobakterileri ile inkübe edilen gümüş nitrat çözeltisi 72 saatten sonra sarı bir renge dönüşerek AgNPs oluşumunu göstermiştir. *Spirulina platensis* biyokütlesi 10 M sulu $AgNO_3$'e maruz kaldığında küresel AgNPs'in (7–16 nm) hücre dışı oluşumu pH 5.6'da ve 37 °C'de 120 saatte sonuçlanmıştır [170].

Nanoparçacıkların bitkileri kullanarak sentezi çok az maliyetlidir ve bu nedenle nanoparçacıkların büyük ölçekli üretimi için ekonomik ve değerli bir alternatif olarak kullanılabilir. *Camellia sinensis* (yeşil çay) özü AgNPs'in biyosentezi için indirgeyici ve dengeleyici bir madde olarak kullanılmıştır [171]. *C. sinensis* özünde bulunan fenolik asit tipi biyomoleküller (kafein ve teofilin benzeri moleküller) AgNPs'in oluşumundan ve stabilizasyonundan sorumludur. Ayrıca, yüksek yoğunluklu ve son derece kararlı AgNPs (16–40 nm), *Datura metel* yaprağı ekstresi ile hızlı bir şekilde sentezlenmiştir [172]. Bu bitkinin yaprak özleri gümüş iyonları ile reaksiyona girmesi için indirgeyici olarak kullanılabilecek

alkaloidler, proteinler / enzimler, amino asitler, alkolik bileşikler ve poli–sakkaritleri içeren biyomolekülleri içerir ve bu nedenle AgNPs oluşumunu yönlendirmek için kullanılır.

Song ve ark. *Pinus desiflora, Diospyros kaki, Ginko biloba, Magnolia kobus* ve *Platanus orientalis* yaprak sularının, 15 ila 500 nm arasında değişen ortalama parçacık boyutuna sahip AgNPs'i ekstraselüler olarak sentezlediklerini açıklamıştır [173]. *M. kobus* ve *D. kaki* yaprak suyunun kullanılması durumunda ve reaksiyon sıcaklığı arttığında AgNPs sentez oranı ve dönüşümü daha hızlı olmuştur. Ancak *D. kaki* yaprak suyu ile üretilen ortalama parçacık büyüklüğü sıcaklık 25 °C'den 95 °C'ye yükseltildiğinde 50 nm'den 16 nm'ye düşmüştür. Araştırmacılar ayrıca, *M. kobus* yaprak suyu kullanılarak 95 °C'lik reaksiyon sıcaklığında % 90'dan fazla dönüşüm için sadece 11 dakikalık bir sürenin gerekli olduğunu göstermiştir.

2.5. SENSÖRLER

Antioksidan bileşiklerin incelenmesi, bu bileşiklerin özellikle patolojilerdeki etkileri ve bunların gıda stabilitesindeki önemi nedeniyle çok zorlu bir alan olmaya devam etmektedir. Antioksidan bileşikleri incelemek için yöntemlerin geliştirilmesi, gıda analizi, kimya ve teknoloji topluluğunda büyük ilgi görmeye devam etmektedir. Bu sahada tek bir yöntem belirli bir amaç için değerlendirilmesi gereken tüm istenen fonksiyonel özellikleri kapsayamaz. Bu bakımdan tek bir yöntemin kullanılabilir olmaması kafa karışıklığı yaratabilir ama bu durum antioksidan bileşiklerin (veya bunların doğal endojen karışımının) etki mekanizmalarından dolayı kaçınılmazdır.

AOC'nin değerlendirilmesi için SET ve HAT'a dayalı farklı yöntemler kullanılırken, TP'nin saptanması için genellikle FCR yöntemi kullanılır. Kabul görmüş yöntemlere alternatif olarak sensörlerin kullanımı açık bir analitik avantajı veya yeni bir bilgi sağlamaları durumunda uygulanabilir [174, 175]. Örnek olarak, reaktiflerin kullanımını azaltmak ve hızlı bir analiz süresi gerekli olduğunda klasik elektrokimyasal yöntemler kullanılabilir. Diğer taraftan, tepkimenin heterojen yapısı nedeniyle elektrot kirlenmesine bağlı problemler de göz önünde bulundurulmalıdır. Aynı zamanda, elektrokimyasal yöntemler, gıda stabilitesi (raf ömrü) hakkında önemli bilgiler veren farklı bileşik sınıflarının (yani, o–difenoller ve monofenoller) seçimini mümkün kılan belirli bir seçicilik derecesi sağlayabilir. Ayarlanabilir de olan nanomalzemelerin benzersiz özellikleri farklı türlerdeki nanomalzemelerin birleştirilmesi ve bunların işlevselleştirilmesiyle birlikte sensörlerin artan duyarlılığı, seçiciliği ve uzun süreli

kararlılığı bize alternatif kolay yollar sunar ve mevcut yöntemlere göre daha fazla seçenek ve olası avantajlar sağlar. Bunlar aynı zamanda analitik tarama analizlerinin kullanıcılar için daha sağlam ve bilgilendirici olmasını sağlar. Enzimlerin nanoyapılı elektrotlara bağlanma olasılığı sisteme daha fazla karmaşıklık kazandırır ama duyarlılığı arttırabilir ve elektrokimyasal yöntemden ziyade biyolojik elemente karşı seçiciliği yönlendirebilir. Bu durumda anahtar parametre enzim elektrodunun stabilitesidir [176].

Optik algılama ile MNPs kullanımı, elektrokimyasal yaklaşımın kendinden daha az hassastır [135]. Bununla birlikte, TP ve/veya AOC'nin hızlı bir şekilde değerlendirilmesine izin verir ve en çok kullanılan yöntemlere alternatif olabilir.

2.5.1. Kimyasal Sensörler

Elektrokimyasal stratejiler hızlı ve düşük maliyetli analiz için çok yönlü bir araçtır [177]. Polifenoller veya bir numunenin AOC'si olarak antioksidanların doğrudan algılanması için elektrokimyasal yaklaşımlar gerçek örneklerde doğrudan çalışma olanağı sağlayabilir ve buna ilişkin örnekler Tablo 2.6'da verilmiştir. Farklı nanokarbon allotroplar (fullerenler, karbon nanotüpler (CNT'ler), karbon nanoparçacıklar ve grafenler) sensör olarak kullanılabilir. Farklı yapısal konfigürasyonlarda, farklı oksidasyon derecelerinde, inorganik ve organik moleküllerle, polimerik yapılarla veya diğer NPs ile (hibrid NPs) birleştirilerek kullanılabilirler (MaghemitNPs–tannik asit veya Seryum(IV)oksit NPs gibi).

Tablo 2.6: Gıda polifenolleri analizi için geliştirilen nanomalzemeye dayalı elektrokimyasal sensörler.

Çalışmanın Amacı	NPs Türü	Gıda Matrisi	Numuneye Uygulanan Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Yöntemin Dayandığı Mekanizma	Kaynak
AOC numuneleri karşılaştırılması	SWCNTs	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	GCE–SWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[178]
TP tespiti	MWCNTs	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	GCE–SWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	Amperometrik	[179]
o–Difenol tespiti	MWCNTs–NH_2–Mo	Zeytinyağı	SPE	o–Difenollerin SPE–Mo/MWCNTs–NH_2 ile seçimli yükseltgenmesi	Amperometrik	[180]
AOC tespiti	MWCNTs	Konyak	Seyreltme	GCE–MWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	Amperometrik	[181]

Tablo 2.6 (devam):

Çalışmanın Amacı	NPs Türü	Gıda Matrisi	Numuneye Uygulanan Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Yöntemin Dayandığı Mekanizma	Kaynak
AOC tespiti	MWCNTs	Kahve tohumları	Demleme	GCE–MWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[182]
AOC tespiti	MWCNTs	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	GCE–MWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	Kronokolorimetri	[183]
TP tespiti	MWCNTs	Çay	Demleme	GCE–SWCNTs üzerinde polifenollerin yükseltgenmesi	Amperometri	[184]
Toplam izoflavon tespiti ve poliferol profillrinin çıkarılması	SPE–MWCNTs	Elma ve armut ekstraktları	LLE	Akış/enjeksiyon sonrası çip üzerinde yükseltgenme	Çip üzerinde akış/enjeksiyon sonrası amperometrik olarak tespit	[185]
Toplam glikozit tespiti ve toplam izoflavon tespiti	SWCNTs	Soya ekstraktı	LLE	Akış/enjeksiyon sonrası çip üzerinde yükseltgenme	Çip üzerinde ayırma/ amperometrik olarak tespit	[186]
Polifenol çalışmaları	Karbon siyahı (CB)	–	–	SPE–CB'de polifenollerin yükseltgenmesi	SWV	[187]
o–difenollerin ve m–fenollerin AOC'sinin tespiti	CB	Zeytinyağı	SPE	Baskı ile üretilmiş olan CB dönüştürücüe polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[188]
AOC tespiti	CB–AgNPs	Şarap	Seyreltme	GCE–CB–AgNPs'te polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[189]
AOC tespiti	Bor dope edilmiş grafen	Çay	Demleme	Bor dope edilmiş GCE–grafen'de polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[190]
AOC tespiti	Isı ile indirgenmiş grafen	Bira	Seyreltme	Isı ile indirgenmiş GCE–grafen'de polifenollerin yükseltgenmesi	DPV	[191]
AOC tespiti	İndirgenmiş grafen–Fe_2O_3–kitosan	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	GCE–İindirgenmiş grafen–Fe_2O_3–kitosan'da polifenlllerin yükseltgenmesi	DPV	[192]
AOC tespiti	Grafen–PEDOT–poli (stirensülfonat)	Otsu bitkiler	LLE/seyreltme	SPE–grafen–PEDOT–PSS'de DPPH'ın yükseltgenmesinden yararlanarak dolaylı tayin	Krono-amperometri	[193]
Polifenollerin tespiti	MaghemitNPs–tannik asit	Yaban mersini	LLE	CPE–SAMN/TA'da polifenollerin yükseltgenmesi	SWV	[194]
o–Difenollerin tespiti	Seryum(IV)oksit NPs	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	SPE–CeO(IV)NPs polifenollerin yükseltgenmesi	Amperometri	[195]
Polifenol içeriğine dair indeks oluşturulması	Grafitleştirilmiş karbon/kitosan	Çay	Demleme	GCE–kitosan/GMC'nin iki farklı potansiyelinde polifenollerin yükseltgenmesi	Amperometrik (çift potansiyel)	[196]
Polifenolllein tespiti	CuNPs	Şarap	Seyreltme	Epoksi–grafit–biyoelektronik dizi	CV	[197]

CNTs benzersiz yapısal, mekanik ve elektronik özelliklerinden dolayı birçok alanda büyük potansiyele sahiptirler. GCE'ye tutturulmuş MWCNTs kullanılarak konyak içkisindeki AOC'nin kronoamperometrik tespiti gerçekleştirilmiştir [181]. Konyak (ellajik ve gallik asitler, siringaldehit, koniferaldehit, vanillin, 5–hydroksimetilfurfural ve furfural) ana antioksidan bileşenlerinin voltametrik (DPV) davranışı araştırılmıştır. Konyak ana antioksidan olan ellajik asit referans olarak kullanılmıştır. Farklı marka konyak ve konyak markaları araştırılmış ve FC, DPPH, elektrojenle titre edilen sabit akımlı kolorometri ve FRAP analizleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen korelasyon katsayıları (R = 0.913–0.970), yöntemin konyak ve konyaklardaki antioksidan içeriklerini yansıttığını doğrulamıştır. Aynı elektrot, kahve [182] ve şarap [183] örneklerinde AOC tespiti için başarıyla kullanılmıştır. Her iki durumda da, gıda matrisinde bulunan ana polifenollerin elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. Elde edilen veriler temelinde AOC endeksleri önerilmiştir.

Mikroçip teknolojisi iyi bilinen geleneksel ayırma tekniklerine çekici bir alternatif haline gelmiştir. Bu, öncelikle küçük miktardaki numuneleri analiz etme yeteneği, analiz hızı, düşük maliyet, az atık ve taşınabilirliğinden kaynaklanmaktadır. Toplam izoflavonların belirlenmesi ve antioksidan profillerin saptanması için dedektörler olarak SPE–MWCNT'ler ile entegre elektrokinetik mikroçipler önerilmiştir. Örneğin gıda polifenolleri analizi için mikroakışkan bir platforma (74 mm uzunluğunda bir ayırma kanalı ile cam ‘çift T’ mikroakışkan çip) SPE–MWCNT'leri entegre edilmiştir [185].

Karbon siyahı (CB) takviye malzemesi olarak yaygın olarak kullanılan bir karbon malzemedir ve kauçuk ve plastik bileşiklerin ve kompozitlerin hazırlanmasında bir dolgu maddesidir. [198]. 'Nano CB' mükemmel iletkenlik, benzersiz elektrokimyasal özellikler ve maliyet etkinliği sergiler. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda, çeşitli analitik ilgi türlerine karşı kayda değer elektrokatalitik özellikler gösteren elektrot modifikasyonu için CB dispersiyonu üzerine birkaç çalışılmıştır. Yaygın olarak gıdalarda bulunan farklı PC'lerin tespiti için SPE ile modifiye edilmiş CB kullanılmıştır [187]. Sensör bir SPE çalışma elektrotunun yüzeyi üzerine tutturulan CB’den oluşmaktadır. SPE–CB'nin katekol, tirosol, kafeik asit ve gallik aside karşı elektrokimyasal davranışı incelenmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri, kateşol, gallik asit, kafeik asit için ve tirozol için sırasıyla 10^{-7} M, 10^{-6} M, $0.8x10^{-6}$ M ve $2x10^{-6}$ M LOQ değerleri elde edilmiştir. Bileşiklerin karışımları için SPE–CB elektrodu, +0.1 V ve +0.6 V'da (Ag / AgCl'ye karşı) o–difenoller ve m–fenoller için iki belirgin oksidasyon tepe noktası

vermiştir. Bu veriler CB'nin polifenollerin tespiti için kullanılabilecek bir nanoparçacık olduğunu kanıtlamıştır. Gerçek örneklerde o–difenollerin ve monofenollerin saptanması bir baskısız karbon siyahı nanoparçacıklar (CBNPs) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [188].

Grafenin elektrokimyasal davranışı antioksidan aktivitenin ölçümü için farklı tipte dopanlar ve grafen tipleri hazırlanarak modifiye edilebilir [190]. Bir GCE üzerine biriktirilmiş katkısız grafen, bor katkılı grafen (B–GR) ve nitrojen katkılı grafen (N–GR) kullanılarak termal olarak indirgenmiş grafen ile gallik asidin elektrokimyasal oksidasyonunu incelenmiştir. Malzemeler yüksek (H) veya düşük (L) konsantrasyonlarda doping edilmiştir. DPV yöntemi ile çay numuneleri B–GR–H ile analiz edilmiş ve gallik asidin tepe yüksekliğinin askorbik asit gibi potansiyel bir enterferans bileşiğinin konsantrasyonundaki artıştan etkilenmediği görülmüştür.

Şarapta AOC'nin tespiti için bir Fe_2O_3/elektro–indirgenmiş grafen oksit kompozitine dayalı bir elektrokimyasal sensör kullanılmıştır [192]. İndirgenmiş grafen gallik asidin yükseltgenmesi için nanokompozit içinde yükseltilmiş yükseltgenmiş grafene elektrokatalitik özellikleri bakımından daha iyi özelliklere sahiptir. DPV kullanarak, 10^{-6} – 10^{-4} M aralığında maksimum vermesi ile konsantrasyon kütlesi arasında iyi bir doğrusal ilişki elde edilmiş ve LOD değeri $1.5x10^{-7}$ M olarak bulunmuştur. Bir şarap örneğindeki polifenollerin tespiti için standart bir prosedür geliştirilmiş sensöründen elde edilen değerler HPLC sonuçları ile karşılaştırıldığında aralarında makul bir ilişki olduğu görülmüştür.

Ayrıca modifiye edilmiş bir serigrafi baskılı karbon elektrot (SPE–GR/ PEDOT/PSS) üzerine elektrospreylemiş grafen/poli (3,4–etilendioksiiofen):poli (stiren sülfonat) ile yapılan bir nanokompozit rapor edilmiştir [193]. Nanokompozit ve morfolojik karakterizasyonun optimizasyonundan sonra, elektrokimyasal karakterizasyonda beklendiği gibi daha büyük bir alana ve daha hızlı elektron transfer kinetiğine nanokompozitin sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Nanokompozit sensör, DPPH'nin klasik elektrofotometrik ölçümünü, geliştirilen elektrokimyasal yaklaşımla değiştirerek, AOC'nin dolaylı değerlendirmesi için kullanılmıştır. Troloks için bir kalibrasyon eğrisi, $5.0x10^{-6}$ – $3.0x10^{-5}$ M aralığında bulunmuştur. Beş Thai bitkisinin ve bitkisel içecek örneklerinin AOC'si hesaplanmış ve spektrofotometrik ölçüm ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar iki yöntem arasında önemli ölçüde fark olmadığını göstermiştir.

Şarap fenolik antioksidanlarının saptanması için "biyomimetik" (oksidaz benzeri aktivite) seryum (IV) oksit temelli NPs tek kullanımlık bir SPE önerilmiştir [195]. Sensör tasarımında seryum (IV) oksit temelli NPs kullanımı, PC'lerin, özellikle o–difenol işlevlerine sahip olanların, SPE yüzeyinde tespit edilen ilgili kinonlarına oksidasyonunu sağlamaktadır. Sensör bir SPE üzerine bir seryum (IV) oksit temelli NPs dispersiyonu ve gallik asit CV'leri tarafından incelenen elektrokimyasal mekanizmanın gerçekleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Gallik asit, kafeik asit, kuersetin, askorbik asit ve epikateşinin reaktivitesini değerlendirmek için –0.1 V'de (Ag/AgCl'ye karşı) amperometrik ölçüm alınmıştır. Gallik asit lineer aralığı $2x10^{-6}$ ile $2x10^{-5}$ M arasında bulunmuş olup LOD değeri $1.5x10^{-6}$ M'dır. Çalışma koşullarında, elektrot seçici olarak glikoz, tartarik asit, etanol, sitrik asit ve kükürt dioksiti birbirinden ayırmıştır. Şarap örnekleri üzerinde elde edilen veriler ABTS testi ile karşılaştırılmış ve iki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında korelasyon bulunmamıştır. Analitik parmak izi için cihazın bir elektronik–dil cihazına potansiyel olarak dâhil edilebileceği sonucuna varılmıştır çünkü bu yöntemle ABTS'den farklı tür bir bilgi elde edilmektedir.

