T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAĞLARIN OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN ALTIN NANOPARTİKÜL ESASLI FLOROMETRİK NANO-SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Nida Elif YAVUZ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa BENER

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2022

Bu çalışma, 6.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Mustafa BENER(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

Unvan Adı SOYADI
Üniversite
Fakülte

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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2020-35121 numaralı projesi ile desteklenmiştir.
Bu tez, 119Z864 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamı gerçekleştirme fırsatı sunarak yol gösteren, bilimsel ve akademik tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sabır ve güler yüzünden dolayı danışman hocam Doç. Dr. Mustafa BENER'e,

Bu çalışma süresince hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, anlayışı ve güler yüzü ile yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımda bana destek olan, engin bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a, Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK ve Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma,

Tüm bu süreçte çalışmalarıma destek olarak yanımda olan sevgili arkadaşım Eğsap YILDIRIM'a

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, canım dostlarıma en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2022 Nida Elif YAVUZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1 GİRİŞ **1**
2 GENEL KISIMLAR **3**
2.1 LİPİDLER 3
2.1.1 Yağ Asitleri 3
2.1.1.1 Doymuş Yağ Asitleri *3*
2.1.1.2 Doymamış Yağ Asitleri *4*
2.2 LİPİD OKSİDASYONU 5
2.2.1 Oksidasyon Mekanizmasını Etkileyen Faktörler 6
2.2.2 Serbest Radikaller 7
2.2.2.1 Serbest Radikallerin Biyolojik Sonuçları ve Hastalıklardaki Rolü *7*
2.2.3 Lipid Oksidasyon Mekanizması 9
2.2.3.1 Primer Oksidasyon *10*
2.2.3.2 Sekonder Oksidasyon *10*
2.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN YAĞLAR 11
2.4 NANOTEKNOLOJİ 12
2.4.1 Soy Metal Nanopartiküller 15
2.4.2 Soy Metal Nanopartiküllerde Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR) 16
2.4.3 Altın ve Gümüş Nanopartiküller 17
2.4.3.1 Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) Sistemi *17*
2.4.3.2 Altın Nanopartiküllerin Agregasyonu *20*
2.4.3.3 Altın Nanopartiküllerin Sentezi *21*
2.4.3.4 Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu *22*
2.5 SENSÖRLER 22

2.5.1 Kimyasal Sensörler 23
2.5.1.1 Optik Sensörler *24*
2.6 KOLORİMETRİK SENSÖR OLARAK ALTIN NANOPARÇACIKLAR 24
2.7 FLOROMETRİK SENSÖR OLARAK NANOPARÇACIKLAR 24
2.8 LİTERATÜRDE VAROLAN OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR 25
2.8.1 Kimyasal Yöntemler 25
2.8.1.1 Tiyobarbitürik Asit Testi *25*
2.8.1.2 Peroksit Değeri Testi *26*
2.8.1.3 Anisidin Değeri Testi *26*
2.8.2 Fiziksel Yöntemler 26
3 MALZEME VE YÖNTEM 28
3.1 KULLANILAN CİHAZLAR 28
3.2 KİMYASAL MADDELER 28
3.3 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 28
3.3.1 Floresein İzotiyosiyanat-Altın Nanopartikül (FITC-AuNP) Esaslı Nano-Sensör Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 28
3.4 UYGULANAN YÖNTEMLER 29
3.4.1 FITC-AuNP Esaslı Nano-Sensör Yöntemi 29
3.4.1.1 FITC-AuNP Esaslı Florometrik Nano-Sensör Yöntemi ile Primer Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini *29*
3.4.1.2 FITC-AuNP Esaslı Florometrik Nano-Sensör Yöntemi ile İkincil Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini *30*
3.4.1.3 AAPH Kaynaklı Linoleik Asit Peroksidasyonu ile Sentetik Olarak Hazırlanmış Yağ Ortamında Primer ve İkincil Oksidasyon Ürünlerinin Tayini *31*
3.4.1.4 Gerçek Yağ Numunesine Nano-Sensörün Uygulanması ve Yöntemin Analitik Parametrelerinin Hesaplanması *32*
3.4.2 FOX Referans Yöntemi ile Primer Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini 32
3.4.3 *p*-Anisidin Referans Yöntemi ile İkincil Oksidasyon ürünlerinin Tayini 32
4 BULGULAR 33
4.1 FITC-AUNP ESASLI NANO-SENSÖR YÖNTEMİ İÇİN OPTİMUM DENEY KOŞULLARININ BELİRLENMESİ 33
4.2 FITC-AUNPS ESASLI FLOROMETRİK NANO-SENSÖR YÖNTEMİYLE OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ 34
4.3 FITC-AUNP YÖNTEMİ İLE *TERT*-BUTİL HİDROPEROKSİT TAYİNİ 36

4.4 AAPH KAYNAKLI LİNOLEİK ASİT PEROKSİDASYONU İLE SENTETİK OLARAK HAZIRLANMIŞ YAĞ ORTAMINDA PRİMER VE İKİNCİL OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ 38
4.5 KATKI YAPILAN GERÇEK YAĞ NUMUNESİNE NANO-SENSÖRÜN UYGULANMASI 38
4.6 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FOX REFERANS YÖNTEMİ İLE PRİMER OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN (HİDROPEROKSİT) TAYİNİ 39
4.7 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE ANİSİDİN REFERANS YÖNTEMİ İLE İKİNCİL PEROKSİDAYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ 40
4.8 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FITC-AUNP İLE BİRİNCİL OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ 41
4.9 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FITC-AUNP İLE İKİNCİL OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ 42
5 TARTIŞMA VE SONUÇ 44
6 KaynakLAR 47
7 EKLER 53
8 ÖZGEÇMİŞ 54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: İyodür iyonlarının (I^-) Kloramin-T varlığında triiyodüre (I_3^-) yükseltgenme reaksiyonunun şematik gösterimi. 2

Şekil 2.1: Farklı yüklere sahip radikaller. (1) Pozitif yüklü radikalik yapı [25], (2) Negatif yüklü radikalik yapı [26], (3) Yüksüz radikalik yapı [27].....7

Şekil 2.2: Lipid peroksidasyonunun yol açtığı membran hasarı [34]. 8

Şekil 2.3: Lipid oksidasyonu safhaları. 9

Şekil 2.4: Lipid oksidasyon mekanizması [43]. 11

Şekil 2.5: Şekillerine göre nanoyapılar [48]. 13

Şekil 2.6: Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen farklı 0D nanoyapılı türlerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü. (A) Kuantum noktaları [20], (B) nanoparçacık dizileri, (C) çekirdek-kabuk nanoparçacıkları, (D) içi boş küpler ve (E) nanoküreler [49]. 13

Şekil 2.7: Birkaç araştırma grubu tarafından sentezlenen farklı 1D nanoyapılı türlerinin SEM görüntüsü. (A) Nanoteller, (B) nanoçubuklar, (C) nanotüpler, (D) nanokayışlar, (E) nanoşeritler ve (F) hiyerarşik nanoyapılar [49]. 14

Şekil 2.8: Çeşitli araştırma gruplarımız tarafından sentezlenen farklı türdeki 2D nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü. (A) Bağlantılar (sürekli adalar), (B) dallı yapılar, (C) nanolevhalar, (D) nanolevhalar, (E) nanoduvarlar ve (F) nanodiskler [49]. 14

Şekil 2.9: Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen farklı türdeki 3B nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü. (A) Nanotoplar (dendritik yapılar), (B) nano bobinler, (C) nanokoniler, (D) nanopiller ve (E) nanoçiçekler [49].....15

Şekil 2.10: Boyut ve şekle bağlı AuNPs'lerin renk değişimi [50].....15

Şekil 2.11: SPR'nin şematik gösterimi.....16

Şekil 2.12: Gümüş ve altın nanoparçacıkların yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu.....17

Şekil 2.13: (A-D) Deneysel (siyah) ve hesaplanmış (kırmızı) absorpsiyon spektrumları. (A) 40 nm çapında Ag küreler, (B) kenar uzunluğu 40 nm küpler, (C) kenar uzunluğu 40 nm oktahedronlar, (D) ve kenar uzunluğunda 75 nm sağ bipiramit. Deneysel veriler sulu çözelti ölçümlerinden elde edilmiş ve hesaplanan veriler

sırasıyla Mie teorisi (küreler) ve DDA yöntemi (diğer şekiller) kullanılarak elde edilmiştir [59]. 18

Şekil 2.14: AuNS örneklerinin renkleri ve absorpsiyon spektrumları. (a) Farklı boyutlardaki AuNS numunelerinin kolloidal çözeltilerinin dijital fotoğrafı, sırasıyla soldan sağa numuneler 1 ila 8'e karşılık gelir. (b) Bir UV/görünür/NIR spektrofotometresinde ölçülen 1 ila 8 numunelerinin normalleştirilmiş absorpsiyon spektrumları. (c) Mie teorisine göre hesaplanan normalleştirilmiş absorpsiyon spektrumları. 19