Ayrıca AOC testi için DNA bazlı sensörler kullanılmıştır. Bu, dolaylı bir testtir çünkü PC'lerin koruyucu etkisini, ROS tarafından DNA'ya verilen hasara karşı ölçmektedir. Bununla birlikte, az sayıda kâğıt–bazlı sensör gıda analizlerine yöneliktir veya NPs kullanır. Bu bağlamda Ziyatdinova ve ark. tarafından önerilen çay ekstresinin AOC değerlendirmesi için bir MWCNTs DNA–biyosensöründen bahsedilebilir [199]. Sensör, bir MWCNTs SPE'nin yüzeyinde biriktirilmiş çift iplikli buzağı timus veya ringa sperm DNA'sı tarafından fonksiyonel hale getirilmiştir. SPE–MWCNTs / DNA, tabaka–katman kapsamı ile yapılandırılmış ve redoks probu olarak $[Fe(CN_6)]^{4-}$ kullanılarak DNA hasarını değerlendirmek için impedimetrik stratejiler kullanılmıştır.

Nanomalzemeler elektrot yüzeyine enzimin doğrudan bağlanabildiği enzim elektrotlarının yapılabilmesi için benzersiz ve yaratıcı konfigürasyonlar sunar [200]. Polifenoller için klasik enzim elektrotları polifenol oksidaz (PPO) bazlıdır. PPO prostetik grup olarak bakır içerir ve ko–substrat olarak moleküler oksijeni kullanır. Substrat spesifitesine ve etki mekanizmasına dayanarak, PPO'lar farklı tiplerde sınıflandırılabilir: tirozinaz, katekol oksidaz ve lakkaz. PPO, o–difenolleri oluşturmak için moleküler oksijen ile monofenollerin oksidasyonunu selektif olarak katalize eder ve bunlar daha sonra o–kinonlara oksitlenir. Oluşturulan kinonlar,

fenolik bileşiğe orantılı bir akım sinyali üretir ve dönüştürücü yüzeyde düşük potansiyelde indirgenebilir. Ayrıca, üretilen o–difenoller enzimatik/elektrokimyasal amplifikasyon döngüsü yaratan enzimler tarafından yeniden oksitlenebilir. Tablo 2.7 incelenen nanomateryal tabanlı enzimatik elektrokimyasal stratejilerin temel özelliklerini özetlemektedir.

Tablo 2.7: Gıda polifenollerinin analizi için geliştirilen nanomalzemeye dayalı elektrokimyasal enzim sensörleri.

Çalışma Amacı	NPs Türü	Enzim	İmmobi-lizasyon	Gıda	Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Kaynak
TP tespiti	MWCNTs + kitosan	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	MWCNTs–kitosan elektrot biriktirmesi	Adaçayı ve nane	LLE	Altın tabaka–MWCNTs–kitosan'da amperometrik indirgeme	[201]
TP indeksi oluşturma	SWCNT + MWNCT	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	PAP çapraz bağlanma	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	SPE– SWCNTs'de amperometrik indirgeme	[202]
TP indeksi oluşturma	C–MWCNT–PANI/AgNPs	Ganoderma sp.'den elde edilen lakkaz	AgNPs/C–MWCNT/PANI üzerine kovalent bağlanma	Çay yaprakları ve alkollü içecekler	Demleme ve seyreltme	Altın elektro–C–MWCNT–PANI/AgNPs'de amperometrik indirgeme	[203]
TP indeksi oluşturma	C–MWCNT–PANI/NiNPs	Ganoderma sp.'den elde edilen lakkaz	NiNPs/C–MWCNT/PANI üzerine kovalent bağlanma	Meyve suyu	Seyreltme	Altın elektro–C–MWCNT–PANI/NiNPs'de CV indirgeme	[204]
TP indeksi oluşturma	GRO–PtNPs	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	Nafyon tutulması	Çay	Demleme	SPE–GRO/PtNPs/Nafyon'da amperometrik indirgeme	[205]
TP indeksi oluşturma	Fulleren + AuNPs	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	Au–SAM/AuNPs–Linker/Fullerenol/TvL'ye kovalent bağlanma	Beyaz ve kırmızı şarap	Seyreltme	Au–SAM/AuNPs–Linker/Fullerenol/TvL'de amperometrik indirgeme	[206]

Tablo 2.7 (devam):

Çalışma Amacı	NPs Türü	Enzim	İmmobi-lizasyon	Gıda	Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Kaynak
TP indeksi oluşturma	GRQDs+ MoS_2 / nanotabakalar	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	Lakkaz / GRQDs'in elektrostatik etkileşimi	Kırmızı şarap	Seyreltme	SPE–GRQDs–MoS_2/nanotabakalar'da amperometirk indirgeme	[207]
TP indeksi oluşturma	GRO + MWCNTs	Trametes Versicolor'dan elde edilen lakkaz	GA/kitosan ile tutulma	Meyve suyu	Seyreltme	GCE–GRO/MWCNTs'de amperometrik indirgeme	[208]
TP indeksi oluşturma	CB	Mantardan elde edilen trosinaz	Tutulma	Zeytin-yağı	LLE	Karbon pasta elektrot–CB'de amperometrik indirgeme	[209]

Altın elektro–C–MWCNT–polianilin/AgNPs'ten oluşan bir nanokompozit, lakkazın immobilizasyonu için çalışılmıştır [203]. MWCNT'ler başlangıçta asidik çözelti içinde karboksilatlanmış ve anilin ile karıştırılmış ve daha sonra Au elektrodunda biriktirilmiştir. Ganoderma sp.'den elde edilen lakkazın kovalent bağlı immobilizasyonu öncesinde sodyum borohidrid ile hazırlanan AgNPs modifiye Au elektrodunda biriktirilmiştir. Optimal koşullar altında, kronoamperometrik (6 s'de sinyal okuma Ag/AgCl'ye karşı +0.22 V) olarak guaiacol'un saptanması çalışması sonucunda $5.0x10^{-8}$ MsLOD değeri elde edilmiş olup çalışma aralığı ise $1.0x10^{-5}$ – $5.0x10^{-4}$ M'dır. Enzim elektrodu beş ticari marka çay yaprağı, alkollü içecek ve farmasötik numunede polifenollerin belirlenmesi için kullanılmıştır. FC testi ile iyi bir korelasyon (R = 0.990) elde edilmiştir. Askorbik asit, glikoz, fruktoz ve sitrik asit için ihmal edilebilir etkileşim gözlenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde, biyosensör çok kararlıdır (dört ay içinde 200 ölçümden sonra sinyalin % 20 azalması). Aynı enzim elektrodu gerçek örneklerde (meyve suları) polifenoller için kullanılmış ve duyarlılığı, kararlılığı ve ölçümü açısından benzer analitik performanslar elde edilmiştir [204].

AuNPs, fulleren ve Trametes versicolor lakkaz içeren birçok tabakalı enzim elektrotu altın bir elektrot yüzeyinde oluşturulmuş ve şarap örneklerinin TP içeriğini değerlendirmek için kullanılmıştır [206]. –0.1 V 'de (Ag/AgCl'ye karşı) ölçülen gallik asidi cevabı, $3.0x10^{-5}$ – $3.0x10^{-4}$ M aralığında olup LOD değeri $6.0x10^{-6}$ M'dır. Enzim elektrodu FC'ye göre

polifenolik içeriğini yaklaşık olarak vermiştir. 120 analizden sonra, enzim elektrotu hala başlangıç aktivitesinin % 87'sini korumuştur. Molibden disülfür (MoS_2) nanoflakes ve grafen kuantum dotları (GRQD'ler), SPE'yi modifiye etmek ve bir lakkaz enzim elektrotunu gerçekleştirmek için kullanılmıştır [207]. Elektrot yüzeyindeki lakkaz hareketsizliğinin negatif yüklü lakkaz ve pozitif yüklü GRQD'ler arasındaki elektrostatik etkileşim yoluyla gerçekleştiği varsayılmıştır. Kronoamperometrik ölçümler +0.05 V'de (Ag/AgCl'ye karşı) klorojenik asit, kafeik asit ve epikateşin için iyi bir duyarlılık sağlamıştır. Sekiz şarap analizi, FC yöntemine göre benzer veriler verdi ve yedi ölçüm sonrasında hiçbir reaktivite kaybı gözlenmemiştir.

MTCNT'lerle karıştırılan grafen oksit tirozinaz ve lakkaz enzim elektrotlarının hazırlanmasında kullanılmış ve meyve suyu örneklerinin TP tespiti için gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır [208]. GRO ve MWCNT'ler bir GCE üzerine dökülmüş ve bunu grafenoksit elektrokimyasal indirgemesi takip etmiştir. Enzimler (Lakkazdan Trametes versicolor ve mantardan tirozinaz) depolandı ve üç malzeme incelendi. İmmobilizer olarak glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan, nafion ve bis (trimetilsilil) asetamit (BSA) kullanılmıştır.

2.5.2. Optik Sensörler

MNPs nanoparçacıkların daha önce bahsi geçen uygulamalarının ötesinde olan ve bunların kolorimetrik veya spektrofotometrik algılamada kullanılmasına olanak veren eşsiz bir özellik sergiler. Elektromanyetik radyasyonun etkisi altında, görünür alanda, yüzey atomlarının elektronları, belirli bir dalga boyunda absorpsiyon üreten boş orbitallerden kolaylıkla hareket edebilir. Bu fenomen lokalize yüzey plasmon rezonansı (LSPR) olarak adlandırılır. Elektronların ışık frekansı ile rezonansta uyumlu salınımları kimya, biyoloji ve nanoteknolojide geniş bir uygulama alanı sağlar [210].

Reaksiyon ortamında farklı boyut ve stabiliteye sahip MNPs süspansiyonları elde etmek için farklı tür sentez yöntemleri ile MNPs üretilebilir. Oluşan MNPs büyüklüğü ve dağılımı, reaksiyon koşullarına, yani kullanılan indirgeme maddesine, ortamın pH'sına ve kullanılan kimyasal stabilize ediciye bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Metal iyonu içeren çözünür bir tuz metal kaynağı olarak kullanılarak uygun koşullar altında bir kolloidal dispersiyon elde edilebilir. Antioksidan bileşikler ve özellikle polifenoller, uygun şekilde optimize edilmiş

durumda, MNPs oluşturabilir ve bu nedenle MNPs üretimi yoluyla antioksidan bileşikler incelenebilir.

Gıda antioksidanlarının saptanması için analitik testlerin geliştirilmesi için nanoparçacıkların ve nanoyapıların kullanımını gözden geçirilmiştir [211]. Bu çalışmada hem optik hem de elektrokimyasal stratejilere odaklanılmıştır. Analizler; ya antioksidanların ilgili nanoparçacık oluşumuna yol açan soy metalleri indirgemesi ya da indirgeyici maddeler olarak antioksidanların "çekirdek aracılı" büyüme tekniğine dayalı olarak kullanmasını içerir. İkinci yaklaşımda, küçük NPs çekirdekleri büyüyerek çekirdeklenme merkezleri olarak hizmet vermektedir. Kolloidal NPs süspansiyonlarının absorbansı yüzey rezonansı olan plasmon bantlarının özelliklerine bağlı olduğundan, antioksidan aktivite indeksi olarak kullanılan yoğun kolorimetrik ve kromatik geçişler gözlenmiştir. Çoğunlukla AuNPs'e dayanan optik incelemeler ele alınmıştır [212]. MNPs'in (çoğunlukla altın ve gümüş) ve kuantum noktalarının (QD) antioksidan aktivitenin güvenilir bir şekilde tespiti için yenilikçi araçlar olarak kullanımı rapor edilmiştir [213]. Ortaya çıkan nanoparçacık temelli optik stratejiler gıda ve klinik alanında yeni, basit ve ucuz hızlı test araçları olarak tanımlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, gıda örneklerinde antioksidan tespiti için yeni NPs bazlı yöntemleri geliştirmek için farklı stratejiler önerilmiştir. Tablo 2.8'de polifenol AOC'leri için farklı NP'ler/QDS–esaslı optik analiz yöntemleri arasında bir karşılaştırma sunulmaktadır.

Tablo 2.8: Gıda polifenollerinin değerlendirilmesi için optik nanomateryal tabanlı analizlerin ana özellikleri.

Çalışmanın Amacı	NPs Türü	Gıda Matrisi	Numuneye Uygulanan Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Yöntemin Dayandığı Mekanizma	Kaynak
AOC numuneleri karşılaştırılması	AgNPs	Meyve suyu ve zeytinyağı	Demleme ve LLE	AgNPs çekirdekleri büyümesi	Optik (LSPR)	[26]
Kağıt bazlı AOC sensörü	AuNPs	Çay ve şarap	Demleme ve doğrudan	Kâğıt bazlı Au indirgemesi	Optik (LSPR)	[212]
AOC numuneleri karşılaştırılması	AuNPs	Meyve Ekstraktı	LLE	Ilımlı şartlarda Au indirgemesi	Optik (LSPR)	[214]
Yeni bir AOC indeksi oluşturma	AuNPs	Zeytinyağı	SPE	Ilımlı şartlarda Au indirgemesi	Optik (LSPR)	[215]
Yeni bir TP indeksi oluşturma	AuNPs	Zeytinyağı ve çikolata	DMSO ile çözme	Yağlı matrislerin DMSO ile çözme	Optik (LSPR)	[216]
AOC numuneleri karşılaştırılması	AuNPs	Kolza tohumu	LLE	pH 4.6'da Au indirgemesi	Optik (LSPR)	[217]
AOC numuneleri karşılaştırılması	AgNPs	Zencefil	LLE	AgNPs çekirdekleri büyümesi	Optik (LSPR)	[218]

Tablo 2.8 (devam):

Çalışmanın Amacı	NPs Türü	Gıda Matrisi	Numuneye Uygulanan Ön İşlemler	Yöntemin Dayandığı Temel	Yöntemin Dayandığı Mekanizma	Kaynak
AOC numuneleri karşılaştırılması	AgNPs	Kolza tohumu	LLE	1 saat süren AgNPs çekirdekleri büyümesi	Optik (LSPR)	[219]
AOC numuneleri karşılaştırılması	CeO_2–NPs	Çay ve tıbbi amaçla kullanılan mantarlar	Demleme ve doğrudan	Kâğıt bazlı Ce(VI) indirgemesi	Görünür alanda optik (LSPR)	[220]
AOC numuneleri karşılaştırılması	CeO_2–NPs	Kolza tohumu ve ürünleri	LLE	Ilımlı şartlarda 1 saat süreyle Ce(VI) indirgemesi	Optik (LSPR)	[221]
AOC numuneleri karşılaştırılması	Demir oksit NPs	Kolza tohumu yağı	LLE	Ilımlı şartlarda 50 dk. süreyle Fe(III) indirgemesi	Optik (LSPR)	[222]
AOC ve toplam kateşin tespiti	RhNPs	Çay	Demleme	RhNPs'in LSPR kayması	Optik (LSPR)	[223]
Polifenol tespiti	TiO_2, ZnO, SiO_2, ZrO_2, TiO_2, Fe_2O_3, CeO_2 nanoparçacıkları	Yeşil çay	Demleme	Polifenollerin MNPs'in yüzey reaksiyonu	Renk değişimi	[224]
TP tespiti	CdTe/QDs	Çay	Demleme	CdTe/QDs süpürme inhibasyonu	Floresans	[225]
Floresans	CdTe/QDs	Bitki ekstraktları	LLE	Lakkaz enzimi varlığında CdTe/QDs süpürme inhibasyonu	Floresans	[226]
TP tespiti	CdTe–$NaIO_4$	Çay ve bitki ekstraktları	Demleme	CdTe/QDs süpürme inhibasyonu	Floresans	[227]
TP tespiti	Grafen QDs	Zeytinyağı ekstraktı	LLE	Grafen QDs süpürme	Floresans	[228]
AOC tespiti	Grafen QDs	Şarap	Seyreltme	Kâğıt bazlı Grafen QDs süpürme	Floresans	[229]

Tablo 2.8'e bakıldığında, karşılaştırmayı zorlaştıran bazı genel yönlerin vurgulanması gerekmektedir. Toplam TP ve AOC tespitindeki farklılık her zaman tanımlanmamıştır. Ayrıca, rapor edilen yöntemlerin analitik performansı (özellikle duyarlılık açısından) çok farklı AOC (yani flavonoller ve monofenolik asitler) sergileyen farklı fenolik standartlara refere edilir. Numune hazırlama genellikle çok farklıdır. Bu, tamamen farklı stratejilere dayanan farklı yöntemlerin performansının karşılaştırılması sırasında yanlış anlamalar yaratabilir. Bu nedenle sayısal verilere dayanan basit bir karşılaştırma değil, metodolojinin eleştirisi ile bir karşılaştırma yapılabilir.

Vilela ve ark. [214] tarafından endojen gıda polifenollerinin Au (III)'ü AuNPs biçiminde Au(0)'a sulu çözücüler içinde indirgenme kabiliyeti gösterilmiş ve LSPR'ye göre AuNPs'in oluşan maksimum optik absorpsiyon gösterdiği dalga boyu saptanmıştır. Farklı miktarlarda polifenoller tarafından tahrik edilen AuNPs oluşumu bir sigmoidal fonksiyona bağlanmıştır. Elde edilen sigmoidal eğrinin eğimi AOC indeksi olarak kullanılmıştır. Test edilen numuneler (dört farklı bitki özütü) artan eğimlere göre sınıflandırılmıştır. Eğimler ile FRAP ve FC yöntemleri arasında (R = 0.900 ve 0.970) iyi bir korelasyon bulunurken, ABTS ile anlamlı korelasyon saptanamamıştır (R = –0.730). Böyle bir sonucun ortaya çıkması, geliştirilen yöntemin FRAP ve FC'nin polifenollerin numunedeki indirgeyici gücünü yansıtması ile açıklanmıştır. Ek olarak, HPLC–DAD ile elde edilen eğim ile TP arasında mükemmel bir korelasyon elde edilmiştir (R = 0.930, p–değeri <0.05). Bununla birlikte, sigmoidal eğri ile elde edilen eğim AOC'nin genel bir göstergesidir çünkü AOC'yi sayısal bir değer olarak ifade etmek için standart olarak hiçbir polifenol kullanılmamıştır.

Benzer bir analitik strateji kullanarak Della Pelle ve ark. [215] doğrudan 0.5 mL'lik bir hacimde, su bazlı ılımlı bir kimyasal yolla (45 ºC, 10 dakika) AuNPs sentezlemiştir. AuNPs oluşumu, sızma zeytinyağındaki (EVOO) endojen polifenoller kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu durumda reaksiyon bir sigmoidal eğri ile tarif edilmiştir. Bu yeni AuNPs –bazlı AOC indeksi, AOC analizlerinin çoğunda olduğu gibi referans polifenol olarak gallik asit kullanılarak gallik asit eşdeğerli antioksidan kapasite (GEAC) cinsinden ifade edilmiştir. Maksimal absorbansın yarı değerinde sigmoid eğiminin ve konsantrasyon oranının AOC'yi tespit etmede en uygun parametre olduğu bulunmuştur. Elde edilen veriler, orto–difenol (o–difenol) işlevselliğine sahip bileşiklerin Au (III)'i Au (0)' ya indirgemede en aktif bileşikler olduğunu göstermiştir. Antioksidan aktivitesini (ABTS, DPPH ve FC) belirlemek için kullanılan klasik yöntemler ile önerilen yöntem, 0.960–0.970 aralığında R değerleri ile anlamlı bir korelasyon göstermiştir. Bununla birlikte, geliştirilen yöntem yağ bakımından zengin örneklerle çalışılması durumunda diğer klasik yöntemlerde olduğu gibi polifenollerin ekstraksiyonunu gerektirir. AuNPs sentezinin organik solventi olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılması sonucunda ekstraksiyon–içermeyen bir yaklaşımla yağ bakımından zengin örneklerle doğrudan çalışılması ile bu dezavantaj ortadan kaldırılmıştır [216]. DMSO, numuneyi çözmüş ve sentezin bloke edilmesi için kullanılan sıcaklıklarda katılaşmadan kaçınılan bir kriyojenik koruyucunun yanı sıra çalışan AuNPs süspansiyonunu stabilize etmiştir. AuNPs oluşumu 45 °C'de 5 dakika içinde gerçekleşmiştir. Yöntem

zeytinyağı ve çikolata örneklerinde TP'lerin belirlenmesinde uygulanmıştır Kalibrasyon eğrileri, sadece maksimum LSPR olan 540 nm'de absorbans ölçülerek EVOO'da bulunan tipik polifenoller (hidroksitirosol, oleuropein ve tirozol) ve çikolata'da bulunan tipik polifenoller (kuersetin, kafeik asit ve epikateşin) için elde edilmiştir. Zeytinyağı numuneleri (R = 0.990, n = 28) ve çikolata numuneleri (R = 0.905, n = 16) için mükemmel bir korelasyon elde edilmiştir.

Tułodziecka ve ark. [217] kolza tohumu ve bununla yapılan yemek ekstrelerindeki AOC'yi değerlendirmek için bir yöntem önermişlerdir. Reaksiyon karışımının pH'ı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı ve örnek hazırlama koşulları (çözücü polaritesi) titizlikle optimize edilip sinapik asit, kafeik asit, gallik asit, ferulik asit ve kuersetin reaktivitesi incelenmiştir. Yöntem bir asetik tampon ortamında (pH = 4.6) AuNPs oluşumuna dayanmaktadır ve 60 dakika oda sıcaklığında karanlıkta tutulan mor çözeltilerin absorbansı 540 nm'de ölçülmüştür. AuNPs yöntemi ile analiz edilen kolza tohumu ve yemek ekstrelerinin AOC arasındaki ilişkiler FRAP, DPPH ve FC yöntemleri ile karşılaştırıldı ve olumlu korelasyonlar (R = 0.840–0.970) bulundu.

Son yıllarda kâğıt–bazlı yöntemler [212] ve [230] geliştirilmiş ve bunlar saha analizlerini gerçekleştirmek için basit ve düşük maliyetli araçlar olarak önerilmiştir. Örneğin Choleva ve ark. [212] analitin oluşturduğu AuNPs'in oluşumuyla antioksidan aktivitesinin belirlenmesini sağlayan bir sensör yaması şeklinde kâğıt bazlı bir cihaz üretmişlerdir. Sulu örneklerde bulunan antioksidan bileşiklerin indirgenmesi üzerine NPs oluşturmak için altın iyonlarının nükleasyonundan yararlanılmıştır. Kâğıt yüzeyinde indüklenen kromatik geçişler, çözeltinin antioksidan gücünü değerlendirmek için kullanılmıştır. Farklı antioksidan moleküllere karşı test edildiğinde elde edilen renk cevabının şiddeti şu sırayla gözlenmiştir: kateşin, gallik asit> kafeik asit> askorbik asit> kumarik asit> vanilik asit> ferulik asit> sinnamik asit. Bu sonuçlar antioksidan polifenoller klasik reaktivitesi (yani flavonoidler> o–fenol> m–fenoller) ile uyumludur [227]. Çay ve şarap örneklerinin antioksidan aktivitesi bir dijital kamera ile görsel inceleme yapmak suretiyle değerlendirilmiş ve veriler gallik asit eşdeğerleri olarak ifade edilmiştir. Kullanılan kâğıt bazlı sensörler nemsiz ve düşük sıcaklık koşullarında saklandıklarında birkaç ay boyunca aktivitelerini kaybetmemişlerdir.

Polifenollerin için yapılan AgNPs oluşumuna dayanan kâğıt–bazlı araştırma sayısı AuNPs bazlı analizlerdekine kıyasla çok düşüktür. Farklı indirgeyici bileşikler ve doğal ekstraktların

kullanıldığı AgNPs sentezi çalışmaları da yapılmış ve nanotıp ve mikrobiyolojik uygulamalarda kullanılan AgNPs'in yeşil sentezine büyük ilgi gösterilmiştir [231]. Ag^0/Ag^+ çiftinin standart redoks potansiyeli en yaygın kullanılan Au^0/Au^{3+} çiftine göre daha yüksek bir indirgeme gücü gösterir. Bununla birlikte, polifenol aracılı AgNPs oluşumunda agregasyona, NPs çökmesine veya stabil olmayan NPs süspansiyonlarına neden olan aşırı hızlı kinetikler ortaya çıkar. Özyürek ve ark. tarafından [18] polifenollerin aracılık ettiği sitrat–stabilize edilmiş AgNPs çekirdek büyümesi temelli kolorimetrik bir yöntem önerilmiştir. Sitrat ile AgNPs çekirdek üretimi sonrasında, polifenoller ile 30 dakika boyunca 25 °C'de Ag^+'nın AgNPs indirgenmesi LSPR'nin bir artışı 423 nm'de maksimum absorbans üretir. Bu yöntemi kullanarak çeşitli antioksidanların (flavonoidler, basit fenolik asitler ve hidroksisinnamik asitler dâhil 15 polifenol) TEAC değerleri CUPRAC analizininkilerle karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntem bazı ticari meyve suları ve bitkisel çayların AOC'sini taramak için kullanılmıştır. Olası enterferanslar olarak oksalat, sitrat, meyve asitleri, amino asitler ve indirgen şekerler çalışılmıştır. Polifenol standartları, AOC'ye göre başarılı bir şekilde sınıflandırılmış ve çalışılan enterferanslar tahlili etkilememiştir.

Teerasong ve ark. [218] aynı zamanda çekirdek aracılı büyümeye dayanan, poli (vinil alkol)–tutturulmuş gümüş nanoparçacıklara (PVA–AgNP) dayanan bir metot önermişlerdir. Yöntemde Ag^+, polifenoller tarafından Ag0'e indirgenmiş ve PVA–AgNP yüzeyi üzerinde birikerek, parçacıkların boyutunda bir artışa neden olmuştur. PVA–AgNP çekirdekleri, sürekli karıştırma ve ısıtma (~ 90 °C) altında sulu bir PVA ve $AgN0_3$ çözeltisi kullanılarak üretilmiştir. Isıtma ile polimer üzerinde oluşturulan hidroksil grupları indirgeme birimleri olarak hizmet etmiştir. Yöntem polifenol standardı olarak sadece gallik asit kullanılarak test ve optimize edilmiştir. Zencefil numuneleri, 80 °C'de suda çözülerek ve üzerine PVA–AgNPs eklenmesiyle deneye tabi tutulmuştur. PVA–AgNPs süspansiyonunun absorbansındaki artış (hafif kırmızı bir kayma ile) AOC ile ilişkilidir. Yöntem daha yüksek fakat iyi ilişkili AOC değerleri veren (R = 0.992) ABTS testi ile karşılaştırılmıştır.

Kolza tohumu ve ürünlerinin AOC'sinin değerlendirilmesi için AgNPs'in doğrudan oluşumu ilk kez Szydłowska–Czerniak ve ark. [219] tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada, farklı çözücülerin etkisini ve bunların farklı işlem aşamalarında kolza tohumu yöntemi üzerindeki etkileri incelenerek örnek hazırlamada dikkatli bir optimizasyon gerçekleştirilmiştir. AgNPs üretimi, oda sıcaklığında bir amonyum tampon ortamında (pH = 8.4) gerçekleştirilmiş ve

sarı–turuncu süspansiyonun absorbansı 405 nm'de 60 dakika sonra ölçüldü. Antioksidan kapasite, numune gramı başına sinapik asit antioksidan kapasite (SAEC) mikromolleri olarak ifade edilmiştir. Sinapik asit kolza tohumu içinde baskın serbest fenolik asittir. Önerilen AgNPs yöntemi (tüm kolza tohumu ekstreleri için) ile FRAP, DPPH ve FC gibi diğer yöntemler arasında iyi bir korelasyon (R = 0.756–0.851) bulunmuştur. Ayrıca bu durumda PCA değerlendirmesi, farklı çözücülerle ekstrakte edilen kolza örneklerinde toplam antioksidan miktarları arasında farklılıklar olduğunu göstermiştir.

Son yıllarda gıdalardaki PC'lerin kolorimetrik değerlendirmesi için farklı tür metallerin nanoparçacıkları da kullanıldı. Sharpe ve ark. [224] tarafından seryum redoks çifti Ce(IV)/Ce(III), antioksidanların optik tahlili için nano–seryum tabanlı bir analizin gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır. İkinci aşama ise filtre kâğıdında immobilize edilmiş CeNPs kullanımına dayanmaktadır. Spektroskopik çalışmalar farklı antioksidanların (trolox, epigallokateşin gallat, L–askorbik asit, gallik asit, vanilik asidi, kuersetin, kafeik asit) yüksek konsantrasyonda CeNPs oluşumu için yük transfer kompleksleri oluşturduğunu göstermektedir. Yüzeye emdirilmiş süperoksitlerin inaktivasyonu yoluyla AOC'yi değerlendirmek için dolaylı bir renk inhibisyonuna dayalı kâğıt (önceden ön işlem görmüş) tabanlı bir yöntem geliştirilmiştir. Kolorimetrik cevap AOC'de ve antioksidan standartların konsantrasyonunda orantılı olarak bulunmuştur. Çaylar ve tıbbi mantarlar için AOC GEAC olarak tespit edilmiş olup yöntemde ORAC yöntemine benzer bir reaktivite olduğu iddia edilmiştir.

Kolza tohumu ve yan ürün özlerinin AOC'si bir CeONPs tabanlı bir yöntem kullanılarak da çalışılmıştır [225]. Kolza tohumu antioksidanları, seryum (IV) iyonlarını 510 nm'de tipik bir absorbans ile seryum oksit nano–taneciklerinin kırmızı–mor çözeltilerine indirgemiştir. CeONPs yöntemi, oda sıcaklığında (20 °C) 30 dakika inkübasyondan sonra pH 5,6'da (asetat tamponu) absorbansı okunarak etkin bir şekilde kullanılabilir. Elde edilen CeONPs eliptik ve çubuk şeklindedir. CeOCPs yöntemi ile analiz edilen AOC ve daha önce açıklanan AgNPs testi [222] ile elde edilen çalışılan tüm ekstrelerin sonuçları, SEAC olarak ifade edildi ve anlamlı bir şekilde korele edildi (R = 0.818, p = 0.007). Bununla birlikte, CeONPs metodu AgNPs analizine göre daha az duyarlıdır ve klasik yöntemlerle anlamlı bir korelasyon elde edilmemiştir.

Kolza tohumu yağlarının teknolojik süreçlerin çeşitli aşamalarında AOC değerlendirmesi demir oksit nano tanecikleri (IONPs) kullanılarak araştırılmıştır [225]. Ferrik iyonlar asidik ortamda yağ ekstraktları ile indirgenmiş ve sonuçta IONPs'in sarı çözeltileri oluşmuştur. Ekstre ilavesinden 50 dakika sonra, IONPs sarı–turuncu çözeltilerinin absorbansı 396 nm'de ölçülmüştür. Oluşturulan IONPs şekil olarak küresel, oldukça monodispers ve homojen olarak görünür. FTIR verileri IONPs yüzeyinde adsorbe edilen sinapik asit (standart olarak kullanılır) varlığını desteklemiştir. Kolza yağlarının asetonik ve metanolik ekstraktları için IONPs bazlı yöntem ile FRAP ve DPPH yöntemi değerleri anlamlı olarak koreledir (sırasıyla R = 0.979–0.985 ve 0.917–0.951, $p < 0.05$).

Sitrat–kaplı RhNPs'e dayanarak PC'lerin belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir [223]. PC'ler (kateşinler, gallatlar, sinnamatlar ve dihidroksibenzoik asitler) RhNPs'in boyutunu değiştirir. Daha sonra RhNPs'in LSPR'si değişir ve bu da RhNPs süspansiyonlarında analite özgü spektral ve renk geçişlerine yol açar. Sitrat–RhNPs koyu yeşil renkli bir renge sahiptir ve 200 nm'ye yakın ultraviyole bölgesinde güçlü bir geniş absorbans bandı ile görünür alanda sürekli bir absorbans paterni sergiler. Yeni absorbans maksimumları 350 nm'de ve 450 nm ve 580 nm'de gözlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak çay numunelerinde toplam fenolik içeriğin ve toplam kateşin içeriğinin parmak izinin elde edilmesini sağlayan RhNPs bazlı analiz geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Sonuçlar TP (R = 0.927) ve kateşin içerik ölçümü için yaygın olarak kullanılan yöntemler ile korelasyon göstermiştir (R = 0.832).

Sharpe ve ark. [224] polifenol tespiti/değerlendirmesi için kâğıt üzerinde, farklı MNPs (seryum oksit, titanil oksalat, demir oksit ve çinko oksit) kullanıp bir kolorimetrik yöntem olarak bir algılama dizisi geliştirdi. Antioksidan saptama mekanizması, kendine özgü spektral özellikleri ve karakteristik renkleriyle metal oksitlerin yüzey komplekslerini polifenoller ile oluşturma yeteneğine dayanmaktadır. Renk değişimi, standart / numunenin konsantrasyonu ve içsel AOC'sine ve ayrıca metal oksit tipine bağlıdır. Gıdada yaygın olarak bulunan on beş polifenol başarılı bir şekilde test edilmiş, bunların cevabı doğrudan bir AOC değerlendirmesinde ve bir antioksidan veri tabanının geliştirilmesinde kullanılmıştır. Sensör dizisinin performansı ORAC testi ile karşılaştırılmış olup doğrudan bir korelasyon bulunamamıştır. Bununla birlikte, portatif bir renk okuyucusu kullanılarak geliştirilen kolorimetrik veri tabanı, yeşil çay ekstrelerinde majör polifenolik bileşenleri tanımlayabilmiş ve nicelleştirebilmiştir.

Kuantum noktalar (QDs) son zamanlarda analitik kimyada büyük ilgi çeken NPs'tir. QDs türleri boyuta bağlı floresan özelliklerine sahip yarı iletken nanokristallerdir. Geleneksel organik floresan probları ile kıyaslandığında, QDs türleri geniş bant uyarma, dar bant genişliği ve yüksek yoğunluklu emisyon gibi birçok avantaja sahiptir [225]. QDs biyolojik uygulamalarda floroforlar kadar önemli hale gelmiştir çünkü çekirdek boyutu, şekli ve materyalinin bir fonksiyonu olarak floresan emisyonunu ayarlama potansiyeline sahiptir [226].

L–sistein kaplı CdTe–QDs'e dayanan bir antioksidan aktivite tayini yönteminde CdTe–QDs'in UV ile indüklenen ağartmasından yararlanılarak antioksidan/PC'lerin (süpürme aktiviteleri nedeniyle) inhibitör etkisinin ölçümü kullanılmıştır [225]. Kuarsetin, annik asit, kafeik asit, gallik asit, naringin, trolox ve dört farklı çay türü örnekleri ROS tarafından indüklenen indirgeme foto–ağartma etkisine dayanarak çalışıldı. AOC'yi değerlendirmek için foto–ağartmanın antioksidan / polifenolik logaritmik konsantrasyonuna göre nispi inhibisyonu çizilerek elde edilen sigmoidal eğri kullanılmıştır. Sonuçlar FC testi ile karşılaştırılmış ve iyi bir korelasyon göstermiştir (R = 0.996). Çalışmada AOC yöntemleri ile yapılan bir karşılaştırma bildirilmemiştir.