Şekil 2.15: Farklı çözücülerdeki (solda) altın nanoçubukların deneysel spektrumları ve kırılma indeksi ile uzunlamasına plazmon bant pozisyonundaki değişim (sağda) [63]. 20

Şekil 2.16: Kolloidal çözeltideki renk değişimi, UV-vis absorpsiyon spektrumunda yüzey plazmon rezonans (SPR) pikinin uzun dalgaboyuna kayması [64]. 21

Şekil 2.17: Jablonski diyagramı [79]. 25

Şekil 3.1: FITC-AuNP yönteminin şematik gösterimi. 31

Şekil 4.1: FITC-AuNP esaslı nano-sensör yöntemi ile nonenal (73,8 mM) tayinine ait reaksiyon kinetiği. 33

Şekil 4.2: Çalışılan farklı Kloramin-T konsantrasyonlarına ait görünür bölge spektrumları; a) 8 mM; b) 6 mM c) 0,8 mM; d) 0,1 mM; e) 0,08 mM. 33

Şekil 4.3: Trans-2-nonenal'ın FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 14,7 mM; c) 29,5 mM; d) 44,3 mM; e) 60,0 mM; f) 73,8 mM. 34

Şekil 4.4: Trans-2-heptenal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları; a) 0 mM; b) 1,87 mM; c) 5,61 mM; d) 9,35 mM; e) 14,00 mM; f)18,70 mM. 35

Şekil 4.5: Trans-trans-2,4-dekadienal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 6,41 mM; c) 12,90 mM; d) 19,20 mM; e) 25,70 mM; f) 32,10 mM. 35

Şekil 4.6: 2,4-heptadienal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 3,63 mM; c) 5,44 mM; d) 7,26 mM; e) 8,17 mM; f) 9,08 mM. 36

Şekil 4.7: TBHP'nin FITC-AuNP yöntemine göre (a) TBHP yokluğunda ve (b→g) artan derişimlerdeki TBHP varlığında elde edilen emisyon spektrumu (470 nm eksitasyon; 517 nm emisyon). 37

Şekil 4.8: TBHP'nin FITC-AuNP yöntemine göre elde edilen kalibrasyon grafiği. 37

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Doymuş yağ asitleri [9]. 4

Tablo 2.2: Doymamış yağ Asitleri [9]. 5

Tablo 2.3: Serbest radikallerin hücredeki başlıca hedefleri ve sonuçları [34]. 9

Tablo 2.4: Sensörlerin sınıflandırılması [75]. 23

Tablo 4.1: Oksidasyon ürünlerinin FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen lineer denklem ve korelasyon katsayıları, lineer aralıkları (ΔI: floresans şiddeti artışı; c: analit derişimi). 36

Tablo 4.2: Sentetik yağ ortamında primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini. 38

Tablo 4.3: Gerçek yağ numunesinde primer oksidasyon ürünlerinin tayini. 39

Tablo 4.4: Gerçek yağ numunesinde sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini. 39

Tablo 4.5: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FOX referans yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini. 40

Tablo 4.6: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FOX referans yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini. 40

Tablo 4.7: Ayçiçek yağı (1) numunesinde *p*-Anisidin yöntemi ile PAV değerinin hesaplanması 41

Tablo 4.8: Ayçiçek yağı (2) numunesinde *p*-Anisidin yöntemi ile PAV değerinin hesaplanması 41

Tablo 4.9: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini. 42

Tablo 4.10: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini. 42

Tablo 4.11: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini. 43

Tablo 4.12: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini. 43

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

A : Absorbans
r : Lineer korelasyon katsayısı
λ_{max} : Maksimum dalga boyu
c : Konsantrasyon
ΔI : Floresans şiddeti artışı
Ɛ : Molar floresans katsayısı
M : Molarite
MA : Molekül ağırlığı
mM : Milimolar
mL : Mililitre
nm : Nanometre
I : Floresans şiddeti
Ch-T : Kloramin-T
-COOH : Karboksil grubu

Kısaltmalar **Açıklama**

MUFA : Tekli doymamış yağ asitleri
PUFA : Çoklu doymamış yağ asitleri
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
TEM : Transmisyon elektron mikroskobu
NP : Nanopartikül
LSPR : Lokalize yüzey plazmon rezonans
SPR : Yüzey plazmon rezonansı
SPs : Yüzey plazmonları
AgNP : Gümüş nanopartikül
AuNP : Altın nanopartikül
DLS : Dinamik ışık saçılımı
FTIR : Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
XRD : Toz difraksiyonu

EDS : Enerji dağılımlı spektroskopi

RSD : Relatif standart sapma

REC : % geri kazanım

FRET : Floresan enerji transfer

NIR : Yakın infrared spektroskopisi

PDA : Fotodiyot dizisi

PAV : *p*-Anisidin değeri

TBA : Tiyobarbitürik asid

MDA : Malondialhedit

TBARS : Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri

TBHP : *Tert*-butil hidroperoksit

FITC : Floresein izotiyosiyanat

AAPH : 2,2′-azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorür

İPA : İzopropil alkol

GC : Gaz kromatografisi

GC-MS : Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi

ESR : Elektron spin rezonans

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAĞLARIN OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN ALTIN NANOPARTİKÜL ESASLI FLOROMETRİK NANO-SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Nida Elif YAVUZ

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa BENER

II. Danışman: Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER

Yağların oksidasyonunda oluşan son ürünler yemeklik yağların tat ve kokularının değişmesine, dolayısıyla bozulmasına neden olmaktadır. Yağların kalitelerinde oluşan bu olumsuz değişiklikler raf ömürlerini de kısaltacağından gıda endüstrisinin önemli sorunlarından biridir. Yağ ve yağ içeren gıdalar başlıca etken hava oksijeni olmakla birlikte oksidasyona uğrarken, ışık, sıcaklık ve çok değerlikli metal iyonları ile oksidasyon hızlanmaktadır. Bu olaya lipid oksidasyonu denmektedir. Bu proses kendiliğinden oluşan, serbest radikal zincir reaksiyonudur ve üç aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalar başlangıç, gelişme ve sonlanma basamaklarıdır. Başlangıç aşamasında, serbest radikaller yağda çözünmüş olan moleküler oksijeni yakalayarak peroksil radikallerini oluşturmaktadır. Gelişme aşamasında gerçekleşen net reaksiyon oksijen ile doymamış yağ asitlerinin tepkimeye girmesini ve oksidasyonunun primer ürünleri olan hidroperoksitlerin oluşmasını kapsamaktadır. Son aşamada, radikaller birbiriyle reaksiyona girerek reaktif olmayan ürünler meydana getirirler. Bu tez çalışması kapsamında, yağlarda primer ve sekonder peroksidasyon ürünlerinin tayini için altın nanoparçacık esaslı florometrik nano-sensör geliştirilmiştir. Böylelikle bu tez çalışması kapsamında yağ numunesindeki primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin tayin edilmesi için floresans özelliği gösteren floresein izotiyosiyanat varlığında altın nanoparçacıklar (FITC-AuNP) kullanılarak florometrik nano-sensör geliştirilmiş ve bu nano-sensörü kullanarak toplam oksidasyon değerinin hesaplanması sağlanmıştır. Literatürde bu oksidasyon ürünlerinin belirlenmesiyle ilgili birçok yöntem bulunmasına rağmen tüm oksidasyon ürünlerini birlikte tayin edebilen bir yöntem mevcut

değildir ve geliştirilen nano-sensör bu alanda literatürde bir ilk olmaktadır. Literatürde yer alan diğer yöntemlerin zahmetli kimyasal işlemler içermesi, toksik çözücüler kullanması ve analiz sürelerinin uzunluğu gibi sakıncaları bulunmaktadır. Geliştirilen bu nano-sensör, yağ otooksidasyonunu izleyebilen ilk nano-sensör olarak hızlı sinyal alabilen ve her laboratuvara uyarlanabilecek pratik bir ürün olma avantajlarına sahiptir. Böylelikle, yağ numunesindeki tüm oksidasyon durumunu ve yağ kalitesini belirlemede bir belirteç olarak literatürde kabul gören toplam oksidasyon değerinin hesaplanması, tek bir nano-sensör kullanılarak mümkün olacak ve literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Ocak 2022, 70 sayfa.

Anahtar kelimeler: Yağ oksidasyonu, oksidasyon ürünleri, floresans, altın nano-sensör.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

[DEVELOPMENT OF GOLD NANOPARTICLE BASED FLUOROMETRIC NANO-SENSOR FOR DETERMINATION OF OXIDATION PRODUCTS OF OILS

Nida Elif YAVUZ

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa BENER

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Burcu BEKDEŞER

The end products formed in the oxidation of oils cause the taste and odor of edible oils to change, and thus to degradation. Since these negative changes in the quality of oils will shorten their shelf life, it is one of the important problems of the food industry. While oil and fat-containing foods undergo oxidation, although the main factor is air oxygen, oxidation is accelerated by light, temperature and multivalent metal ions. This phenomenon is called lipid oxidation. This process is a spontaneous, free radical chain reaction and takes place in three stages. These stages are initiation, development and termination. In the initial stage, free radicals capture the molecular oxygen dissolved in the oil and form peroxyl radicals. The net reaction during the development stage involves the reaction of oxygen with unsaturated fatty acids and the formation of hydroperoxides, the primary products of oxidation. In the termination stage, the radicals react with each other to form non-reactive products. Within the scope of this thesis, a gold nanoparticle based fluorometric nano-sensor was developed for the determination of primary and secondary peroxidation products in oils. Thus, within the scope of this thesis, a fluorometric nano-sensor was developed using gold nanoparticles (FITC-AuNP) in the presence of fluorescein isothiocyanate, which shows fluorescence, for the determination of primary and secondary oxidation products in the oil sample, and the total oxidation value was calculated using this nano-sensor. Although there are many methods for the determination of

these oxidation products in the literature, there is no method that can determine all oxidation products together and the developed nano-sensor is a first in the literature in this field. Other methods in the literature have drawbacks such as laborious chemical processes, use of toxic solvents and long analysis times. This developed nano-sensor has the advantages of being the first nano-sensor to monitor lipid autooxidation, receiving fast signals and being a practical product that can be adapted to any laboratory. Thus, the calculation of the total oxidation value, which is accepted in the literature as an indicator in determining the entire oxidation state and oil quality in the oil sample, will be possible by using a single nano-sensor and will make a significant contribution to the literature.

January 2022, 70 pages.

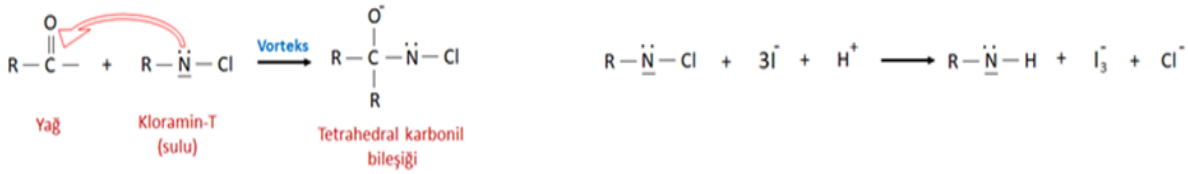
Keywords: Lipid oxidation, oxidation products, fluorescence, gold nano-sensor.

1 GİRİŞ

Yağın yükseltgenme düzeyi gıda endüstrisi için önemli bir kalite kriteri olup oksidasyon işleminin ilerleyişini izlemek ve yağların oksidatif kararlılığını saptamak açısından önem taşımaktadır. Yağların oksidasyonu sonucunda tat ve kalitelerinde oluşan olumsuz değişiklikler raf ömürlerini de kısaltacağından gıda endüstrisinin önemli sorunlarından biridir. Ayrıca yiyecek sektöründe kızartma yağlarının çok defa ardışık kullanımı sağlık açısından ciddi bir tehdittir. Yağların oksidasyonu hem yağ kalitesini düşürmekte hem de oksidatif stres kaynaklı hastalıklara zemin hazırlayacak reaktif türlerin oluşmasıyla beslenme güvenliğini azaltabilmektedir.

Yağ ve yağ içeren gıdalar hava oksijeni ile oksidasyona uğramaktadırlar. Oksidasyona yol açan başlıca etken hava oksijeni olmakla birlikte, ışık, sıcaklık ve çok değerlikli metal iyonları oksidasyonu hızlandırmaktadır. Bu olaya 'lipid otooksidasyonu' denmektedir. Bu proses kendiliğinden oluşan bir reaksiyon olup başlıca doymamış yağ asitleri veya türevlerinin oksidasyonunu kapsamaktadır [1]. Oksidasyonla bozulma sonucu acı (ransit) tat ve aroma oluşumu, pigmentlerde renk açılması, tat-koku kaybı ve bozuklukları, vitamin ve yağ asitlerinin tahribatından ötürü besleyicilik değerinin azalması ve toksik oksidasyon ürünlerinin oluşması gibi etkiler görülmektedir [2]. Oksidasyon işleminin nasıl ilerlediğini izlemek ve yağların oksidatif kararlılığını saptamak için primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin derişiminin belirlenmesi önem arz etmektedir. Literatürde bu oksidasyon ürünlerinin belirlenmesiyle ilgili birçok yöntem bulunmasına rağmen bunların zahmetli kimyasal işlemler içermesi, seçimli olmaması, toksik çözücüler kullanması ve analiz sürelerinin uzunluğu gibi sakıncaları bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, yapılarında ortak olarak karbonil (C=O) grupları içeren küçük moleküllü aldehit, keton, organik asit, alkol, ester, hidrokarbon vb. sekonder oksidasyon ürünlerinin tayinine yönelik nanoparçacık esaslı yöntem geliştirilmiştir. İkincil yağ oksidasyon ürünleri olan karbonil grubu içeren bileşikler ile suda çözünen kloramin-T reaktifinin reaksiyonu sonucunda tetrahedral (düzgün dörtyüzlü şekilli) bir karbonil bileşiği oluşmaktadır. Yağ karbonilleri ile hekzan fazında reaksiyona girmeden kalan kloramin-T ise sulu fazda potasyum iyodür ile muamele edilerek iyodür iyonlarını (moleküler iyot ile iyodürün bir kompleksi olan) triiyodür'e (I_3^-) yükseltgemektedir [3].



Şekil 1.1: İyodür iyonlarının (I^-) Kloramin-T varlığında triiyodüre (I_3^-) yükseltgenme reaksiyonunun şematik gösterimi.

Önerilen Floresein-5-izotiyosiyonat-altın nanoparçacık (FITC-AuNP) sensörü iyodürü yüksek hassasiyetle tayin edebilen bir sensördür. Bu çalışmada, yağdaki sekonder peroksidasyon ürünleriyle reaksiyona girmeden kalan kloramin-T fazlası sulu fazda iyodür iyonları ile reaksiyona girmekte ve alkenal miktarı arttıkça sulu fazdaki kloramin-T derişiminde azalma meydana gelmektedir. Kloramin-T miktarı azaldıkça, daha az iyodür iyonu ile tepkimeye girmesi sonucu iyodür derişimindeki azalmanın ölçülmesi alkenal bileşiklerinin dolaylı olarak tayinine olanak vermektedir. Literatürde FRET (floresans enerji transferi) mekanizması olarak bilinen prensibe göre; iyodürün Floresein-5-izotiyosiyonat-altın nanoparçacık (FITC-AuNP) sensörünün (floresans sönümü: turn-off) yüzeyine adsorpsiyonu sonucu nanoparçacık yüzeyinden yer değiştirme tepkimesiyle FITC molekülleri serbest hale geçmekte ve floresansta artış gözlenmektedir (turn-on) [4]. Sonuç olarak, karbonil grubu içeren sekonder yağ peroksidasyon bileşiklerinin standart çözeltileri ile FITC-AuNP sensörü muamele edildiğinde, artan karbonil bileşikleri miktarı ile floresans şiddeti orantılı olarak artış göstermektedir.

FITC-AuNP sensörü kullanılarak benzer bir mekanizma ile primer peroksidasyon ürünleri olan lipid peroksitler de tayin edilebilmektedir. Bunun için peroksitlerin iyodürü yükseltgeme yeteneğinden yararlanılmaktadır. Ortamda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak oluşan peroksitler KI varlığında indirgenmekte, böylece başlangıçtaki iyodür derişiminde azalma gözlenmektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen bu nano-sensör, yağ otooksidasyonunu izleyebilen ilk nano-sensör olarak hızlı sinyal alabilen ve her laboratuvara uyarlanabilecek pratik bir ürün olma avantajlarına sahiptir. Böylelikle, yağ numunesindeki tüm oksidasyon durumunu ve yağ kalitesini belirlemede bir belirteç olarak literatürde kabul gören toplam oksidasyon değerinin hesaplanması, tek bir nano-sensör kullanılarak mümkün olacak ve literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

2 GENEL KISIMLAR

2.1 LİPİDLER

Lipidler, karbonhidrat ve proteinler gibi organizmaların ihtiyacı olan enerjiyi sağlayan, canlılık faaliyetlerinin devamlılığı için gerekli olan temel makro besinlerden biridir. Lipidlerin sağladığı enerji miktarı diğer makro besinlere kıyasla daha fazladır.

Yağların temel yapısı gliserol ve yağ asitlerinden meydana gelen triaçilgliseroldür (TAG). Yağın yapısında bulunan bu bileşenlerden gliserol, tüm yağlı bitkilerde aynı yapıya sahipken yağ asitleri değişkenlik gösterir [5]. Bu durum yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerini, yağ asitlerinin yapısına ve yağ asitlerinin gliserol iskelet üzerindeki durumuna bağlı hale getirmektedir.