Ayrıca lakkazın enzimatik reaksiyonundan yararlanarak dolaylı bir polifenol miktar yöntemi geliştirilmesi için CdTe–QDs kullanılmıştır [226]. İkinci aşamada polifenoller QDs floresanını söndüren mono/polikuquinonlara dönüştürülür. Kinonlardan QDs'e olan bu yük transferi dolaylı polifenol optik göstergesi olarak kullanılmıştır. Benzer bir yaklaşımla başka bir çalışma da yapılmıştır [232]. 582 nm'de ışın yayan CdTe–QDs sentezlenmiş ve enzim ile konjuge edilmiştir. Kateşin, epikatechin ve epigallokateşin–gallat analitleri model analitler olarak kullanılmış ve farklı süpürme aktiviteleri gözlenmiştir. Yöntem katkı yapılmış bitki ekstrelerinde polifenollerin saptanması için iyi geri kazanım değerleri vermiştir. Mevcut metotlarla karşılaştırma yapılmamıştır. Analit varlığında CdTe–QDs floresan geri kazanımı Dwiecki ve ark. [227] tarafından da çalışılmıştır. Polifenoller, CdTe–sodyum periodat sistemi için elektron donorları olarak işlev görerek, QDs'ten gelen uyarılmış elektronların, polifenollerin yokluğunda ortaya çıkan alıcı moleküllere transferinin engellenmesine yol açmıştır. Floresans, 530 nm'de uyarma ile 564 nm'de ölçülmüştür. Floresan şiddetindeki artış kullanılan antioksidan konsantrasyonuna (kateşin, kuersetin, rutin, klorojenik asit, gallik asit, kafeik asit) doğrusal olarak bağımlıdır. Sıklıkla tüketilen içeceklerdeki PC'ler (kahve, çay ve

bitkisel infüzyonlar) başarılı bir şekilde belirlenmiş ve FC ile karşılaştırılmıştır. Standartların reaktivitesindeki farklılıklar nedeniyle yöntem AOC'yi fenolik içerikten daha fazla bulmaktadır.

Zeytinyağı özlerinin polifenol fraksiyonunun değerlendirilmesi için GRQDs yöntemi kullanılmıştır [228]. Mavi renkli GRQDs sitrik asitin pirolizi ile elde edilmiştir. Yöntem istifleme ve kovalent olmayan etkileşimler yoluyla GRQDs üzerinde fenoller tarafından elde edilen floresan söndürmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada GRQDs ortalama çapı 3.6±0.9 nm olan düz dairesel nanotabakalar kullanıldı. Oleuropein, GRQDs flüoresansını, GRQDs'in donör olarak hareket ettiği bir yük transfer mekanizması vasıtasıyla söndürebildi. Emisyon bandı (474 nm'de), gerçek numunelerden fenoller eklendiğinde ortak bir yük aktarımı floresansının söndürülmesini gösterdiği için yeşil bir kaymaya uğramaktadır. Ek olarak, çözücünün polaritesi arttırılğında bir yük aktarma söndürme mekanizmasını arttırdığı için daha yüksek söndürme gözlenmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği dört farklı gerçek zeytinyağı örneğinde değerlendirilmiş ve FC yöntemine benzer yanıtlar elde edilmiştir. Polifenoller ile GRQDs'in spesifik olmayan etkileşimleri nedeniyle daha karmaşık gıda matrisleriyle çalışılması sınırlanmıştır. Lüminesan mavi GRQDs kâğıt tabanlı bir algılama cihazında akıllı telefon okuma ile ölçüm alınarak algılama probu olarak kullanılmış ve şarap örneklerinde flavonoid içeriğine ilişkin AOC değerlendirmesi için önerilmiştir [229]. Nitroselüloz şeritlerde mumlu noktalara GRQDs eklenmiş ve 365 nm dalga boyunda 5 mM'lik 20 mA LED UV kaynağı olarak kullanılmıştır. 4–8 μL analit/numune kâğıt şeridindeki floresan algılama alanına eklenmiş ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra resimler bir akıllı telefon ile alınmıştır. PC'ler farklı seviyelerde GRQDs söndürülmesine neden olmuştur (morin> myricetin> quercetin> kaempherol) ve sensörler flavonoid yapıyı tespit edebilmiştir. Farklı şarap örnekleri bu kâğıt sensörü kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar AOC ölçümlerindeki farklılıklar şarap yaşlanmasına bağlanmıştır. Elde edilen ilginç sonuçlara rağmen, AOC'nin bir akıllı telefon kullanarak bu yöntemle değerlendirme kabiliyetinin hala kanıtlanması gerekmektedir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG WAS220X marka analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Elektromag M16 girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde HI 221 Calibration Check Microprocessor pH–metre, gümüş nanoparçacık çözeltisinin hazırlanmasında Velp Scientifica manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, Varian Cary Bio 100 model UV–görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyonun yapılması için FEI Model Quanta 450 FEG marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; gümüş nitrat ($AgNO_3$), trisodyum sitrat, asetik asit, bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$), neokuproin (2,9–dimetil 1,10–fenantrolin), amonyum asetat, sodyum asetat, etil alkol (%96), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), gallik asit (GA), kafeik asit (CFA), klorojenik asit (CHA), kuersetin (QR), (–) epikateşin gallat (ECG), (–) epikateşin (EC), (+) kateşin (CT), L–askorbik asit (AA), rutin (RT), α–tokoferol, troloks (TR) ve ferulik asit'tir (FR). Kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Elma, vişne, üzüm, nar ve şeftali suları ile yeşil çay yerel marketlerden, biberiye, mercanköşk ve adaçayı yerel aktardan temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. AgNPs için Gerekli Kimyasal Çözeltiler

$AgNO_3$ stok çözeltisi, $5x10^{-3}$ M olacak biçimde gümüş nitrattan 0.0424 g tartım alınıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanacak şekilde hazırlandı. Trisodyum sitrat çözeltisi, % 1'lik (w/v) olacak biçimde trisodyum sitrat–2–hidrattan 0.5 g tartım alınıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çözeltiler ile aşağıda ayrıntıları verilen AgNPs sentez yöntemi uygulandı.

3.3.2. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Tayininde (CUPRAC) Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Cu(II) klorür çözeltisi, bakır(II) klorür dihidrat'tan ($CuCl_2.2H_2O$) 0.4262 g tartım alınarak saf su ile 250 mL'ye tamamlanıp $1.0x10^{-2}$ M konsantrasyonda hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, NH_4Ac'dan 19.27 g tartım alınarak saf su ile 250 mL'ye tamamlanıp 1 M (pH=7.0) konsantrasyonda hazırlandı.

3.3.3. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması

Meyve suyu örnekleri analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirildi ve istenilen oranda etanolle seyreltilerek ilgili analizlerde kullanıldı.

3.3.4. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

Bitkisel örneklerin ekstraksiyonu diğer klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlı ve verimli olan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır. Bitki örnekleri 0.1 g tartılıp üzerine 20 mL MeOH - H_2O (80:20, v/v) ilave edildi. Örnekler mikrodalga ekstraksiyon cihazında 5 dakika 80 °C'de ekstrakte edildi ve adi süzgeç kâğıdından süzüldükten sonra analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip istenilen oranda etanolle ile seyreltildi.

3.3.5. Yeşil Çay İnfüzyonunun Hazırlanması

2 g'lık yeşil çay poşeti 250 mL kaynamış suya ilk 2 dakika boyunca batırılıp çıkarılarak infüzyonu sağlandı. Sonraki 3 dakika boyunca ise demlemeye bırakıldı (toplam demlenme süresi 5 dakika). Poşet çay demlenmeye bırakıldığı kaynamış sudan çıkarıldı ve çözeltiler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip istenilen oranda etanolle seyreltildi.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Gümüş Nanoparçacıkların (AgNPs) Sentezi

Özyürek ve ark. [18] tarafından uygulanan yöntem kullanılmış olup; bu yöntemde gümüş nanoparçacık sentezi için 1.0 mM konsantrasyondaki 50 mL gümüş nitrat çözeltisi kaynayana kadar (10 dakika boyunca) reflüks altında ısıtılıp ardından manyetik karıştırıcı ile karıştırmaya

devam edilirken çözeltiye damla damla % 1'lik trisodyum sitrat çözeltisinden 5 mL ilave edilmiştir. Sonrasında 5 dakika daha reflüks altında ısıtma yapılarak açık sarı renkli gümüş nanoparçacık (AgNPs) çözeltisi elde edilmiştir. Uygulanan sentez yöntemi ile Ag^+ iyonları trisodyum sitrat ile indirgenerek nano boyutta küresel nanoparçacıklar oluşturulmuştur.

$$2\,Ag^+ + (CH_2COONa)–C(OH)(COONa)–(CH_2COONa) \longrightarrow 2\,Ag^0 + (CH_2COONa)–CO–(CH_2COONa) + Na^+ + H^+ + CO_2\uparrow \quad (3.1)$$

3.4.2. Nano–sensörün (AgNPs İçeren Modifiye Kitosan Esaslı Kompozit Film) Sentezi

Ag solü içeren modifiye kitosan film sentezlemek için ilk olarak ön denemeler gerçekleştirilmiş ve mekanik özellikleri açısından en uygun olan oran ile çalışmaya devam edilmiştir (Tablo 3.1). Katı faz nano-sensörün sentezi için öncelikle %2 oranında asetik asit içerecek biçimde 1 mL asetik asit ile asitlendirilen 50 mL Ag solü içerisine 0.75 g düşük molekül ağırlıklı kitosan ilave edilerek %1.5'luk kitosan çözeltisi hazırlandı ve oda sıcaklığında mekanik karıştırıcıda 150–200 rpm hızda 3 saat karıştırıldı. Takiben 0.375 g GPTMS (0.35 mL) çapraz bağlayıcı olarak ortama ilave edildi ve mekanik karıştırıcıda, oda sıcaklığında, 150–200 rpm hızda 1 saat daha karıştırıldı. Hazırlanan homojen karışımın tümü, teflon "casting plate" içine döküldü. Ardından, teflon döküm kabı içerisine dökülerek elde edilen filmin kuruması için etüvde kademeli bir ısıtma periyodu uygulandı; 40 ^oC'de 2 saat, 50 ^oC'de 18 saat, 60 ^oC'de 4 saat olmak üzere kurutuldu.

Tablo 3.1: Ag solü içeren modifiye kitosan film sentezi için optimum sentez şartları.

Ön Deneme No	Ag solü	Kitosan Türü	Karıştırma şartları	Çapraz bağlayıcı Türü ve Oranı	Isıtma Periyodu	Döküm kabı	Film oluşumu
7	+	Düşük MA	Mekanik karıştırıcı Oda sıcaklığı 150–200 rpm hız 3 saat süresince	GPTMS kitosan/GPTMS ağırlıkça oranı 1/1	40^oC – 2 h. 50^oC – 18 h. 60^oC – 4 h.	Teflon döküm kabı (çap 10 cm)	Döküm tekniği (25 mL)

3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Sentezlenen gümüş nanoparçacıklı modifiye kompozit filmin SEM görüntülerinin elde edilebilmesi için kompozit film alüminyum tabaka üzerine yapıştırılan karbon bant üzerine yerleştirildi. Örnekler SHUR/Freeze Cryogen sprey püskürtülerek dondurulup vakum altında

($6x10^{-2}$ mbar) kurutuldu. AgNPs'in görüntüleri SEM modunda ve istenen büyütmeyle elde edildi. Sonuçlar Bölüm 4.1'de verilmiştir.

3.4.4. Geliştirilen Katı Faz Nano–sensör Yöntemi ve Optimum Deney Şartlarının Belirlenmesi

Yöntemde bir deney tüpü (1x15 cm) içerisine sırasıyla x mL standart antioksidan çözeltisi veya gerçek örnek çözeltisi ve (8–x) mL etanol ilave edilip iyice çalkalandı. Ag nanoparçacık katkılı modifiye kitosan kompozit film örnekleri uygun büyüklüklerde (4.5x0.5 cm) kesilerek antioksidan kapasite tayininin optimum koşullarını (inkübasyon süresi ve pH) belirlemek üzere standart antioksidan çözeltileri ile muamele edildi (Şekil 3.1). Referans çözeltiye (standart antioksidan bileşik içermeyen) daldırılan nano–sensörün absorbansına göre (A_0), örnek çözeltisinde antioksidan varlığında antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenmektedir. Absorbanstaki bu artış (ΔA), 60 dakika sonunda 423 nm dalga boyunda referans çözeltiye karşı okundu.

x mL antioksidan çözeltisi veya gerçek örnek + (8 – *x*) mL etanol (3.2)



Şekil 3.1: Hazırlanan kitosan esaslı kompozit filmler.

3.4.5. Nano–sensörün Standart Polifenolik Bileşiklere ve Sentetik Karışımlarına Uygulanması ile TEAC ve TAC Değerlerinin Elde Edilmesi

Gerçekleşen reaksiyon sonucunda polifenollerin reaktif Ar–OH grupları ilgili kinonlara yükseltgenirken, Ag+ iyonları 423 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon gösteren renkli gümüş nanoparçacıklara (çekirdek–kabuk oluşumu) indirgenmektedir (fizyolojik açıdan önemli antioksidanlar için standart potansiyel E0= 0.2–0.6 V, E0Ag(I),Ag= 0.8 V).

$$n\ Ag^{+} + Ar(OH)_n \longrightarrow n\ Ag^{0} + Ar(=O)_n + n\ H^{+} \quad (3.3)$$

A_0 başlangıç absorbansına sahip kompozit filmin, antioksidan varlığında absorbansında (A) artış gözlenmektedir. Antioksidan varlığında ve yokluğunda elde edilen absorbans değerleri arasındaki fark (ΔA) değeri belirlenmiştir.

Troloksun molar absorplama katsayısı (ε) yardımıyla standart antioksidan bileşiklerin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri (TEAC) aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$TEAC = \frac{\Delta A \pm kayım}{\varepsilon_{Troloks}} x \frac{Toplam\ Hacim}{Alınan\ Örnek\ Hacmi} x\ 10^{3} \quad (3.4)$$

Antioksidan bileşiklerin her birinin etanollü çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda ikili ve üçlü sentetik karışımlar hazırlandı. Sentetik karışımların beklenen ve deneysel ölçülen antioksidan kapasiteleri nano–sensör ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak mM troloks eşdeğeri cinsinden Eşitlik 3.3 ve 3.4'e göre hesaplandı.

$$TAC_{Beklenen} = TEAC_1.C_1 + TEAC_2.\ C_2 + TEAC_3.\ C_3 \quad (3.5)$$

(TEAC: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite; C: konsantrasyon)

$$TAC_{deneysel} = \frac{Absorbans \pm kayım}{\varepsilon_{TR}} x\ 10^{-3} \quad (3.6)$$

Polifenolik antioksidanları ihtiva eden çeşitli gıda örneklerinin ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan ekstraktlarının toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$TAC_{mmol/g} = \frac{Absorbans \pm kayım}{\varepsilon_{TR}} x \frac{Toplam\ Hacim\ (mL)}{Örnek\ Miktarı\ (g)} \quad (3.7)$$

3.4.6. Nano–sensör ile Elde Edilen Verilerin Referans Yöntem (CUPRAC) Bulguları ile Kıyaslanması

Referans yöntem olarak yukarıda ayrıntıları verilen Apak ve ark. [75] tarafından geliştirilen Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Tayin yöntemi; CUPRAC yöntemi seçilmiştir.

$$n\ Cu(Nc)_2^{2+} + n\text{–elektron indirgen (AO)} \rightarrow n\ Cu(Nc)_2^{+} + n\text{–elektron yükseltgen ürün} + n\ H^{+} \quad (3.8)$$

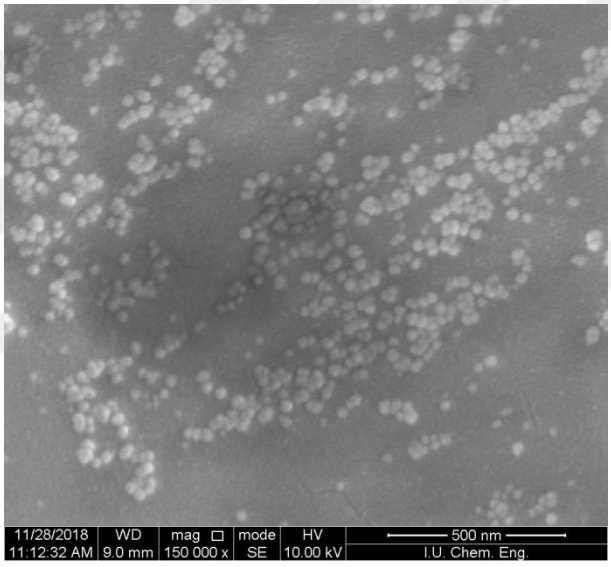
Bir deney tüpü içerisine 1'er mL 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5 x 10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan sırasıyla eklendi. Üzerine (x) mL standart antioksidan çözeltisi ve (1.1–x) mL H_2O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 mL olacak biçimde çözeltiler hazırlandı ve tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı, oluşan Cu(I)–neokuproin kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

$$1mL\ Cu(II) + 1mL\ Nc + 1mL\ tampon + x\ mL\ örnek\ çöz. + (1.1–x)\ mL\ H_2O \quad (3.9)$$

4. BULGULAR

4.1. NANO-SENSÖRÜN SEM ANALİZİ İLE KARAKTERİZASYONU

Elde edilen modifiye kitosan kompozit film esaslı nano-sensörün yüzeyindeki gümüş nanoparçacıkların SEM görüntüleri aşağıda (Şekil 4.1) verilmiştir. Buna göre gümüş nanoparçacıkların küre şeklinde, tek düze (uniform) dağılımlı ve uygun boyut dağılımında homojen parçacıklar olduğu kolaylıkla görülmektedir. Oluşan gümüş nanoparçacıkların boyutları 30-60 nm aralığındadır.

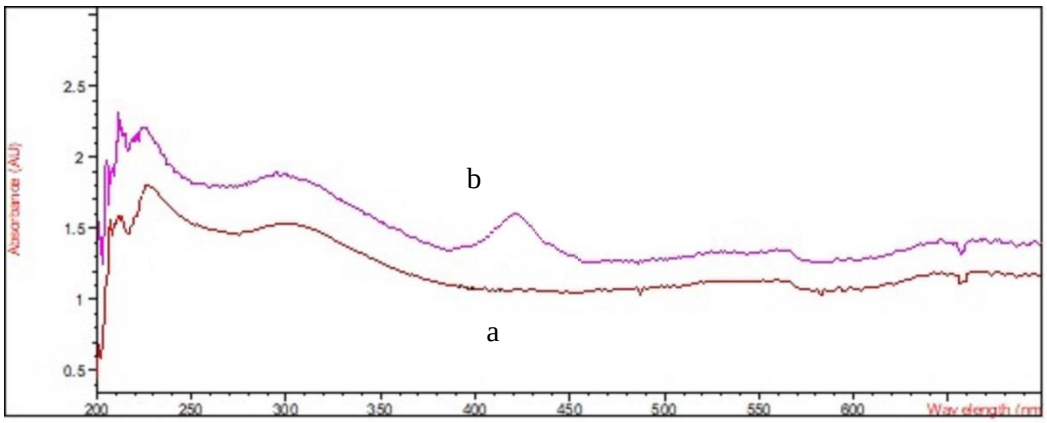


Şekil 4.1: Elde edilen nano-sensörün yüzeyindeki gümüş nanoparçacıkların SEM görüntüsü.

4.2. OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

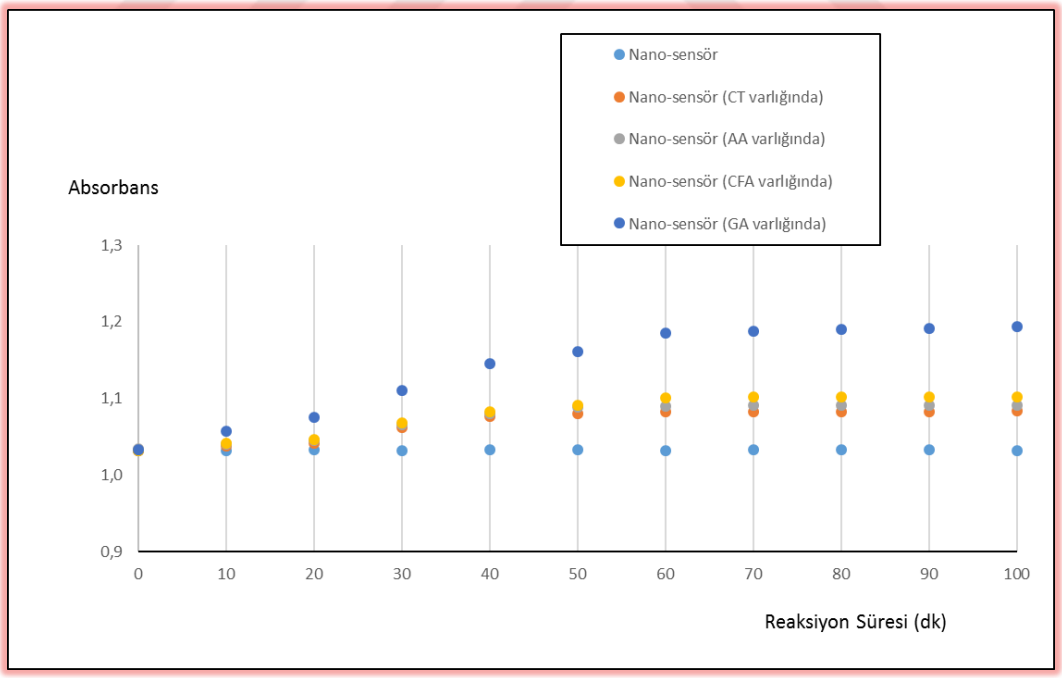
4.2.1. Nano–sensör Yöntemi için Uygun İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi

Nano–sensör yönteminde; bir tüpe x mL antioksidan çözeltisi ve (8–x) mL etanol; bir diğer tüpe 8.0 mL etanol ilave edilip karıştırıldıktan sonra antioksidan varlığında ve yokluğunda nano–sensörde oluşan zamana bağlı değişim 423 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak incelenmiştir. Öncelikle standart antioksidan çözeltilerinden gallik asitin yokluğunda ve varlığında (1.0 mM'lık gallik asit çözeltisi) nano–sensörün absorpsiyon spektrumu Şekil 4.2'de gibi elde edilmiştir. 423 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon gösteren renkli gümüş nanoparçacıklarının absorpsiyon gücü antioksidan varlığında artmıştır.



Şekil 4.2: Gallik asit yokluğunda (a) ve varlığında (b) nano-sensörün UV–görünür bölge spektrumları.

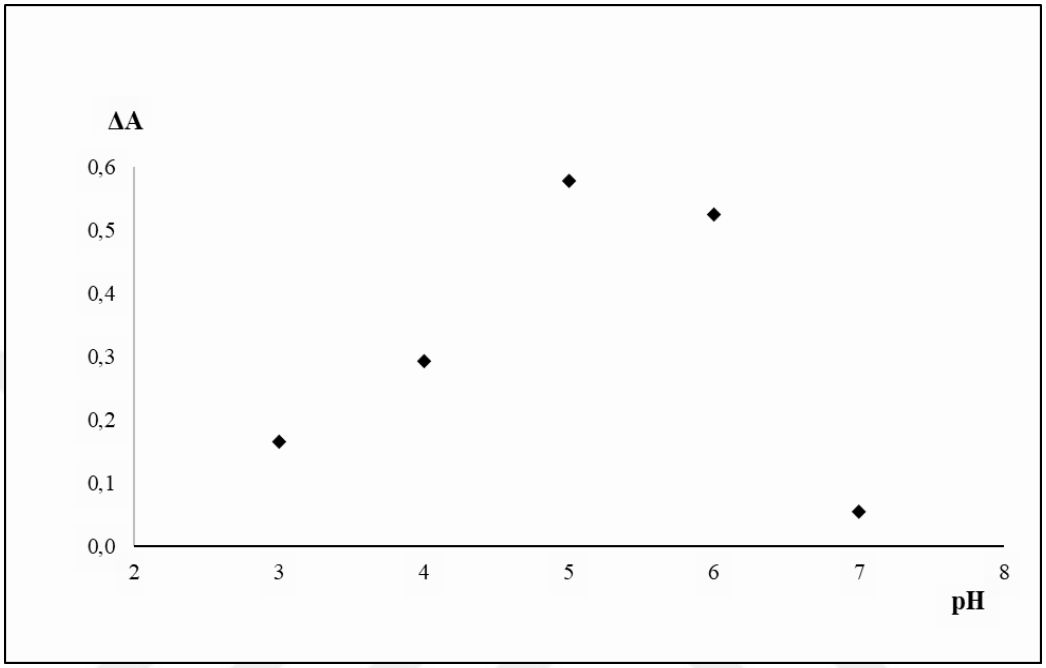
Nano-sensörün inkibasyon süresinin belirlenmesi için 0.5 mM'lık farklı standart antioksidan çözeltileri (GA, CT, CFA ve AA) ile çalışıldı ve optimum reaksiyon süresi 60 dakika olarak belirlendi. Nano-sensörün zamana bağlı olarak verdiği cevaplar Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3: Etanol (referans çözelti) ve GA, CT, CFA ve AA varlığında nano–sensörün reaksiyon kinetiği.

Nano-sensör antioksidan etkileşimini sağlayacak ve maksimum cevabı verecek en uygun pH değerinin belirlenmesi için pH 3–7 aralığında çalışıldı. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi pH 3 ve 5

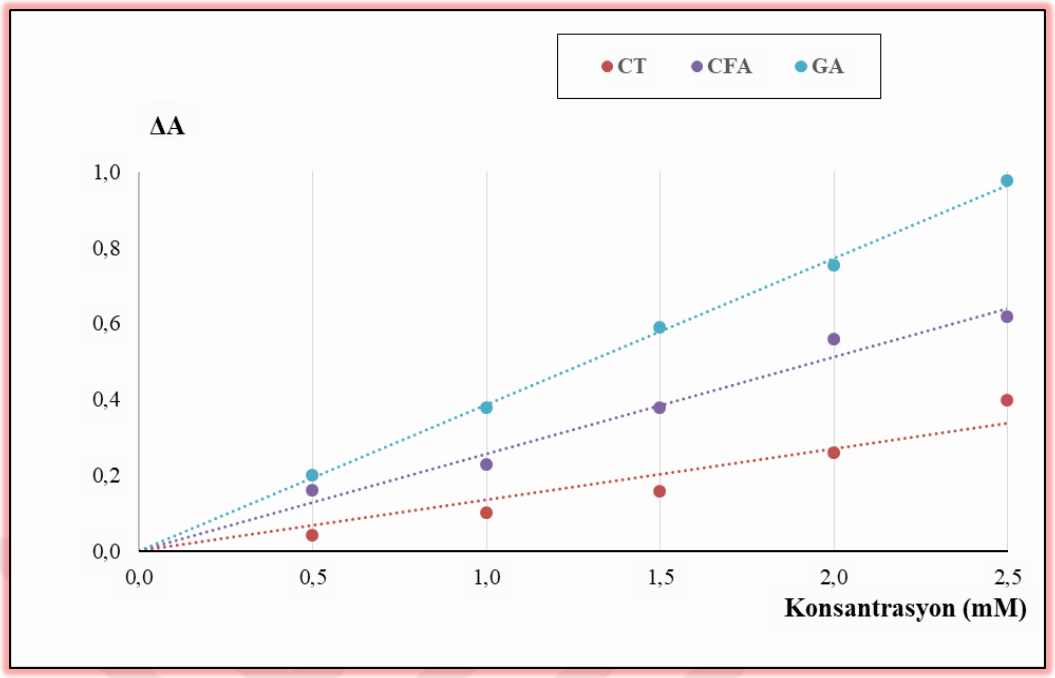
arasında AgNP'lerin absorbansı artmıştır. En yüksek absorbans ise pH 5'te gözlenmiştir. Buna göre, optimum çalışma pH'ı; 0.1 M asetik asit-sodyum asetat tamponu ile 5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda nano–sensöre pH'ın etkisi.

4.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN GELİŞTİRİLEN KATI FAZ NANO-SENSÖR YÖNTEMİ İLE KALİBRASYON GRAFİKLERİNİN ELDE EDİLMESİ

Kateşin (CT), kafeik asit (CFA) ve gallik asit (GA) gibi bazı polifenolik bileşiklere geliştirilen nano-sensör yöntemi uygulanarak standart antioksidan maddelerin kalibrasyon grafikleri elde edildi. Örnek olarak kateşin (CT), kafeik asit (CFA) ve gallik asitin (GA) kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5: Polifenolik bileşiklerden kateşin (CT), kafeik asit (CFA) ve gallik asitin (GA) nano–sensör yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.

Tez kapsamında çalışılan diğer polifenolik bileşiklerin kalibrasyon eğrileri ve bu antioksidan maddelere ait molar absorplama katsayıları (ε) Tablo 4.1'de bir arada verilmiştir.

Tablo 4.1: Antioksidan bileşiklerin nano–sensör yöntemiyle elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve molar absorptiviteleri.

Antioksidan Türü	**Antioksidan**	**Doğru denklemi ve korelasyon katsayısı (r)**	**ε (L mol^{-1} cm^{-1})**
Basit Fenolik Asit	Gallik Asit	$A_{423} = 0.3858 \times 10^3 C_{TR} + 0.00002$ r = 0.9981	385.8
Hidroksisinamik Asit	Kafeik Asit	$A_{423} = 0.2410 \times 10^3 C_{CFA} + 0.0061$ r = 0.9776	241.0
Hidroksisinamik Asit	Klorojenik Asit	$A_{423} = 0.2325 \times 10^3 C_{CHA} + 0.0142$ r = 0.9617	232.5
Flavonol	Kuersetin	$A_{423} = 0.6035 \times 10^3 C_{TR} + 0.00001$ r = 0.9981	603.5
Flavan-3-ol	Kateşin	$A_{423} = 0.1745 \times 10^3 C_{CT} - 0.0152$ r = 0.9419	174.5
Flavan-3-ol	Epikateşin	$A_{423} = 0.1315 \times 10^3 C_{EC} + 0.1687$ r = 0.9582	131.5
Flavon	Rutin	$A_{423} = 0.4130 \times 10^3 C_{RT} + 0.0977$ r = 0.9440	413.0
Basit Fenolik Asit	Ferulik Asit	$A_{423} = 0.1070 \times 10^3 C_{CFA} + 0.1041$ r = 0.9539	107.0
Basit Fenolik Asit	Vanilik Asit	$A_{423} = 0.1230 \times 10^3 C_{VA} + 0.0907$ r = 0.9143	123.0
Diğerleri	Askorbik Asit	$A_{423} = 0.2160 \times 10^3 C_{AA} + 0.3063$ r = 0.9582	216.0
Diğerleri	Troloks	$A_{423} = 0.12174 \times 10^3 C_{TR} + 0.00001$ r = 0.9800	121.74
Kalibrasyon doğrularındaki sembollerden c: molar konsantrasyon, A_{423}: absorbans ve r: korelasyon katsayısıdır.			

4.3.1. Antioksidan Bileşiklerin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi ve CUPRAC Yöntemiyle Karşılaştırılması

Antioksidan bileşiklerin nano–sensör yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemine göre TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) katsayıları hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her iki yönteme göre referans bileşik olarak kullanılan troloksun kalibrasyon doğru denklemleri ve molar absorptiviteleri aşağıda verilmiştir. Bu molar absorplama katsayıları kullanılarak antioksidan bileşiklerin TEAC katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

Nano–sensör yöntemine göre;

Nano–sensör yöntemine göre;

$$A_{423} = 0.12174 \times 10^{3} C_{TR} + 0.00001 \quad (4.1)$$

r = 0.9800

$\varepsilon_{TR} = 121.74\ L\ mol^{-1}cm^{-1}$

CUPRAC yöntemine göre;

$$A_{450} = 1.67 \times 10^{4} C_{TR} - 3.72x10^{-3} \quad (4.2)$$

r = 0.9997

$\varepsilon_{TR} = 1.67 \times 10^{4}\ L\ mol^{-1}cm^{-1}$

Nano–sensör yöntemine göre ilgili analitin TEAC katsayısı, ilgili analitin absorptivitesi troloksun molar absorptivitesine oranlanarak bulunmaktadır. Aşağıda gallik asidin (GA) TEAC katsayısının hesaplanması örneği verilmiştir.

ε_{TR}: $121.74\ L\ mol^{-1}cm^{-1}$

ε_{GA}: $385.8\ Lmol^{-1}cm^{-1}$

$$TEAC_{GA} = \varepsilon_{GA}/\varepsilon_{TR} = 3.170 \quad (4.3)$$

CUPRAC yöntemine göre de TEAC katsayısı aynı şekilde bulunmaktadır ve yine gallik asidin (GA) TEAC katsayısının hesaplanması örneği aşağıda verilmiştir.

ε_{TR}: 1.67 x 10^4 $Lmol^{-1}cm^{-1}$

ε_{GA}: 4.39 x10^4 $Lmol^{-1}cm^{-1}$

$TEAC_{GA} = \varepsilon_{GA}/\varepsilon_{TR} = 2.62$

Tablo 4.2: Bazı antioksidanların nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları.

Antioksidan Türü	Antioksidan	$TEAC_{NANO\text{-}SENSÖR}$ [a]	$TEAC_{CUPRAC}$ [b]
Basit Fenolik Asit	Gallik Asit	3.170	2.620
Hidroksisinamik Asit	Kafeik Asit	2.000	2.800
Hidroksisinamik Asit	Klorojenik Asit	1.910	2.470
Flavonol	Kuersetin	4.955	4.380
Flavan-3-ol	Kateşin	1.435	3.090
Flavan-3-ol	Epikateşin	1.080	2.770
Flavon	Rutin	3.400	2.560
Diğerleri	Askorbik Asit	1.775	0.960
[a] TEAC katsayıları; ($p = 0.05$, $F_{deneysel} = 0.308$, $F_{tablo} = 4.747$, $F_{deneysel} < F_{tablo}$). [b] Katsayılar kaynak 75 ve 233'ten alınmıştır.			

4.3.2. Sentetik Antioksidan Karışımı Çözeltilerinin Nano–sensör ile TAC Ölçümü

Konsantrasyonları 1.0 mM olan antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda ikili ve üçlü karışımlar hazırlanıp geliştirilen nano–sensör yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve ölçülen toplam antioksidan kapasiteleri hesaplandı ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.3). Sentetik antioksidan karışımlarının teorik olarak beklenen antioksidan kapasiteleri farkı en fazla ± % 5.4'tür. Değerlerin uyumundan hareketle esas olarak Lambert-Beer kanunundan kimyasal sapmalar yoktur ve antioksidan karışımları varlığında oluşan AgNP'lerin plazmon absorbansları toplamsaldır.

Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin nano–sensör yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TAC değerlerinin karşılaştırılması.

Karışımın İçeriği	$TAC_{bileşen}$	TAC_{teorik}	$TAC_{deneysel}$
1.0 mM GA 1.0 mM QR	$3.170x10^{-3}$ $4.955x10^{-3}$	$8.125x10^{-3}$	$7.690x10^{-3}$
1.0 mM GA 1.0 mM CFA	$3.170x10^{-3}$ $2.000x10^{-3}$	$5.170x10^{-3}$	$5.060x10^{-3}$
1.0 mM GA 1.0 mM CT	$3.170x10^{-3}$ $1.435x10^{-3}$	$4.605x10^{-3}$	$4.670x10^{-3}$
1.0 mM RU 1.0 mM CFA	$3.400x10^{-3}$ $2.000x10^{-3}$	$5.400x10^{-3}$	$5.660x10^{-3}$
1.0 mM GA 1.0 mM CFA 1.0 mM QR	$3.170x10^{-3}$ $2.000x10^{-3}$ $4.955x10^{-3}$	$9.125x10^{-3}$	$10.390x10^{-3}$
$p = 0.05$, $F_{deneysel} = 0.0226$, $F_{tablo} = 5.3177$, $F_{deneysel} < F_{tablo}$.			

4.3.3. Nano–sensörün Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımın Belirlenmesi

Geliştirilen nano–sensör yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının belirlenebilmesi için yeşil çay ekstraktlarına rutin (RT), gallik asit (GA) ve kateşin (CT) standart çözeltilerinin bilinen miktarlarda katkısı yapıldı (Tablo 4.4). Bir tüpe 0.8 mL yeşil çay infüzyonu ve 10 mM stok RT çözeltisinden 0.8 mL alınıp 8 mL'ye etanolle tamamlandı. GA ve CT ölçümleri için de aynı şekilde çözeltiler hazırlandı. Böylece yapılan RT, GA ve CT katkılarının son konsantrasyonunun 1.0 mM olması sağlandı. RT, GA ve CT katkısı yapılan çözeltilere ayrı ayrı nano–sensör yöntemi uygulandı ve elde edilen geri kazanım değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4: Geliştirilen nano–sensör yönteminin uygulanması ile yeşil çay örneklerinde RT, GA ve CT'nin geri kazanımı (N=3).