Yağlar suda çözünemezler, ancak eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünürler [6]. Bu özellikleri ile birlikte özellikle yağda eriyen vitaminlerin taşınmasında ve metabolik reaksiyonların esansiyel bileşiklerinin oluşturulmasında görev alırlar [7].

2.1.1 Yağ Asitleri

Yağların temel bileşenleri olan yağ asitleri $CH_3(CH_2)_xCOOH$ kapalı formülü ile gösterilir. Yapılarında bulundurdukları karboksilik grup (-COOH) yağ asitlerinin hidrofilik ucunu oluşturur, yapının geri kalan kısmı uzun hidrofobik zincir ile devam etmektedir.

Yağ asitlerinin uzunlukları içerdikleri C sayısı ile ifade edilebilir, bu da 14-22 C arasında değişiklik gösterir. En yaygın yağ asitleri 16 ve 18 C'lu olarak bilinenleridir [8].

Yağ asitleri doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki gruba ayrılırlar. Bu sınıflandırma yapılarında çifte bağ olup olmamasına göre yapılmaktadır.

2.1.1.1 Doymuş Yağ Asitleri

Yapılarındaki hidrokarbon zincirinde bulunan karbon atomları arasında, tekli bağlar bulunduran yağ asitleridir.

Yağ asitinin bünyesindeki karbon zinciri uzadıkça, yağ asitinin yapısı sertleşerek, erime noktasında belirli bir artış görülür. Genel formülü $C_nH_{2n}O_2$ şeklinde gösterilir.

Tablo 2.1: Doymuş yağ asitleri [9].

Adı	Karbon sayısı	Formülü
Butirik asit	4	$CH_3(CH_2)_2$ COOH
Kaproik asit	6	CH_3 $(CH_2)_4$ COOH
Kaprilik asit	8	$CH_3(CH_2)_6$ COOH
Kaprik asit	10	CH_3 $(CH_2)_8$ COOH
Laurik asit	12	CH_3 $(CH_2)_{10}$ COOH
Miristik asit	14	CH_3 $(CH_2)_{12}$ COOH
Palmitik asit	16	CH_3 $(CH_2)_{14}$ COOH
Stearik asit	18	CH_3 $(CH_2)_{16}$ COOH
Araşidik asit	20	CH_3 $(CH_2)_{18}$ COOH
Lignoserik asit	24	CH_3 $(CH_2)_{22}$ COOH
Serotik asit	26	CH_3 $(CH_2)_{24}$ COOH

2.1.1.2 Doymamış Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitlerinin aksine yapılarında en az bir çift bağ bulunduran yağ asitleridir. Çift bağ sayısı, yağın iç yapısını ve görünüş özelliklerini etkilemektedir. Oda sıcaklığında doymamış yağ asitleri genellikle sıvı haldedir. Yapılarında bulundurdukları çift bağlar sayesinde kimyasal tepkimeleri kolaylıkla gerçekleştirebilirler.

Doymamış yağlar yapılarında bulunan çift bağ sayısına göre alt sınıfa ayrılırlar. Yapısında bir adet çift bağ bulunduruyor ise tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) ve en az iki çift bağ bulunduruyor ise çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) olarak isimlendirilirler.

Tablo 2.2: Doymamış yağ Asitleri [9].

Adı	Karbon sayısı	Formülü
Palmitoleik asit	16	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7$ COOH
Oleik asit	18	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7$ COOH
Vaksenik asit	18	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9$ COOH
Linoleik asit	18	$CH_3(CH_2)_4CH=CH(CH_2)CH=CH(CH_2)_7$ COOH
Linolenik asit	18	$CH_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2CH=CH(CH_2)_7COOH$
Araşidonik asit	20	$CH_3(CH_2)_4CH=CH(CH_2)_4(CH_2)_2$ COOH

Doymuş ve doymamış yağlar oda sıcaklığında farklı hallerde bulunabilirler. Doymuş yağlar, yağ asidi kuyruklarının birbirine yakın bir şekilde toplanabilmesi ile triasilgliserollerin nispeten yüksek erime noktalarına sahip olmalarını sağlar, bu da onların oda sıcaklığında katı olarak görünmesine olanak tanır. Bunun tersi doymamış yağ asitleri için geçerlidir ve yağ asidi kuyrukları birbirine çok yakın bir şekilde toplanamadığı için nispeten düşük erime noktalarına sahiptirler [10].

2.2 LİPİD OKSİDASYONU

Yağ ve yağ içeren besinler, çoğu bir tür serbest radikal veya oksijen türünü içeren farklı koşullar altında oto-oksidasyon, foto-oksidasyon, termal oksidasyon ve enzimatik oksidasyona uğramaktadır. Yağ ve yağ içeren gıdalarda kalite düşmesini etkileyen en önemli faktör oksidasyondur. oto-oksidasyon, yiyeceklerin kalitesinin, depolanma sürecinde, bozulmasında ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde rol oynayan ve oksidatif bozulmaya yol açan en yaygın olaydır. Kendiliğinden oluşan bir reaksiyon olup başlıca doymamış yağ asitleri veya türevlerinin oksidasyonunu kapsamaktadır. Bu kimyasal proses zincir tepkimesi şeklinde başlayıp, daha ileri peroksidasyonu başlatacak serbest radikaller için kesintisiz bir kaynak oluşturur. Kendi kendini devam ettiren bu zincir reaksiyonların hücre membranına hasarı geri dönüşümsüzdür [11]. Sağlık alanında yapılan birçok çalışma doymamış yağ asitlerinin çok değerli olduğunu, ancak oto-oksidasyona yatkınlığı nedeni ile de bir o kadar risk içerdiğini göstermektedir.

Yağda kızartma sonucunda ise ısıl oksidasyon söz konusu olacaktır. Yağda kızartma sırasında yaşananlar, serbest yağ asidi ve polar madde muhtevasındaki artışlar, köpüklenme, renk ve viskozite gibi daha yüksek sıcaklıklarda proses hızlandırılabilir.

Oksidasyonla bozulma sonucu meydana gelen çok spesifik bazı etkiler ise şöyle sıralanabilir [12,13,14]:

a) Katı ve sıvı yağlar ile yağ içeren gıdalarda ransit tat ve aroma oluşumu
b) Pigmentlerde renk açılması
c) Toksik oksidasyon ürünleri oluşumu
d) Üründe tat ve koku kaybı ve bozuklukları
e) Vitaminler (A, D ve E) ve esansiyel yağ asitlerinin (özellikle linoleik asit) tahribatından dolayı besleyicilik değerinin azalması.

Lipid hidroperoksitleri, karbonil bileşikleri, hidrokarbonlar, ketonlar ve diğer bozunma ürünleri gıdalarda ransiditeye, tat ve aroma bozulması neden olurken, aldehitler ve doymamış yağ asitleri ise trimetilamin ile birleşmeleri sonucu kırmızı kahverengi renk değişimlerine neden olurlar [15]. Meydana gelen bozulmalar 4 farklı grup altında sınıflandırılabilirler [16].

a) *Hidroliz:* Yağın yapı taşları olan serbest yağ asitleri ile gliserole parçalanması sonucu gıda da sabunumsu bir hal, tat ve koku oluşumu gözlemlenir [16,17,18].
b) *Ransidite:* Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu meydana gelir [16,17,18].
c) *Tat değişimi*: Özellikle bitkisel yağlar, balık yağları ve diğer yüksek derecede doymamış yağ içeren besinlerde 18 C'lu yapıdaki linoleik asitlerin oksidasyonu ile meydana gelir [16,17].
d) *Polimerizasyon:* Tat değişikliğine sebebiyet veren bu reaksiyon doymamış yağlarda iki karbon atomu (C-C) arasındaki zincirin kopması, iki karbon arasında karşı bağ oluşması veya oksijen bağları oluşması sonucu meydana gelir [16,17].

2.2.1 Oksidasyon Mekanizmasını Etkileyen Faktörler

Yağ asitlerinin doymamışlık derecesi ve fosfolipidlerin miktarı, lipidlerin dağılımı, dokudaki aktivatörlerin ve inhibitörlerin varlığı veya yokluğu (heme pigmenti, çok değerlikli metal iyonları, pH değeri, oksidatif enzimler, tokoferol, karetenoid gibi doğal maddeler), ışık, oksijen

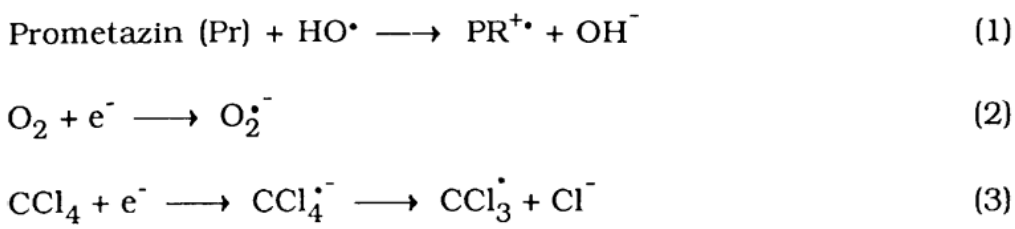
basıncı, su aktivitesi gibi [19] etmenlerin yanında işleme, dondurma ve donmuş depolama koşulları gibi etmenler oksidasyonu etkileyen faktörlerdir [20].