Eklenen Kons.	TAC_{teorik} (mM)	$TAC_{deneysel}$ (mM)	Geri Kazanım (%)
1.0 mM RT	3.400	3.055 ± 0.047	90
1.0 mM GA	3.170	2.910 ± 0.035	92
1.0 mM CT	1.435	1.278 ± 0.024	89

4.4. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

4.4.1. Bazı Meyve Sularındaki TAC Tayini için Katı Faz Nano-sensör Yönteminin Uygulanması

Meyve suyu örnekleri Bölüm 3.3.4'te anlatıldığı gibi hazırlandı ve geliştirilen yöntem elma, şeftali, vişne, üzüm ve nar suyuna uygulandı. Meyve sularının toplam antioksidan kapasiteleri geliştirilen nano–sensör yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemi uygulanarak belirlendi. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mM TR) cinsinden Eşitlik 4.4 kullanılarak belirlendi. Eşitlikte; A ölçülen absorbans değerini, εTR troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı, Vf toplam hacmi, Vs analiz için alınan örnek hacmini ve r seyrelme faktörünü gösterir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mM TR)} = (A / \varepsilon_{TR}).(Vf / Vs).\ r \qquad (4.4)$$

Nano-sensör ve CUPRAC yöntemlerinin uygulanması ile bazı meyve sularında bulunan TAC değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5: Bazı meyve sularının nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mM–TR eşdeğeri) (N=3).

Meyve Suyu	$TAC_{NANO\text{-}SENSÖR}$ (mM–TR eşdeğeri)	TAC_{CUPRAC} (mM–TR eşdeğeri)
Elma Suyu	1.12 ± 0.019	1.40 ± 0.021
Şeftali Suyu	0.87 ± 0.018	1.20 ± 0.020
Vişne Suyu	7.70 ± 0.104	8.50 ± 0.102
Üzüm Suyu	20.05 ± 0.221	23.0 ± 0.228
Nar Suyu	37.53 ± 0.451	37.0 ± 0.396
$p = 0.05$, $F_{deneysel} = 0.0061$, $F_{tablo} = 5.3177$, $F_{deneysel} < F_{tablo}$.		

4.4.2. Bazı Bitki Ekstrelerinin TAC Tayini için Katı Faz Nano–sensör Yönteminin Uygulanması

Bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri, nano–sensör ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mmol TR /g–örnek) cinsinden Eşitlik 4.5 kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mmol TR/g–örnek)} = (A / \varepsilon TR).(Vf / Vs).(Vi / m).r \quad (4.5)$$

Eşitlikte; A ölçülen absorbans değerini, εTR troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı, Vf toplam hacmi, Vs analiz için alınan örnek hacmini, ekstraksiyon için alınan solvent hacmi, m alınan örnek miktarı ve r seyrelme faktörünü gösterir. Geliştirilen yöntem biberiye, mercanköşk ve adaçayı ekstrelerine uygulandı ve bitki ekstreleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.6: Bazı bitki ekstrelerinin nano–sensör ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri (N=3).

Bitki ekstreleri	Nano–sensör yöntemi (mmol TR / g–örnek)	CUPRAC yöntemi (mmol TR / g–örnek)
Biberiye	0.85 ± 0.011	0.83 ± 0.006
Mercanköşk	1.02 ± 0.014	1.09 ± 0.011
Adaçayı	7.93 ± 0.084	7.86 ± 0.110

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında polifenolik bileşiklerin, bu bileşikleri içeren sentetik antioksidan karışımlarının ve gerçek örneklerin (meyve suları ve bitki ekstreleri gibi) toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için katı fazda gümüş nanoparçacık içeren modifiye kitosan kompozit film esaslı bir nano–sensöre dayalı yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Nanoparçacıklar kullanılarak yeni bir antioksidan analiz yöntemi geliştirilmesinde izlenecek optik özelliklerin nanoparçacık oluşum yöntemine ve dolayısıyla indirgenme prosesine bağlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır [83]. Bu yaklaşımla geliştirilen nano–sensör yönteminde çekirdek halindeki gümüş nanoparçacıklar, gümüş iyonlarının trisodyum sitratla kimyasal olarak indirgenmesi sonucu hazırlanmıştır. Bu işlemin ikinci aşamasında, kitosan kullanılarak katı fazda bu nanoparçıkların film halinde tutulması amaçlanmıştır. Analiz aşamasında ise ikincil indirgeyici ajan olarak kullanılan polifenoller çekirdek–kabuk halindeki AgNP'lerin büyümesi için ortama ilave edilir. Polifenoller ve/veya antioksidan vitaminler ve gümüş iyonları, daha fazla Ag atomunun çekirdek yüzeyinden ayrılmasıyla sonuçlanan elektron transferine olanak sağlamak için çekirdek halindeki parçacıkların yüzeyine difüzlenir. Son olarak meydana gelen çekirdek–kabuk halindeki AgNP'ler karakteristik SPR absorpsiyonu gösterir.

Nano–sensör yönteminin ilk aşaması $AgNO_3$'ün trisodyum sitratla indirgenerek küçük boyutlu, küresel AgNP'lerin sentezlenmesini gerektirir. Bu aşamada dikarboksiaseton oluşumu gerçekleşir [18].

İkinci aşamada, %2 oranında asetik asit içerecek biçimde 1 mL asetik asit ile asitlendirilen 50 mL Ag solü içerisine 0.75 g düşük molekül ağırlıklı kitosan ilave edilerek %1.5'luk kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında mekanik karıştırıcıda 150–200 rpm hızda 3 saat karıştırıldı ve çapraz bağlayıcı ortama ilave edildi. 1 saat karıştırmanın ardından hazırlanan homojen karışımın tümü, teflon kaba döküldü ve kompozit filmin kuruması için kademeli bir ısıtma periyodu uygulandı.

Üçüncü aşamada, gümüş iyonları 423 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon gösteren çekirdek–kabuk halindeki AgNP'lerin büyümesi ile absorbansı arttırarak indirgenirken, polifenollerin reaktif Ar–OH grupları ilgili bileşiğin kinonlarına yükseltgenir (Standart

potansiyel, E°, fizyolojik açıdan önemli antioksidanlar için: 0.2–0.6 V, Ag(I)/Ag için E° = 0.8 V). Geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı nano–sensör yönteminin esası, kitosan yapısı içinde hapsolan gümüş nanoparçacıkların polifenol ortamında büyümesine ve bu büyüyen nanoparçacıkların (kabuk oluşumu) plazmon absorbansının 423 nm dalgaboyunda ölçümüne dayalıdır.

Geliştirilen nano–sensör yönteminin optimum deney koşullarından biri olan reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 100 dakika boyunca antioksidan (GA, CT, CFA ve AA) varlığında ve yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıktaki zamana bağlı değişim 423 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılarak incelendi. GA, CT, CFA ve AA gibi farklı antioksidanlar varlığında AgNP'lerin başlangıç absorbasında bir artış ve sonrasında zamanla bir stabilizasyon sağlanması nedeniyle optimum reaksiyon süresi 60 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.3).

Nano–sensör yönteminin optimum koşullarının belirlenmesi için farklı pH ortamlarında reaksiyonun değişimi incelendi. Aynı deneysel koşullar altında ve antioksidan yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıklara pH'ın etkisini incelemek için pH 3–7 aralığında çalışıldı ve gümüş nanoparçacık plazmon absorbansının en yüksek olduğu pH 5 optimum çalışma pH'ı olarak belirlendi (Şekil 4.4).

Şekil 3.1'de gösterilen açık sarı renkli nano-sensörün Şekil 4.2'de gallik asit yokluğunda (a) ve varlığındaki (b) gümüş nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Numune çözeltisine GA ilave edilmesi, 423 nm dalgaboyunda karakteristik bir plazmon absorpsiyon bandı gösteren Ag (0) nanoparçacıklarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu band AgNP'lerin yüzey plazmon rezonansından kaynaklanır ve yüzeyde elektron yoğunluğundaki periyodik bir değişimle parçacıklardaki elektronların kolektif osilasyonuna bağlanabilir. Polifenol ortamında AgNP'lerin büyümesi, önceden hazırlanmış AgNP çekirdeklerine, polifenolik bileşiklerin (GA gibi) ilave edilerek Ag (I)'in Ag (0)'a indirgenmesiyle sağlanır. Böylece antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan gümüş nanoparçacığın absorbansında artış görülmektedir.

Nano–sensör yüzeyindeki gümüş nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu yapılmıştır. Buna göre oluşan gümüş nanoparçacıkların küre şeklinde, tek

dağılımlı ve nanometre boyutunda homojen parçacıklar olduğu görülmektedir. Oluşan gümüş nanoparçacıkların boyutları 30-60 nm aralığındadır (Şekil 4.1).

AgNP'lerin absorbans değerleri polifenolik bileşiklerin konsantrasyonlarına bağlı olarak doğrusal biçimde artar. Şekil 4.5 nano–sensör yöntemine göre farklı kateşin, kafeik asit ve gallik asit konsantrasyonlarında oluşan gümüş nanoparçacıklarda meydana gelen absorbans değişimini göstermektedir. Buna göre kateşin, kafeik asit ve gallik asitin konsantrasyonu arttıkça AgNP'lerin plazmon rezonansıyla ilişkili olarak absorbans artmıştır. Kateşin, kafeik asit ve gallik asitin varlığında oluşan AgNP'lerin plazmon absorbansları 0.5 - 2.5 mM (çözeltideki son konsantrasyon) konsantrasyon aralığında doğrusaldır.

Antioksidanlara duyarlı gümüş nanoparçacık esaslı nano–sensör yönteminde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak incelendiğinden troloksun 10^{-2} M stok standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak yöntem uygulandı. 423 nm dalgaboyunda Troloksun kalibrasyon doğrusu oluşturularak doğru denklemi elde edildi. Troloksun doğru denklemi; A_{423} = 0.12174x10^{-3} CTR + 0.00001'dir. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısını (ε) vermektedir. Troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı 121.74 L.mol^{-1}.cm^{-1} olarak bulunmuştur.

Geliştirilen nano–sensör yöntemi kullanılarak 11 antioksidan bileşiğin molar konsantrasyon–absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4.1'de standart antioksidan bileşiklerin doğru denklemleri (A = mc + n), korelasyon katsayıları (r) ve molar absorptiviteleri özetlenmiştir. Antioksidan bileşiklerin nano–sensör yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemine göre TEAC katsayıları Tablo 4.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi tüm antioksidan bileşiklerin geliştirilen yöntemle analizleri yapılabilmiştir ($p = 0.05$, $F_{deneysel} = 0.308$, $F_{tablo} = 4.747$, $F_{deneysel} < F_{tablo}$).

Standart antioksidan bileşiklerin ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımlar hazırlanmış ve etil alkol çözeltisi ile seyreltme işleminin ardından antioksidan kapasiteleri, nano–sensör yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). Sentetik karışımlar için teorik olarak bulunan beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite (mM TR) değerlerinin birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve en fazla sapmanın yalnızca ± % 6.4 olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ışığında Lambert-Beer kanunundan kimyasal sapmaların olmadığı, antioksidan karışımları varlığında oluşan AgNP'lerin plazmon

absorbanslarının toplamsal olduğu ve antioksidan karışımının içerdiği antioksidanların bireysel kapasitelerinin toplamının karışımın toplam antioksidan kapasitesini belirlediği anlaşılmaktadır. Geliştirilen yönteme göre deneysel olarak bulunan kapasite sonuçları ile beklenen kapasite sonuçları % 95 güvenirlik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($p = 0.05$, $F_{deneysel} = 0.0226$, $F_{tablo} = 5.3177$, $F_{deneysel} < F_{tablo}$). Böylelikle, geliştirilen yöntemin geçerliliği de kanıtlanmıştır.

Yeşil çaya yapılan standart antioksidan bileşik katkıları (rutin, gallik asit ve kateşin) ve bu çözeltilerin geliştirilen nano–sensör yöntemi ile yapılan TAC tayinleri sonuçlarının ışığında yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Her bir antioksidan bileşiğin geri kazanım değerleri nano–sensör yöntemi ile oluşturulan bireysel kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.4 incelendiğinde geri kazanım değerlerinin % 89 ile 92 arasında olduğu görülmektedir.

Meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri, nano–sensör ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mM TR) cinsinden belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem elma, şeftali, vişne, üzüm ve nar suyuna başarılı bir biçimde uygulandı. Geliştirilen nano–sensör yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine oldukça uyumlu bulunmuştur. Meyve sularının nano–sensör yöntemine göre TAC değerleri şöyle sıralanmaktadır: şeftali < elma < vişne < üzüm < nar suyu.

Bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri, nano–sensör ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mmol TR /g–örnek) cinsinden belirlenmiştir. Geliştirilen nano–sensör yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirleri ile uyumlu bulunmuştur. Bitki ekstrelerinin nano–sensör yöntemine göre TAC değerleri şöyle sıralanmaktadır: Adaçayı > mercanköşk > biberiye.

Bu tez çalışmasında; farklı polifenolik bileşikler için antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde gümüş nanoparçacık (AgNP)–esaslı nano-sensör yeni bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Yöntemin kararlı, çok yönlü ve tekrarlanabilir bir yöntem olabilmesi için tüm AgNP oluşum/büyüme parametreleri optimize edilmiştir. Sentetik antioksidan karışım çözeltileri ve gerçek örneklerin analiz sonuçları, meydana gelen spektral değişimler ve

plazmon absorbansının antioksidan bileşiklerin indirgeme kapasiteleriyle uyum içinde olduğunu ve AgNP'lerin büyümesinin konsantrasyona bağlı olarak doğrusal bir sinyal verdiğini açık bir biçimde gösterir. Geliştirilen nano–sensör yöntemine göre, 11 farklı antioksidan bileşiğin TEAC katsayıları bulunmuştur. Geliştirilen nano–sensör protokolü, farklı bitki örnekleri ve meyve suyu örneklerinin ve bireysel olarak polifenolik bileşiklerin toplam antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesinde gümüş nanoparçacık esaslı bir yöntemdir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı antioksidan kapasite tayin yönteminin, düşük maliyet ve seçicilik gibi bazı üstünlükleri sayesinde literatürde kullanılan klasik spektroskopik yöntemlere alternatif olması beklenmektedir. Geliştirilen nano–sensör yönteminin kullanımı ile özellikle gıda ve biyokimya alanlarındaki araştırmacıların, günlük diyetle alınan çeşitli gıda ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini nispeten az donanımlı laboratuvarlarda bile izleyebilmeleri oksidatif stres kökenli hastalıklarla mücadele etmeyi kolaylaştıracaktır. Tez çalışması sonucunda yapılacak olan bilimsel yayınlar, gıda, analitik kimya ve nanoteknoloji uygulamalarında yararlı bilgi sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y., 2009, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, Advances in Colloid and Interface Science, 145, 83–96.

[2] Eustis, S., El–Sayed, M. A., 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, Chem. Soc. Rev., 35, 209−217.

[3] Khan, R., Kaushik, A., Solanki, R.S., Ansari, A., Pandey, M.K., Malhotra, B.D., 2008, Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor, Analytica Chimica Acta, 616, 207-213.

[4] Wang, Y., Qu, J., Liu, G., 2010, Preparation of Fe3O4–chitosan nanoparticles used for hyperthermia, Advanced Powder Technology, 21, 461-467.

[5] Kausik, A., Khan, R., Solanki, P.R., Pandey, P., Alam, J., Ahmad, S., 2008, Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 24, 676-683.

[6] Huang, H., Yang, X., 2004, Synthesis of Chitosan-Stabilized Gold Nanoparticles in the Absence/Presence of Tripolyphosphate, Biomacromolecules, 5, 2340-2346.

[7] Cardenas, G., Diaz, J., Melendrez, M.F., Cruzat, C., Cancino, A., 2009, Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications, Polymer Bulletin, 62, 511-524.

[8] Shirosaki, Y., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Lopes, M.A., Santos, J.D., Fernandes, M.H., 2005, In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes, Biomaterials, 26, 485-493.

[9] Fang, Y., Cheng, Q., Lu, X., 1998, Kinetics of in vitro drug release from chitosan/gelatin hybrid membranes, Journal of Applied Polymer, 68: 1751–1758.

[10] Uragami, T., Katayama, T., Miyata, T., Tamura, H., Shiraiwa, T, Higuchi, A., 2004, Dehydration of an Ethanol/Water Azeotrope by Novel Organic−Inorganic Hybrid Membranes Based on Quaternized Chitosan and Tetraethoxysilane, Biomacromolecules, 5, 1567-1574.

[11] Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., Pathak, R., 2014, Bioinorg Chem Appl 21:605.

[12] Cho, YW., Cho, YN., Chung, SH., Ko, W., 1999, Biomaterials 20:2139.

[13] Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, SV., 2010, Carbohydr Polym 82:227.

[14] Frattini, A., Pellegri, N., Nicastro, D., de Sanctis, O., 2005, Mater Chem Phys 94:148.

[15] Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective, Journal of Controlled Release, 113, 189–207.

[16] Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti–radical activity of some phenolic acids, Food and Chemical Toxicology, 41, 753–758.

[17] Sies, H, Stahl, W., 1995, Vitamins E and C, b–carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nut 62:1315–1321.

[18] 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" Anal. Chem., 2012, 84 (18), pp 8052–8059.

[19] Hernández–García, D., Wood, CD., Castro–Obregon, S., Covarrubias, L., 2010, Reactive oxygen species: a radical role in development?. Free Radical Biology and Medicine, 49:130–143.

[20] Tüzün, Y., Garip, F., 2005, E vitaminin dermatolojideki yeri, Dermatose, 96–98

[21] Halliwell, B., 2001, Food–derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo, handbook of antioxidants, Los Angeles.

[22] Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., 1997, Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, Clinical Chemistry, 43, 562–568.

[23] Keskin, H., Erkmen G., 1987, Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.

[24] Karaman, Ş., Tütem, E., Başkan, KS., Apak, R., 2009, Comparison of total antioxidant capacity and phenolic composition of some apple juices with combined HPLC–CUPRAC assay. Food Chem 120:1201–1209.

[25] Halliwell, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, Free Radical Research Comminucation, 9, 1–32.

[26] Heim, K.E., Tagliaferro, R., Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships, The Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 572–584.

[27] Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook of Antioxidants, Dekker, M., New York–Basel, 0–8247–0547–5.

[28] Sen, C.K., Packer, L., 2000, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, American Journal of Clinical Nutrition, 72, 653–669.

[29] Atmaca, G., 2004, Antioxidant effects of sulfur–containing amino acids, Yonsei Medical Journal, 45, 776–788.

[30] 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, Clin. Chem, 33, 1448–1449.

[31] John, P., Richie, J.R., 1992, The role of glutathione in aging and cancer, Experimental Geroniology, 27, 615–626.

[32] Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989, The antioxidant action of N–acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, Free Radic Biol Med, 6, 593–597.

[33] Pettit, F.H., Yeaman, S.J., Reed, L.J., 1978, Purification and characterization of branched chain alpha–keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney, Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 4881–4885.

[34] Lodge, J.K., Youn, H.D., Handelman, G.J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V.V., Packer, L., 1997, Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease–digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection, J. Appl. Nutr., 49, 3–11.

[35] Packer, L., Tritschler, H.J., Wesel, K., 1997, Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha–lipoic acid, Free Radic. Biol. Med., 22, 359–378.

[36] Meister, A., Anderson, M.E., 1983, Glutathione, Annual Review Biochemistry, 52, 711–760.

[37] Nath, K.A., Salahudeen, A.K., 1993, Autooxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate, Am J Physiol, 264, 306–314.

[38] House, J.D., Jacobs, R.L., Stead, L.M., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 1999, Regulation of homocysteine metabolism, Adv. Enzyme Regul., 39, 69–91.

[39] Chi–Un, P., Chul, L., In–Ho, P., 2007, Therapeutic possibilities of cysteamine in the treatment of schizophrenia, Medical Hypotheses, 69, 199–202.

[40] Babic, I., Amiot, M.J., Nguyen–The, C., Aubert, S., 1993, Changes in phenolic content in fresh ready–to–use shredded carrots during storage, J. Food Sci., 58, 351–356.

[41] Wan, X.S., Ware, J.H., Zhou, Z., Donahue, J.J., Guan, J., Kennedy, A.R., 2006, Protection against radiation–induced oxidative stress in cultured human epithelial cells by treatment with antioxidant agents, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 64, 1475–1481.

[42] Steenvoorden, D.P., Hasselbaink, D.M., Beijersbergen–Van–Henegouwen, G.M., 1998, Protection against UV–induced reactive intermediates in human cells and

mouse skin by glutathione precursors: a comparison of N–acetylcysteine and glutathione ethyl ester, Photochem Photobiol, 67, 651–656.

[43] Nimni, M. E., Han, B., Cordoba, F., 2007, Are we getting enough sulfur in our diet? Nutrition & Metabolism, 24(4), 1743–1765.

[44] Kızıl, M., 2007, Benzo(A)Piren verilen ratlarda E vitamini ve selenyumun kan ve dokularda lipit peroksidasyonu ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkileri, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

[45] Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure–activity relationships, Free Radical Biology & Medicine. 22, 749–760.

[46] Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J., 1992, Phenolic antioxidants, Critical Review of Food Science and Nutritional, 32, 67–103.

[47] Mora, A., Paya, M., Rios, J.L., Alcaraz, M.J., 1990, Structure–activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non–enzymic lipid peroxidation, Biochemistry and Pharmacology, 40, 793–797.

[48] Burda, S., Oleszek, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 2774–2779.

[49] Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice–Evans, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules, Free Radical Biology and Medicine, 36, 838–849.

[50] Prior, RL., Cao, G., 1999, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. Free Radical Biol Med 27:1173–1181.

[51] Roginsky, V., Lissi, EA., 2005, Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. Food Chem 92:235–254.

[52] Magalhaes, LM., Segundo, MA., Reis, S., Lima, JLFC., 2008, Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Anal Chim Acta 613:1–19.

[53] Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rı´o, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F., 2003, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nut 133:2812–2819.

[54] Huang, D., Ou, B., Prior, RL., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 53:1841–1856.

[55] Miguel, MG., 2010, Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour Fragr J 25:291–312.

[56] Wright, JS., Johnson, ER., DiLabio, GA., 2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical methods, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. J Am Chem Soc 123:1173–1183.

[57] Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, AEMF., Rietjens IMCM., 2001, The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. Free Radical Biol Med 31:869–881.

[58] Sartor, V., Henderson, PT., Schuster, GB., 1999, Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. J Am Chem Soc 121:11027–11033.

[59] Prior, RL., Wu, XL., Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agric Food Chem 53:4290–4302.

[60] Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro–Luzzi, A., 1995, A fluorescence–based method for measuring total plasma antioxidant capability. Free Radical Biol Med 18:29–36.

[61] Glazer, AN., 1990, Phycoerythrin fluorescence–based assay for reactive oxygen species. Methods Enzymol 186:161–168.

[62] Cao, G., Alessio, HM., Cutler, RG., 1993, Oxygen–radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radical Biol Med 14:303–311.

[63] Ou, B., Hampsch–Woodill, M., Prior, RL., 2001, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem 49:4619–4626.

[64] Huang, DJ., Ou, BX., Hampsch–Woodill, M., Flanagan, JA., Prior, RL., 2002b, High–throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96–well format. J Agric Food Chem 50:4437–4444.

[65] Naguib, YMA., 1998, A fluorometric method for measurement of peroxyl radical scavenging activities of lipophilic antioxidants. Anal Biochem 265:290–298.

[66] Huang, DJ., Ou, BX., Hampsch–Woodill, M., Flanagan, JA., Deemer, EK., 2002a, Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated aˆ–cyclodextrin as the solubility enhancer. J Agric Food Chem 50:1815–1821.

[67] Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora U., 2008, Indian Medicinal herbs as sources of antioxidants. Science Direct, Food Research, 41:1–15.

[68] Rice–Evans, C., Miller, NJ., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids. Method Enzymol 234:279–293.

[69] DeLange, RJ., Glazer, AN., 1989, Phycoerythrin fluorescence–based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. Anal Biochem 177:300–306.

[70] Gülçin, İ., 2005, The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (Piper nigrum) seeds. Int J Food Sci Nut 56:491–499.

[71] Gil, MI., 2000, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J Agric Food Chem 48:4581–4589.

[72] Proteggente, AR., Pannala, AS., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van De Put, F., Dacombe, C., Rice–Evans, CA., 2002, The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free Radical Res 36:217–233.

[73] Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri. Enstitüsü Dergisi 26(4):401–409.

[74] Simic, MG., Jovanovic, SV., 1994, Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT (eds) Food phytochemicals for cancer prevention. American Chemical Society, Washington, DC.

[75] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E, 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (26) 7970–7981.

[76] Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. Trends in Analy. Chem., vol:30, 4:652–664.

[77] Gülçin, İ., Elmastas M., Aboul–Enein HY., 2007b, Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (Ocimum basilicum) assayed by different methodologies. Phytother Res 21:354–361.

[78] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, SE., Altun, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)–neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method. Free Radic Res 39:949–961.

[79] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, SE., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. Microchim Acta 160:413–419.

[80] Bursal, E., Gülçin, İ., 2011, Polyphenol contents and in vitro antioxidant activities of lyophilised aqueous extract of kiwifruit (Actinidia deliciosa). Food Res Int 44:1482–1489.

[81] Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Köksal, E., 2009, Antioxidant secoiridoids from fringe tree (Chionanthus virginicus L.). Wood Sci Technol 43:195–212.

[82] Chung, YC., Chang, CT., Chao, WW., Lin, CF., Chou, ST., 2002, Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by Bacillus subtilis IMR–NK1. J Agric Food Chem 50:2454–2458.

[83] Singleton, VL., Rossi, JA., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic– phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic 16:144–158.

[84] Soares, JR., Dins, TCP., Cunha, AP., Ameida, LM., 1997, Antioxidant activity of some extracts of Thymus zygis. Free Radical Res 26:469–478.

[85] Özçelik, B., Lee, JH., Min, DB., 2003, Effects of light, oxygen and pH on the 2, 2–diphenyl–1–picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. J Food Sci 68:487–490.

[86] Blois, MS., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26:1199–1200.

[87] Miller, N.J., Rice, E.C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. Cilinical Science, 84:407–412.

[88] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, E.C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radicale Biology and Medicine. 26: 1231–1237.

[89] Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A., 1999, Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. J Agric Food Chem 47:1035–1040.

[90] Gülçin, İ., Oktay, M., Köksal, E., Şerbetçi, H., Beydemir, Ş., Küfrevioglu, ÖI., 2008b, Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. Asian J Chem 20:2079–2090.

[91] Halliwell, B., 2006, Phagocyte–derived reactive species: salvation or suicide? Trends Biochem Sci 31:509–515.

[92] Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1990, Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Meth Enzymol 186:1–85.

[93] Gardner, PR., Fridovich, I., 1992, Inactivation–reactivation of aconitase in Escherichia coli. A sensitive measure of superoxide radical. J Biol Chem 267:8757–8763.

[94] Wickens, AP., 2001, Aging and the free radical theory. Resp Physiol 128:379–391.

[95] Hou, YC., Janczuk, A., Wang, PG., 1999, Current trends in the development of nitric oxide donors. Curr Pharm Des 5:417–441.

[96] Pacher, P., Beckman, JS., Liaudet, L., 2007, Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 87:315–424.

[97] Vriesman, MF., Haenen, GRMM., Westerveld, GJ., Paquay, JBG., Voss, HP., Bast, A., 1997, A method for measuring nitric oxide radical scavenging activity. Scavenging properties of sulfur–containing compounds. Pharm World Sci 19:283–286.

[98] Gülçin, İ., Oktay, M., Köksal, E., Şerbetçi, H., Beydemir, Ş., Küfrevioglu, ÖI., 2008b, Antioxidant and radical scavenging activities of uric acid. Asian J Chem 20:2079–2090.

[99] Ruch, RJ., Cheng, SJ., Klaunig, JE., 1989, Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. Carcinogenesis 10:1003–1008.

[100] Halliwell, B., Clement, MV., Long, LH., 2000, Hydrogen peroxide in human body. FEBS Lett 486:10–13.

[101] Cai, R., Hettiarachchy, NS., Jalaluddin, M., 2003, High–performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas. J Agric Food Chem 51:1623–1627.

[102] Ebermann, R., Alth, G., Kreitner, M., Kubin, AJ., 1996, Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. Photochem Photobiol B 36:95–97.

[103] Davies, KJ., 1995, Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp 61:1–31.

[104] Tournaire, C., Croux, S., Maurette, MT., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, AM., Oliveros, E., 1993, Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen (1Dg) quenching. J Photochem Photobiol B–Biol 19:205–215.

[105] Fu, YL., Krasnovsky, AA., Foote, CS., 1997, Quenching of singlet oxygen and sensitized delayed phthalocyanine fluorescence. J Phys Chem A 101:2552–2554.

[106] Kehrer, JP., 2000, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 149:43–50.

[107] Ou, B., Huang, D., Hampsch–Woodill, M., Flanagan, JA., Deemer, EK., 2002b, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. J Agric Food Chem 50:3122–3128.

[108] Goldstein, S., Meyerstein, D., Czapski, G., 1993, The Fenton reagents. Free Radical Biol Med 15:435–445.

[109] Kehrer, JP., 2000, The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. Toxicology 149:43–50.

[110] Kazazica, SP., Butkovica, V., Srazica, D., Klasinc, L., 2006, Gas–phase ligation of Fe and Cu ions with some flavonoids. J Agric Food Chem 54:8391–8396.

[111] Yuan, YV., Bone, DE., Carrington, MF., 2005, Antioxidant activity of dulse (Palmaria palmata) extract evaluated in vitro. Food Chem 91:485–494.

[112] Fiorucci, SB., Golebiowski, J., Cabrol–Bass, D., Antonczak, S., 2007, DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. J Agric Food Chem 55:903–911.

[113] Pryor, WA., Stanley, JP., 1975, Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. J Org Chem 40:3615–3617.

[114] Farmer, EE., Davoine, C., 2007, Reactive electrophile species. Curr Opin Plant Biol 10:380–386.

[115] Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., Pizzariello, A., 2007, Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavening and oxidaton potential. Food Chem. 100:1481–1489.

[116] Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J. H., Blanchard, K.A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxiradical scavening capacity of antioxidants anf biological fluids. Free Radical Biology Mededicinal, 24:480–493.

[117] Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., 1993, Oxygen–radical absorbance capacity assay for antioxidants, Free Radical Biology & Medicine, 14, 303–311.

[118] Egwim, I. O. C., Gruber, H. J., 2001, Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'–dithiodipyridine, Analytical Biochemistry, 288, 188–194.

[119] Sava, N., Plancken, I. V. D., Claeys, W., Hendrickx, M., 2005, The kinetics of heat–induced structural changes of {beta}–Lactoglobulin, J. Dairy Sci., 88, 1646–1653.

[120] Hochstein, P., Atallah, AS., 1988, The nature of oxidants and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. Mutat Res 202:363–375.

[121] Yu, BP., Yang, R., 1996, Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. Ann NY Acad Sci 786:1–11.

[122] Dargel, R., 1992, Lipid peroxidation–a common pathogenetic mechanism? Exp Toxicol Pathol 44:169–181.

[123] Güçlü, K., Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Apak, R., 2013, Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5'–Dithio–bis(2–nitrobenzoic acid)–modified gold nanoparticles, Analytica Chimica Acta, 794, 90– 98.

[124] Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951, Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold, Discuss. Faraday Soc. 11, 55–74.

[125] Ma, L.–N., Liu, D.–J., Wang, Z.–X., 2010, Synthesis and applications of gold nanoparticle probes, Chin. J. Anal. Chem., 38, 1–7.

[126] Ellman, G.L., 1958, A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, Arch. Biochem. Biophys., 74, 443–450.

[127] Colvin, VL., Schlamp, MC., Alivisatos, A., 1994, Light emitting diodes made from cadmium selenide nanocrystals and a semiconducting polymer. Nature, 370:354–357.

[128] Siegel, R. W., 1994, Nanophase materials, In Encyclopedia of applied physics, 11, Trigg, G. L. (ed.), Weinheim: VCH, 1–27.

[129] Xia, Y., Halas, N. J., 2005, Shape–controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures, MRS Bulletin, 30, 338–347.

[130] Liveri, V.T., 2006, Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems, Springer–Verlag, New York

[131] Pérez–López, B., Merkoçi, A., 2011, Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. Trends Food Sci. Technol., 22, 625–639.

[132] Katz, E., Willner, I., 2004, Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications, Angew. Chem., Int. Ed., 43, 6042–6108.

[133] Drude, L., 1900, On the electron theory of metals, Annalen der Physik 1, 3, 566–613.

[134] Mie, G., 1908, Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions, Annalen der Physik, 25 (3), 377–445.

[135] Lee, K.–S., 2006, El–Sayed, M.A., Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition, J. Phys. Chem. B, 110, 19220–19225.

[136] Senapati, S., Ph.D. Thesis. India: University of pune; 2005, Biosynthesis and immobilization of nanoparticles and their applications, pp. 1–57.

[137] Klaus–Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, CG., 2001, Bacteria as workers in the living factory: metalaccumulating bacteria and their potential for materials science. Trends Biotechnol, 19:15–20.

[138] Kruis, F., Fissan, H., Rellinghaus, B., 2000, Sintering and evaporation characteristics of gas–phase synthesis of sizeselected PbS nanoparticles. Mater Sci Eng B,69:329–334.

[139] Magnusson, M., Deppert, K., Malm, J., Bovin, J., Samuelson, L., 1999, Gold nanoparticles: production, reshaping, and thermal charging. J Nanoparticle Res., 1:243–251.

[140] Jung, J., Oh, H., Noh, H., Ji, J., Kim, S., 2006, Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. J Aerosol Sci., 37:1662–1670.

[141] Sylvestre, JP., Kabashin, AV., Sacher, E., Meunier, M., Luong, JHT., 2004, Stabilization and size control of gold nanoparticles during laser ablation in aqueous cyclodextrins. J Am Chem Soc., 126:7176–7177.

[142] Dolgaev, SI., Simakin, AV., Voronov, VV., Shafeev, GA., Bozon–Verduraz, F., 2002, Nanoparticles produced by laser ablation of solids in liquid environment. Appl Surf Sci., 186:546–551.

[143] Tarasenko, N., Butsen, A., Nevar, E., Savastenko, N., 2006, Synthesis of nanosized particles during laser ablation of gold in water. Appl Surf Sci., 252:4439–4444.

[144] Kawasaki, M., Nishimura, N., 2006, 1064–nm laser fragmentation of thin Au and Ag flakes in acetone for highly productive pathway to stable metal nanoparticles. Appl Surf Sci., 253:2208–2216.

[145] Tsuji, T., Iryo, K., Watanabe, N., Tsuji, M., 2002, Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size. Appl Surf Sci., 202:80–85.

[146] Tien, D–C., Tseng, K–H., Liao, C–Y., Huang, J–C., Tsung, TT., 2008, Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. Journal of Alloys and Compounds., 463:408–411.

[147] Siegel, J., Kvítek, O., Ulbrich, P., Kolská, Z., Slepička, P., Švorčík, V., 2012, Progressive approach for metal nanoparticle synthesis. Materials Letters. ,89:47–50.

[148] Evanoff Chumanov, G., 2004, Size–controlled synthesis of nanoparticles. 2. measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections. J Phys Chem B., 108:13957–13962.

[149] Merga, G., Wilson, R., Lynn, G., Milosavljevic, B., Meisel, D., 2007, Redox Catalysis on “naked” silver nanoparticles. J.Phys Chem C., 111:12220–12206.

[150] Oliveira, M., Ugarte, D., Zanchet, D., Zarbin, A., 2005, Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol–stabilized silver nanoparticles. J Colloid Interface Sci., 292:429–435.

[151] Brust, M., Kiely, C., 2002, Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. Colloids Surf A: Phys Eng Aspects., 202:175–186.

[152] Kim, D., Jeong, S., Moon, J., 2006, Synthesis of silver nanoparticles using the polyol process and the influence of precursor injection. Nanotechnology., 17:4019.

[153] Zhang, Y., Peng, H., Huang, W., Zhou, Y., Yan, D., 2008, Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. J Colloid Interface Sci., 325:371–376.

[154] Chen, M., Feng, Y–G., Wang, X., Li, T–C., Zhang, J–Y., Qian, DJ., 2007, Silver nanoparticles capped by oleylamine: formation, growth, and self–organization. Langmuir., 23:5296–5304.