Asidik ortam ve metallerin artması lipid yapılı besinlerin ve bileşiklerin bozulmasını arttırmaktadır [21,22].

2.2.2 Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış orbitallerde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron taşıyan, bağımsız olarak varlığını sürdürebilen yüksek reaktiviteye sahip molekül ya da molekül parçalarıdır [23,24].

Serbest radikaller farklı yüklere sahip olabildikleri gibi yüksüz de olabilirler.



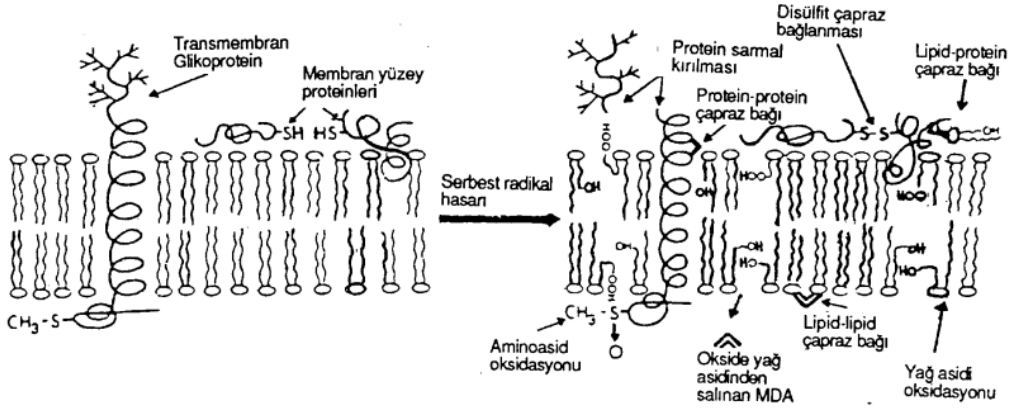
Şekil 2.1: Farklı yüklere sahip radikaller. (1) Pozitif yüklü radikalik yapı [25], (2) Negatif yüklü radikalik yapı [26], (3) Yüksüz radikalik yapı [27].

Serbest radikaller, yağ yapılarında doymamış yağ asitlerine ve hücre membranında lipoproteinlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Serbest radikallerin en yaygın türleri reaktif oksijen yapılarıdır. Bunlar süperoksid süperoksit (O_2- •), hidroksil radikali (OH^- •), alkoksil radikali (RO•) ve peroksil radikalidir (RO_2•).

2.2.2.1 Serbest Radikallerin Biyolojik Sonuçları ve Hastalıklardaki Rolü

Normal hücrelerde, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma arasında bir denge vardır [28]. Bu denge elverişsiz olduğunda hücre ve dokularda reaktif oksijen bileşiklerinin oluşumu artar ve bu durum oksidatif stres olarak açıklanır. Oksidatif stresin sebep olduğu oksidatif hasar, lipidler, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türleri etkileyebilir (Tablo 2.4) [29]. Oksidatif stres, artrit, yaşlanma, oto-immün hastalıklar, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi kronik ve dejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar [30].

Oksijen radikallerinin, obezite veya diyabet gelişiminde rol oynadığı ve ayrıca insülin direncini arttırdığı düşünülmektedir [31]. Serbest Radikal Yaşlanma Teorisi, yaşlanmanın hastalık ve ölümü artıran serbest radikal biyolojik hasarın birikmesinden kaynaklandığını ileri sürer [32]. Hücre içi organellerin membranlarında olan lipidler, serbest radikal hasarına karşı önemli derecede hassastır. Serbest radikaller, lipidler ile reaksiyona girdiğinde meydana gelen lipid peroksidasyonu membran akışkanlığı ve reseptör sıralanışındaki bozulmaya sebep olarak hücre ölümü ile sonuçlanabilir [33].



Şekil 2.2: Lipid peroksidasyonunun yol açtığı membran hasarı [34].

Tablo 2.3: Serbest radikallerin hücredeki başlıca hedefleri ve sonuçları [34].

Hedef	Sonuç
***Mikromoleküller**	
Doymamış ve tiyol içeren amino asitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağlanma, enzim inhibisyonu
	Organel ve hücre geçirgenliğinde değişmeler
Nükleik asit bazları	Hücre siklusunda değişiklik, mutasyonlar
Karbonhidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişiklikler
Doymamış yağlar	Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu
	Lipid çapraz bağlanması
	Organel ve hücre geçirgenliğinde değişiklikler
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktör ve aktivitesinde azalma, askorbat ve porfirin oksidasyonu
Nörotransmitterler	Nörotransmitter ve aktivitesinde azalma
Antioksidanlar	Tükenme (α-tokoferol ve ß-karoten dahil)
***Makromoleküller**	
Protein	Peptid zincir kırılması, denatürasyon
DNA	Sarmal kırılması, baz modifikasyonu
Hiyaluronik asit	Sinovyal sıvı viskozitesinde değişme

2.2.3 Lipid Oksidasyon Mekanizması

Kendi kendini katalizleyen bu serbest radikal zincir reaksiyonu üç safhaya ayrılabilir [35]. Başlangıç, gelişme-yayılma ve sonlanma.

1. $RH \rightarrow R\cdot + H\cdot$
   $R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ **(Başlangıç)**
2. $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$ **(Gelişme)**
3. $ROO\cdot + H\cdot \rightarrow$
   $ROO\cdot + R\cdot \rightarrow$
   $ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow$
   $R\cdot + R\cdot \rightarrow$
   kararlı son ürünler **(Sonlanma)**

Şekil 2.3: Lipid oksidasyonu safhaları.

Doymamış yağ asitlerinin oto-oksidasyonu, bir üçlü oksijen ($3O_2$) ile başlatılır. Metilen ($-CH_2-$) grubundan bir hidrojen atomu çekmeye yetecek reaktiviteye sahip (genellikle reaktif oksijen türleri söz konusudur) herhangi bir molekülün doymamış yağ asitlerine saldırısı ile reaksiyon zinciri başlatılmış olur. Bu durum hidrojen atomunun koparılması ile C atomu üzerinde

çiftleşmemiş bir elektron (-·CH-) kalmasına sebep olur, HO· bu reaksiyon için yeterli reaktiviteye sahiptir [36].

Kararsız halde olan karbon radikali stabil hale geçmek isteyecektir bunun için konjuge dien yapısını oluşturacaktır [37]. Bu yapılar birçok çeşitli reaksiyon verebilirler ancak aerobik bir ortam söz konusu ise O_2 ile birleşerek peroksil radikalini ROO· (ya da RO_2·) oluşturma eğilimi gösterirler [38,39]. Bu radikaller doymamış yağ asitleri üzerinden H atomu alarak sürekli C radikalleri oluşturacak, oluşan karbon radikalleri de O_2 ile reaksiyon verip yeni peroksil radikallerini oluşturacak böylece kararsız radikal reaksiyon zinciri devam edecektir. Bu safha oksidasyon mekanizmasının gelişme-yayılma safhasını oluşturur. Son aşamada, iki radikal birbiriyle reaksiyona girerek reaktif olmayan bir ürün meydana getirirler [1]. Ancak lipid oksidasyonunun zincir reaksiyonlarının sonlandırılması için peroksit serbest radikallerinin uzaklaştırılmasının veya inaktivasyonunun sağlanması gereklidir [40].

Serbest radikal mekanizması; birinci faz (primer oksidasyon) ve ikinci faz (sekonder oksidasyon) olarak ayırt edilir.

2.2.3.1 Primer Oksidasyon

Primer oksidasyon yavaş ve belli bir düzende gider. Oluşan peroksil radikali bir trigliserid veya serbest yağ asidi ile etkileşerek oksidasyonunun primer ürünleri olan hidroperoksitleri meydana getirir. Genellikle kötü lezzete neden olan hidroperoksitler ilk üründür.

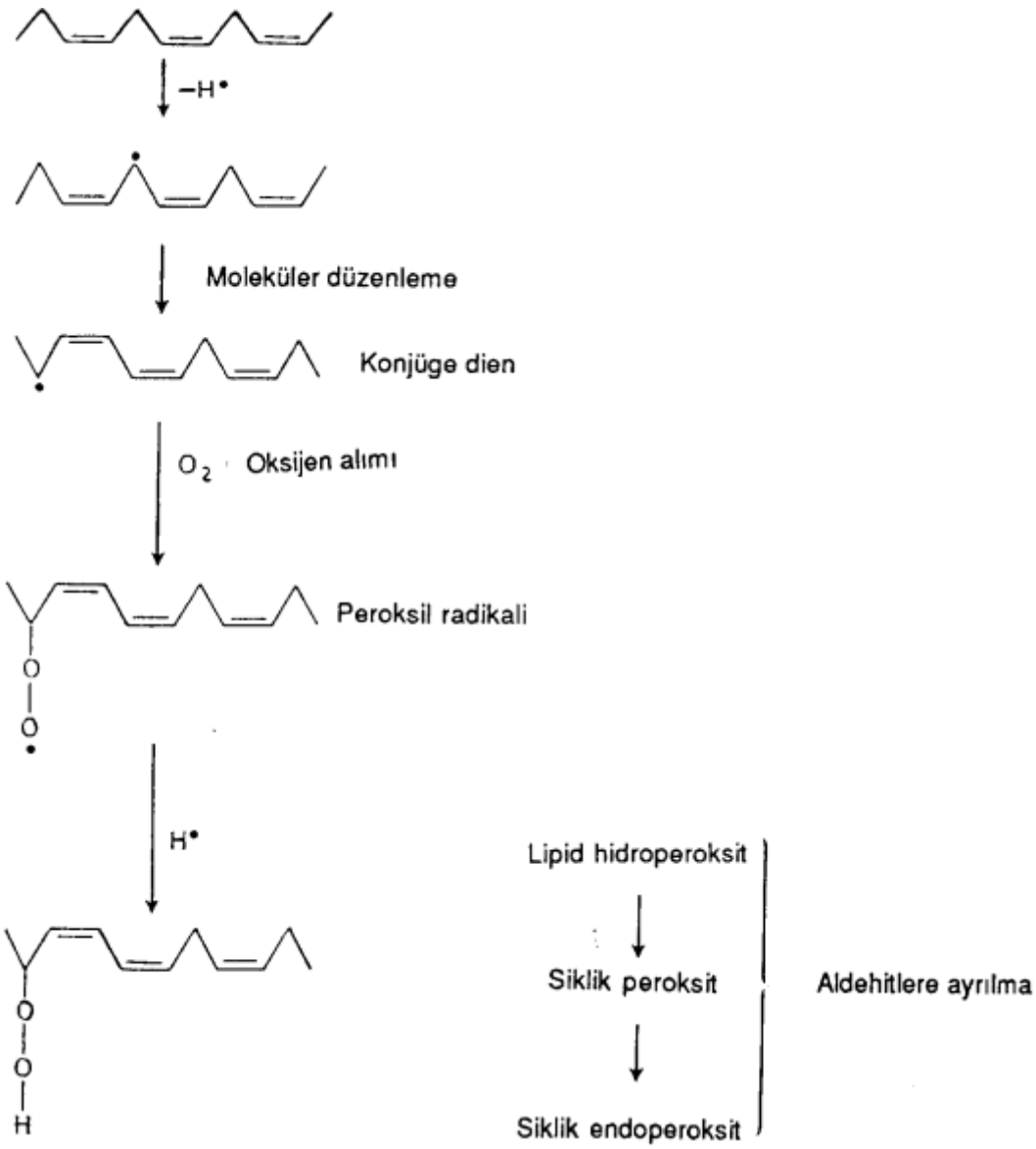
2.2.3.2 Sekonder Oksidasyon

Sekonder oksidasyon olarak isimlendirilen bu fazda oksidatif olaylar primer oksidasyon ürünlerinin dayanıksız olmasından dolayı daha hızlı gerçekleşir ve serbest alkoksi radikallerine parçalanır. Hidroperoksitlerin farklı oluşuna bağlı olarak farklı sekonder oksidasyon ürünleri oluşur [41].

Gerek hidroperoksit bileşikleri gerekse peroksit içeren ve içermeyen dimerler ve oligomerler; bu kararsızlıklarından ötürü birbirleriyle ve yükseltgenmemiş diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek bir yandan büyük moleküllü polimerler, kondense bileşikler ve siklik yapıda epoksit bileşikler oluştururlarken diğer yandan da küçük moleküllü aldehit, keton, organik asit, alkol, hidrokarbon vb. sekonder oksidasyon ürünlerine parçalanırlar (Şekil 2.4). Alkoller daha az miktarda oluşurken doymuş aldehidler (formaldehid, hekzanal), doymamış aldehidler

(akrolein), 4-hidroksi 2 nonenal, 3-dikarbonil bileşikleri (malondialdehid) en fazla oluşan bileşikler arasında sayılır [42].

Hidroperoksit yıkımının başladığı durumda, peroksit değerinin ölçülmesi, lipid oksidasyon derecesinin belirlenmesinde faydalıdır.



Şekil 2.4: Lipid oksidasyon mekanizması [43].

2.3 ÇALIŞMADA KULLANILAN YAĞLAR

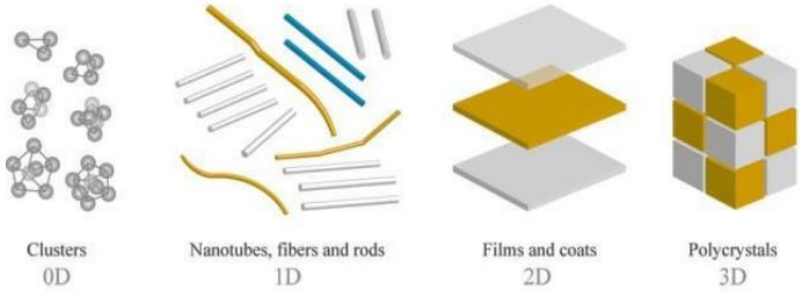
Ayçiçek yağı, yüksek oranda doymuş yağ asitleri içeren, sıvı ve margarin hammaddesi olarak katı yağ üretiminde kullanılan açık sarı renkli bir yağdır. İnsan beslenmesinde önemli bir yere

sahip olan ayçiçek yağı, Rusya, Arjantin, Fransa, Hindistan ve Türkiye başta olmak üzere Dünyanın birçok ülkesinde üretilmektedir. Margarin hammaddesi olarak katı yağ üretiminde kullanılan ayçiçeği yağı, rafine edilerek kullanılır. Ayçiçek yağı %15 doymuş, %85 doymamış yağ asidi içermekte, doymamış yağ asitlerinin %14-43'ünü oleik asit, %44-75'ini linoleik, en fazla %0,7'sini de linolenik asit oluşturmaktadır. Ayçiçek yağının sabunlaşmayan maddeleri içeriği; %0.025-0.031 hidrokarbonlar, %0.542-0.584 steroller, %0.008-0.044 vakslar şeklindedir. Toplam tokoferol içeriği ise yaklaşık olarak 640 mg/kg yağ olup, tokoferollerin %96'sı α–tokoferoldür [44].

2.4 NANOTEKNOLOJI

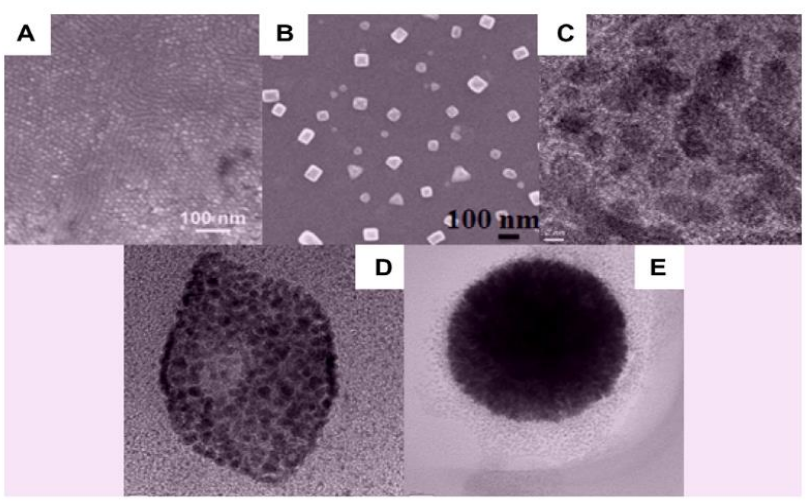
Nanoteknoloji, yeni özellikler ve işlevlere sahip malzemeler, mevcut teknolojileri küçülterek daha ileri düzeyde duyarlı cihazlar ve sistemler üretebilmek amacıyla, nanometre ölçeklerde atom ve molekülleri bir araya getirerek fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklere sahip yapıların ortaya çıkarılmasıdır.1 nanometre (1 nm) veya 10^{-9} metre, birkaç atom veya molekülün bir araya gelmesiyle oluşan ölçü olarak ifade edilebilir [45]. Kullanılan bu nanometre ölçek atom ve molekülleri toplu halde içine alır. Bu boyutta atomların çoğu yüzeyde ya da yüzeyden bir tabaka uzakta yer alır. Boyutlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan bu ara yüzeyin yanı sıra kontrol edilebilen şekillerinin ve morfolojilerinin de etkisi ile mikrometrik veya daha büyük moleküllerden üstün özellikler göstermektedirler. Bunlar; optik, fiziksel dayanıklılık, kimyasal reaktivite, elektriksel iletkenlik ve manyetizm gibi özelliklerdir [46].

Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanoyapılar, boyutları 1-100 nm arasında olan ve en az bir boyutu olan nesne olarak tanımlanmaktadır. Nanoyapılar şekillerine göre 0D, 1D, 2D ve 3D olarak sınıflandırılmaktadır [47].



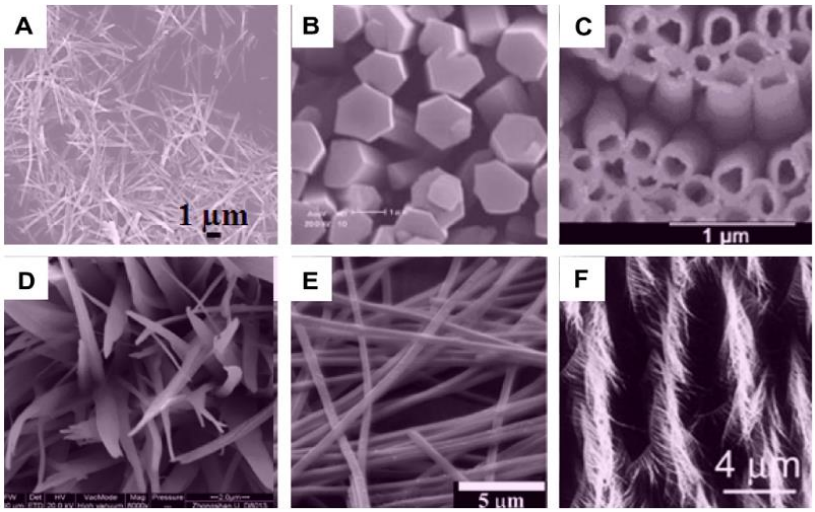
Şekil 2.5: Şekillerine göre nanoyapılar [48].

1. Nanokümeler, her uzaysal boyutta 1-100 nm arasında boyutlara sahip olan 0D olarak sınıflandırılan nanoyapılardır.



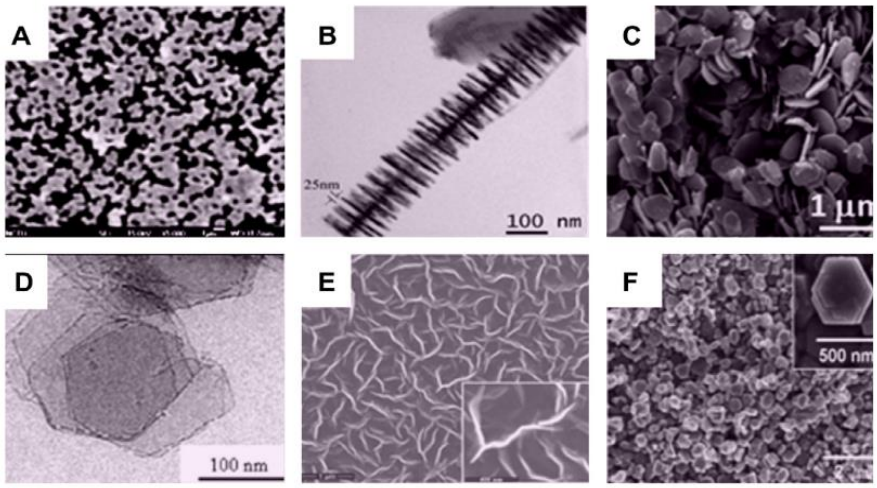
Şekil 2.6: Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen farklı 0D nanoyapılı türlerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) görüntüsü. (A) Kuantum noktaları [20], (B) nanoparçacık dizileri, (C) çekirdek-kabuk nanoparçacıkları, (D) içi boş küpler ve (E) nanoküreler [49].

2. Nanotüpler ve nanoteller, 1-100 nm arasında karakteristik bir çapa ve çok daha uzun olabilecek uzunluğa sahip 1D olarak sınıflandırılan nanoyapılardır.



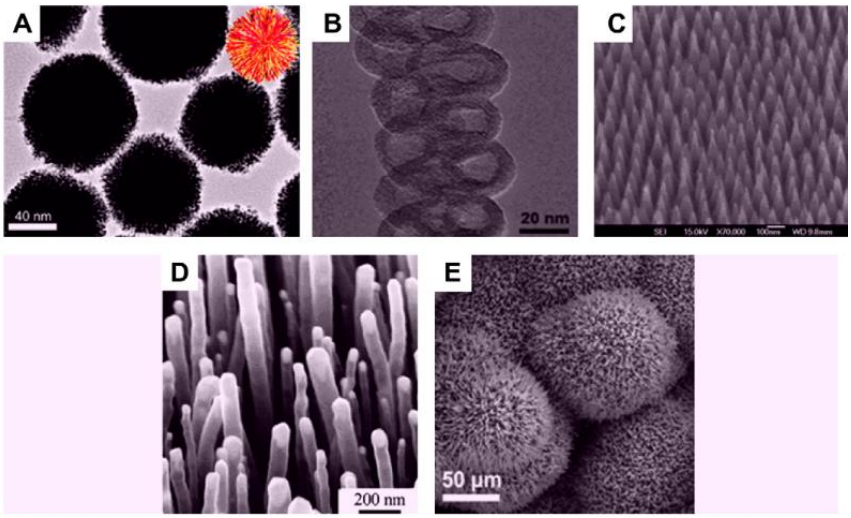
Şekil 2.7: Birkaç araştırma grubu tarafından sentezlenen farklı 1D nanoyapılı türlerinin SEM görüntüsü. (A) Nanoteller, (B) nanoçubuklar, (C) nanotüpler, (D) nanokayışlar, (E) nanoşeritler ve (F) hiyerarşik nanoyapılar [49].

3. Nanodokulu yüzeyler veya ince filmler 1-100 nm arasında kalınlığa sahipken, diğer iki boyut çok daha büyüktür. Bu yapılar 2D olarak sınıflandırılan nanoyapılardır.



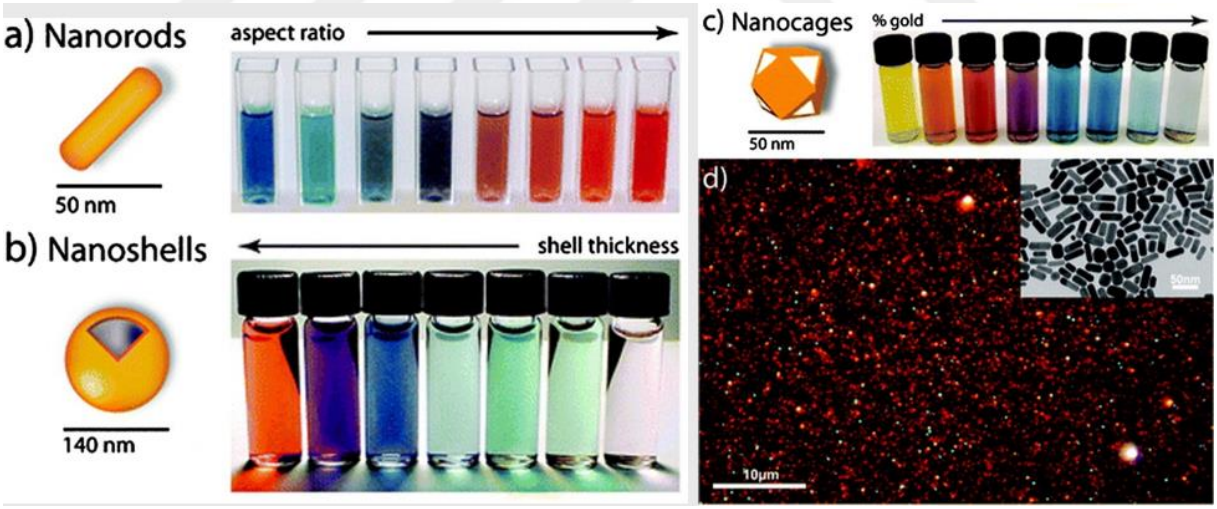
Şekil 2.8: Çeşitli araştırma gruplarımız tarafından sentezlenen farklı türdeki 2D nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü. (A) Bağlantılar (sürekli adalar), (B) dallı yapılar, (C) nanolevhalar, (D) nanolevhalar, (E) nanoduvarlar ve (F) nanodiskler [49].

Hacimsel malzemeler, tüm boyutları 100 nm'nin üzerinde olan ve 0D, 1D, 2D nanoyapılarını içeren 3D olarak sınıflandırılan nanoyapılardır.



Şekil 2.9: Çeşitli araştırma grupları tarafından sentezlenen farklı türdeki 3B nanoyapıların SEM ve TEM görüntüsü. (A) Nanotoplar (dendritik yapılar), (B) nano bobinler, (C) nanokoniler, (D) nanopiller ve (E) nanoçiçekler [49].