[155] Huang, H., Yang, Y., 2008, Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions. Compos Sci Technol., 68:2948–2953.

[156] Zhou, Y., Yu, SH., Wang, CY., Li, XG., Zhu, YR., Chen, ZY., 1999, A Novel ultraviolet irradiation photoreduction technique for the preparation of single– crystal Ag nanorods and Ag dendrites. Advanced Materials., 11:850–852.

[157] Shchukin, DG., Radtchenko, IL., Sukhorukov, G., 2003, Photoinduced reduction of silver inside microscale polyelectrolyte capsules. Chem Phys Chem., 4:1101–1103.

[158] Jin, R., Cao, YC., Hao, E., Metraux, GS., Schatz, GC., Mirkin, C., 2003, Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. Nature., 425:487–490.

[159] Malval, J–P., Jin, M., Balan, L., Schneider, R., Versace, D–L., Chaumeil, H., 2010, Photoinduced size–controlled generation of silver nanoparticles coated with carboxylate–derivatized thioxanthones. J Phys Chem C.,114, 10396–10402.

[160] Johans, C., Clohessy, J., Fantini, S., Kontturi, K., Cunnane, VJ., 2002, Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid–liquid interface. Electrochem Commun., 4:227–230.

[161] Ma, H., Yin, B., Wang, S., Jiao, Y., Pan, W., Huang, S., 2004, Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. Chem Phys Chem., 24:68–75.

[162] Nadagouda, MN., Speth, TF., Varma, R., 2011, Microwave–assisted green synthesis of silver nanostructures. Acc Chem Res., 44:469–478.

[163] Polshettiwar, V., Nadagouda, MN., Varma, R., 2009, Microwave assisted chemistry: A rapid and sustainable route to synthesis of organics and nanomaterials. Aust J Chem., 62:16–26.

[164] Mohanpuria, P., Rana, NK., Yadav, SK., 2008, Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. J Nanopart Res., 10:507–517.

[165] Debaditya, B., Rajinder, K., 2005, Nanotechnology and potential of microorganisms. Crit Rev Biotech., 25:199–204.

[166] Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Bilal, M., Gurunathan, S., 2008, Biosynthesis of silver nanocrystals by Bacillus licheniformis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces., 65:150–153.

[167] Saifuddin, N., Wong, CW., Nur Yasumira, AA., 2009, Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. E–Journal of Chemistry., 6:61–70.

[168] Shahverdi, AR., Minaeian, S., Shahverdi, HR., Jamalifar, H., Nohi, A., 2007, Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach Process Biochemistry., 42:919–923.

[169] Korbekandi, H., Ashari, Z., Iravani, S., Abbasi, S., 2013, Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using Fusarium oxysporum. Iran J Pharm Res., 12:289–298.

[170] Govindaraju, K., Basha, SK., Kumar, VG., Singaravelu, G., 2008, Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single–cell protein (Spirulina platensis) Geitler. J Mater Sci., 43:5115–5122.

[171] Vilchis–Nestor, AR., Sánchez–Mendieta, V., Camacho–López, MA., Gómez–Espinosa, RM., Camacho–López, MA., Arenas–Alatorre, J., 2008, Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using Camellia sinensis extract. Materials Letters., 62:3103–3105.

[172] Kesharwani, J., Yoon, KY., Hwang, J., Rai, M., 2009, Phytofabrication of silver nanoparticles by leaf extract of datura metel: hypothetical mechanism involvedin synthesis. J Bionanosci., 3:1–6.

[173] Song, JY., Kim, B., 2009, Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. Bioprocess Biosyst Eng., 32:79–84.

[174] Apak, R., Capanoglu, E., Shahidi, F. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications. John Wiley & Sons, Feb 20, 2018.

[175] Della Pelle, F., & Compagnone, D. (2018). Nanomaterial-based sensing and biosensing of phenolic compounds and related antioxidant capacity in food. Sensors, 18(2), 462.

[176] Othman, A., Karimi, A., & Andreescu, S. (2016). Functional nanostructures for enzyme based biosensors: Properties, fabrication and applications. Journal of Materials Chemistry B, 4(45), 7178-7203.

[177] Hoyos-Arbeláez, J., Vázquez, M. and Contreras-Calderón, J., 2017. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. Food chemistry, 221, pp.1371-1381.

[178] Souza, C.P., Legari, F., Zarbin, A.J.G., Marcolino–Júnior, L.H., Bergamini, M.F., 2011, Voltammetric determination of the antioxidant capacity in wine samples using a carbon nanotube modified electrode. J. Agric. Food Chem., 59, 7620–7625.

[179] Sanchez Arribas, A., Martinez–Fernandez, M., Moreno, M., Bermejo, E., Zapardiel, A., Chicharro, M., 2013, Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube–modified electrodes. Food Chem., 136, 1183–1192.

[180] Del Carlo, M., Amine, A., Haddam, M., Della Pelle, F., Fusella, G.C., 2012, Compagnone, D. Selective voltammetric analysis of o–diphenols from olive oil using Na_2MoO_4 as electrochemical mediator. Electroanalysis, 24, 889–896.

[181] Ziyatdinova, G., Salikhova, I., Budnikov, H., 2014, Chronoamperometric estimation of cognac and brandy antioxidant capacity using MWNT modified glassy carbon electrode. Talanta, 125, 378–384.

[182] Ziyatdinova, G., Aytuganova, I., Nizamova, A., Budnikov, H., 2013, Differential Pulse Voltammetric Assay of Coffee Antioxidant Capacity with MWNT–Modified Electrode. Food Anal. Methods, 6, 1629–1638.

[183] Ziyatdinova, G., Kozlova, E., Budnikov, H., 2016, Chronocoulometry of wine on multi–walled carbon nanotube modified electrode: Antioxidant capacity assay. Food Chem., 196, 405–410.

[184] Eguílaz, M., Gutierrez, A., Gutierrez, F., Gonzalez–Domínguez, J.M., Ansón–Casaos, A., Hernández–Ferrer, J Ferreyra, N.F., Martínez, M.T., Rivas, G., 2016, Covalent functionalization of single–walled carbon nanotubes with polytyrosine: Characterization and analytical applications for the sensitive quantification of polyphenols. Anal. Chim. Acta, 909, 51–59.

[185] Crevillén, A.G., Pumera, M., González, M.C., Escarpa, A., 2009, Towards lab–on–a–chip approaches in real analytical domains based on microfluidic chips/electrochemical multi–walled carbon nanotube platforms. Lab Chip, 9, 346–353.

[186] Vilela, D., Martín, A., González, M.C., Escarpa, A., 2014, Fast and reliable class–selective isoflavone index determination on carbon nanotube press–transferred electrodes using microfluidic chips. Analyst, 139, 2342–2347.

[187] Talarico, D., Arduini, F., Constantino, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., Moscone, D., Palleschi, G., 2015, Electrochemistry communications carbon black as successful screen–printed electrode modifier for phenolic compound detection. Electrochem. Commun., 60, 78–82.

[188] Della Pelle, F., Di Battista, R., Vázquez, L., Palomares, F.J., Del Carlo, M., Sergi, M., Escarpa, A., 2017, Press–transferred carbon black nanoparticles for class–selective antioxidant electrochemical detection. Appl. Mater. Today, 9, 29–36.

[189] Raymundo–Pereira, P.A., Campos, A.M., Prado, T.M., Furini, L.N., Boas, N.V., Calegaro, M.L., Machado, S.A.S., 2016, Synergy between Printex nano–carbons and silver nanoparticles for sensitive estimation of antioxidant activity. Anal. Chim. Acta, 926, 88–98.

[190] Hui, K.H., Ambrosi, A., Pumera, M., Bonanni, A., 2016, Improving the analytical performance of graphene oxide towards the assessment of polyphenols. Chem. A Eur. J., 22, 3830–3834.

[191] Chng, C.E., Sofer, Z., Pumera, M., Bonanni, A., 2016, Doped and undoped graphene platforms: The influence of structural properties on the detection of polyphenols. Sci. Rep., 6, 20673.

[192] Gao, F., Zheng, D., Tanaka, H., Zhan, F., Yuan, X., Gao, F., Wang, Q., 2015, An electrochemical sensor for gallic acid based on Fe2O3/electro–reduced graphene oxide composite: Estimation for the antioxidant capacity index of wines. Mater. Sci. Eng. C, 57, 279–287.

[193] Tirawattanakoson, R., Rattanarat, P., Ngamrojanavanich, N., 2016, Free radical scavenger screening of total antioxidant capacity in herb and beverage using graphene/PEDOT: PSS–modified electrochemical sensor. JEAC, 767, 68–75.

[194] Magro, M., Bonaiuto, E., Baratella, D., de Almeida Roger, J., Jakubec, P., Corraducci, V., Tuˇcek, J., Malina, O., Zboˇril, R., Vianello, F., 2016, Electrocatalytic nanostructured ferric tannates: Characterization and application of a polyphenol nanosensor. ChemPhysChem, 17, 3196–3203.

[195] Andrei, V., Sharpe, E., Vasilescu, A., Andreescu, S., 2016, A single use electrochemical sensor based on biomimetic nanoceria for the detection of wine antioxidants. Talanta, 156–157, 112–118.

[196] Kumar, A.S., Shanmugam, R., Nellaiappan, S., 2016, Chemical Tea quality assessment by analyzing key polyphenolic functional groups using flow injection analysis coupled with a dual electrochemical detector. Sens. Actuators B Chem., 227, 352–361.

[197] Cetó, X., Céspedes, F., Pividori, M.I., Gutiérrez, J.M., del Valle, M., 2012, Resolution of phenolic antioxidant mixtures employing a voltammetric bio–electronic tongue. Analyst, 137, 349–356.

[198] Arduini, F., Amine, A., Majorani, C., Di Giorgio, F., De Felicis, D., Cataldo, F., Moscone, D., Palleschi, G., 2010, High performance electrochemical sensor based on modified screen–printed electrodes with cost–effective dispersion of nanostructured carbon black. Electrochem. Commun., 12, 346–350.

[199] Ziyatdinova, G., Galandova, J., Labuda, J., 2008, Impedimetric nanostructured disposable DNA–based biosensors for the detection of deep DNA damage and effect of antioxidants. Int. J. Electrochem. Sci., 3, 223–235.

[200] Del Carlo, M., Compagnone, D., 2010, Recent strategies for the biological sensing of pesticides: From the design to the application in real samples. Bioanal. Rev., 1, 159–176.

[201] Diaconu, M., Litescu, S.C., Radu, G.L., 2010, Laccase–MWCNT–chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. Sens. Actuators B Chem., 145, 800–806.

[202] Di Fusco, M., Tortolini, C., Deriu, D., Mazzei, F., 2010, Laccase–based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. Talanta, 81, 235–240.

[203] Rawal, R., Chawla, S., Pundir, C.S., 2011, Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode. Anal. Biochem., 419, 196–204.

[204] Chawla, S., Rawal, R., Sharma, S., Pundir, C.S., 2012, An amperometric biosensor based on laccase immobilized onto nickel nanoparticles/carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polyaniline modified gold electrode for determination of phenolic content in fruit juices. Biochem. Eng. J., 68, 76–84.

[205] Eremia, S.A.V., Vasilescu, I., Radoi, A., Litescu, S.C., Radu, G.L., 2013, Disposable biosensor based on platinum nanoparticles–reduced graphene oxide–laccase biocomposite for the determination of total polyphenolic content. Talanta, 110, 164–170.

[206] Lanzellotto, C., Favero, G., Antonelli, M.L., Tortolini, C., Cannistraro, S., Coppari, E., Mazzei, F., 2014, Nanostructured enzymatic biosensor based on fullerene and gold nanoparticles: Preparation, characterization and analytical applications. Biosens. Bioelectron., 55, 430–437.

[207] Vasilescu, I., Eremia, S.A.V., Kusko, M., Radoi, A., Vasile, E., Radu, G.L., 2016, Molybdenum disulphide and graphene quantum dots as electrode modifiers for laccase biosensor. Biosens. Bioelectron., 75, 232–237.

[208] Vlamidis, Y., Gualandi, I., Tonelli, D., 2017, Amperometric biosensors based on reduced GO and MWCNTs composite for polyphenols detection in fruit juices. J. Electroanal. Chem., 799, 285–292.

[209] Nadifiyine, S., Haddam, M., Mandli, J., Chadel, S., Blanchard, C.C., Marty, J.L., Amine, A., 2013, Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto a carbon black paste electrode for phenol determination in olive oil. Anal. Lett., 46, 2705–2726.

[210] Lopatynskyi, A.M., Lopatynska, O.G., Guo, L.J., Chegel, V.I., 2011, Localized surface plasmon resonance biosensor–part I: Theoretical study of sensitivity–extended mie approach. IEEE Sens. J., 11, 361–369.

[211] Vasilescu, A., Sharpe, E., Andreescu, S., 2012, Nanoparticle–based technologies for the detection of food antioxidants. Curr. Anal. Chem., 8, 495–505.

[212] Choleva, T.G., Kappi, F.A., Giokas, D.L., Vlessidis, A.G., 2015, Paper–based assay of antioxidant activity using analyte–mediated on–paper nucleation of gold nanoparticles as colorimetric probes. Anal. Chim. Acta, 860, 61–69.

[213] Vilela, D., González, M.C., Escarpa, A., 2015, Nanoparticles as analytical tools for in–vitro antioxidant–capacity assessment and beyond. TrAC Trends Anal. Chem., 64, 1–16.

[214] Vilela, D., Castañeda, R., González, M.C., Mendoza, S., Escarpa, A., 2015, Fast and reliable determination of antioxidant capacity based on the formation of gold nanoparticles. Microchim. Acta, 182, 105–111.

[215] Della Pelle, F., Vilela, D., González, M.C., Lo Sterzo, C., 2015, Compagnone, D.D., Del Carlo, M., Escarpa, A. Antioxidant capacity index based on gold nanoparticles formation. Application to extra virgin olive oil samples. Food Chem., 178, 70–75.

[216] Della Pelle, F., González, M.C., Sergi, M., Del Carlo, M., Compagnone, D., Escarpa, A., 2015, Gold nanoparticles–based extraction–free colorimetric assay in organic media: An optical index for determination of total polyphenols in fat–rich samples. Anal. Chem., 87, 6905–6911.

[217] Tułodziecka, A., Szydłowska–Czerniak, A., 2016, Development of a novel gold nanoparticle–based method to determine antioxidant capacity of Brassica oilseeds, white flakes and meal. Food Chem., 208, 142–149.

[218] Teerasong, S., Jinnarak, A., Chaneam, S., Wilairat, P., Nacapricha, D., 2017, Poly(vinyl alcohol) capped silver nanoparticles for antioxidant assay based on seed–mediated nanoparticle growth. Talanta, 170, 193–198.

[219] Szydlowska–Czerniak, A., Tulodziecka, A., Szlyk, E., 2012, A silver nanoparticle–based method for determinationof antioxidant capacity of rapeseed and its products. Analyst, 137, 3750–3759.

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

[221] TułodzieckaSzyd, A., Szydłowska–Czerniak, A., 2016, Determination of total antioxidant capacity of rapeseed and its by–products by a novel cerium oxide nanoparticle–based spectrophotometric method. Food Anal. Methods, 9, 3053–3062.

[222] 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. Anal. Methods, 7, 4650–4660.

[223] Gatselou, V., Christodouleas, D.C., Kouloumpis, A., Gournis, D., Giokas, D.L., 2016, Determination of phenolic compounds using dpectral and color transitions of rhodium nanoparticles. Anal. Chim. Acta, 932, 80–87.

[224] 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. Sens. Actuators B Chem., 193, 552–562.

[225] Hemmateenejad, B., Shamsipur, M., Khosousi, T., Shanehsaz, M., Firuzi, O., 2012, Antioxidant activity assay based on the inhibition of oxidation and photobleaching of l–cysteine–capped CdTe quantum dots. Analyst, 137, 4029.

[226] Akshath, U.S., Shubha, L.R., Bhatt, P., Thakur, M.S., 2014, Quantum dots as optical labels for ultrasensitive detection of polyphenols. Biosens. Bioelectron., 57, 317–323.

[227] Dwiecki, K., Nogala–Kałucka, M., Polewski, K., 2017, Determination of total phenolic compounds in common beverages using CdTe quantum dots. J. Food Process. Preserv., 41, 1–7.

[228] Benítez–Martínez, S., Valcárcel, M., 2014, Chemical Graphene quantum dots as sensor for phenols in olive oil. Sens. Actuators B Chem., 197, 350–357.

[229] Álvarez–Diduk, R., Orozco, J., Merkoçi, A., 2017, Paper strip–embedded graphene quantum dots: A Screening device with a smartphone readout. Sci. Rep., 7, 1–9.

[230] Nery, E.W., Kubota, L.T., 2013, Sensing approaches on paper–based devices: A review. Anal. Bioanal. Chem., 405, 7573–7595.

[231] Marambio–Jones, C., Hoek, E.M.V., 2010, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. J. Nanoparticle Res., 12, 1531–1551.

[232] Li, M., Ge, Y., Chen, Q., Xu, S., Wang, N., Zhang, X., 2007, Hydrothermal synthesis of highly luminescent CdTe quantum dots by adjusting precursors' concentration and their conjunction with BSA as biological fluorescent probes. Talanta, 72, 89–94.

[233] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, E.S., Bektaşoğlu, B., Berker, I.K., Özyurt, D., 2007, Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules, 12:1496–1547.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Medet ZOR
Doğum Yeri	Ordu
Doğum Tarihi	23.05.1980
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	0537 606 3675
E-Posta Adresi	medetzor@yahoo.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya Bölümü
Mezuniyet Yılı	29.07.2004

Yüksek Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya A.B.D.
Programı	Analitik Kimya
Mezuniyet Yılı	31.07.2013

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

Makale ve Bildiriler

Zor M., Kocaoba S., "Analysis of Metal Contents in Spinach, Lettuce and Parsley Marketed in Marmara Region", 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (6BBCAC), P–193, 10–14 September 2013, Trabzon, Turkey.

Güçlü K., Özyürek M., **Zor M.**, Acar I., "Bazı Polifenolik Bileşiklerin Tayini İçin Yeni Bir Nano–Sensör Geliştirilmesi", 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İZMİR, TÜRKIYE, 23–26 Ağustos 2016, cilt.P–30, ss.182–182.