Şekil 2.10' un gösterdiği gibi, en-boy oranındaki, kabuk kalınlığındaki ve % altın konsantrasyonundaki değişimler NP'lerin absorpsiyon özelliklerini etkiler buna bağlı olarak farklı absorpsiyon renkleri gözlemlenir.



Şekil 2.10: Boyut ve şekle bağlı AuNPs'lerin renk değişimi [50].

2.4.1 Soy Metal Nanopartiküller

NPs'ler boyuta bağlı özelliklere sahiptirler. Bu nedenle boyutları nano ölçeğe yaklaştıkça ve bir malzemenin yüzeyindeki atom yüzdesi önemli hale geldikçe, malzemelerin temel fiziksel ve kimyasal özellikleri değişecektir. Bu durum optik, elektrik ve mekanik özellikleri

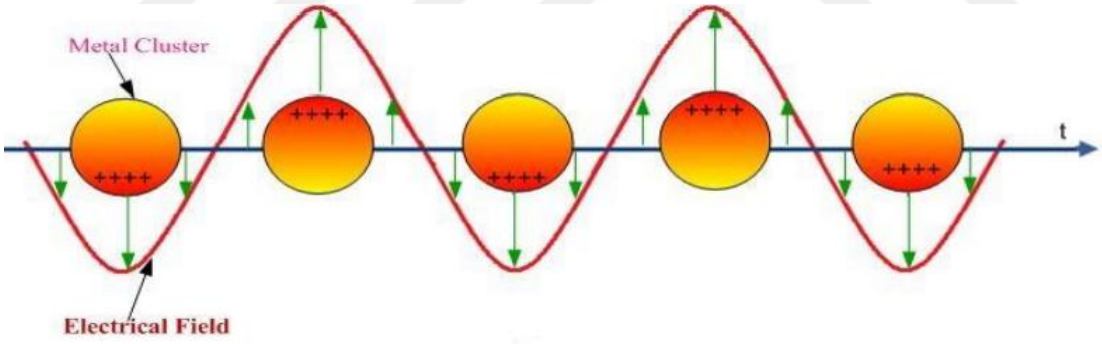
bakımından üstün yapıları oluşturacaktır [51]. Metal NP'ler sahip oldukları Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) özelliği nedeniyle üstün optik özellikler sergilemektedirler.

2.4.2 Soy Metal Nanopartiküllerde Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

Polarize ışık herhangi bir boyuttaki metal yüzeye çarptığında, ışık dalgalarının bir kısmı metal yüzey boyunca yayılır ve soğurulur, bir kısmı ise yansımaktadır. Bu durum Mie teorisi olarak tanımlanabilir.

Drude-Lorentz modeline göre eşit sayıda pozitif iyon (sabit pozisyonda) ve iletim elektronu (serbest halde ve oldukça hareketli) içerdiğinden Alkali metaller, Mg, Al ve Au ve Ag gibi soy metaller plazma olarak ifade edilir.

Bu durumda elektromanyetik dalga ışıması altında metal yüzeyde bulunan serbest elektronlar, bir plazma frekansında tutarlı bir şekilde salınım yapmak üzere elektrik alan tarafından harekete geçirilirler. Elektronların bu plazmonik davranışı da yüzey plazmonları (SPs) olarak ifade edilir [52]. Plazmonik davranış, bir metaldeki (ya da yarı iletkendeki) iletim elektronlarının toplam osilasyonu (salınımı) olarak tanımlanan fiziksel bir kavramdır [53].



Şekil 2.11: SPR'nin şematik gösterimi.

Rezonans, nanoparçacık boyutundan daha büyük bir dalga boyunda ışıma geldiğinde meydana gelen dalga boyundaki ilgili kayma olarak tanımlanan spektral duyarlılık, yüzey plazmon absorpsiyonunun pozisyon ve genişliğine ayrıca metalin cinsine ve nanoparçacıkların şekline bağlıdır. Yüzeyde meydana geldiği için bu olaya yüzey plazmon rezonans (SPR) denilmektedir [54]. Yüzey plazmon absorbansının şiddeti de rezonans da olduğu gibi, nanoparçacıkların boyutuna, şekline, eş büyüklüklü dağılımına, nanoparçacığı çevreleyen ortamın bileşimine ve nanoparçacıklar ile stabilize edici ligandlar arasındaki etkileşime bağlıdır [55,56].

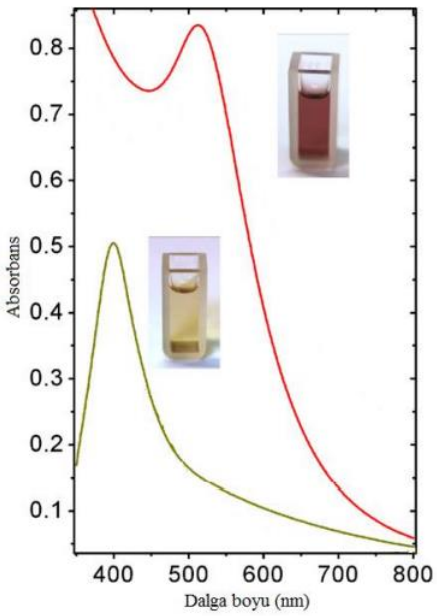
2.4.3 Altın ve Gümüş Nanopartiküller

2.4.3.1 Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) Sistemi

Metalik nanoyapıların (gümüş ve altın) kullanıldığı yüzey plazmon resonans sistemlerine lokalize yüzel plazmon rezonans sistemleri denir [57,58]. Metal nanomaddeler bir ışık ile etkileşime geçtiğinde, anlık fotonlar parçaları emilir ve fotonlar farklı yönlere saçılır. Yüzey yakınındaki elektriksel alan çok daha fazla olur.

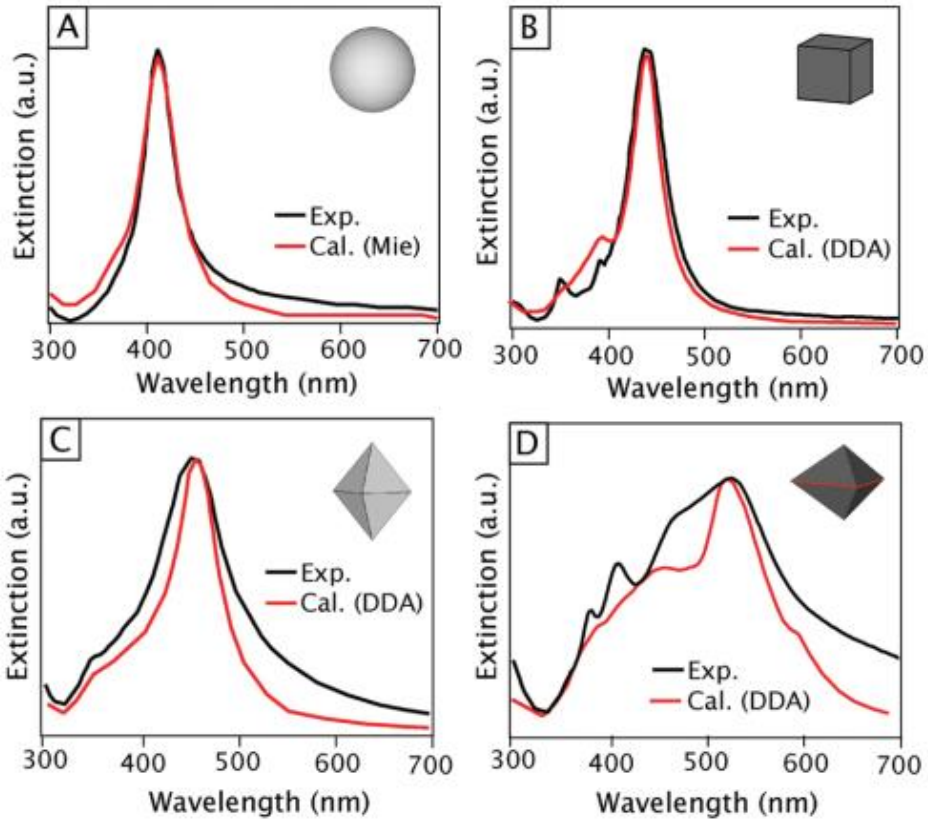
NP'lerin metal bileşimi, şekli, boyutu ve çevreleyen çevresel ortamı SPR özelliklerini değiştirmektedir. Bu faktörlere göre SPR özellikleri üzerindeki etkiler şu şekilde özetlenebilir;

i) *Metal Kompozisyon:* Farklı metaller farklı SPR özelliği sergilerler. Altın ve Gümüş nanopartiküller en geniş kullanım alanına sahiptirler. 40 nm çapındaki Gümüş nanopartiküller (AgNPs) 400 nm de plazmon piki verirken aynı boyutlardaki Altın Nanopartiküller (AuNPs) 530 nm de plazmon piki vermektedirler (Şekil 2.12) [59,60]. Bunun sonucu olarak aynı boyutlu olan iki nanopartikülden AuNPs'ler daha belirgin kırmızıya kayma eğilimi gösterirler.



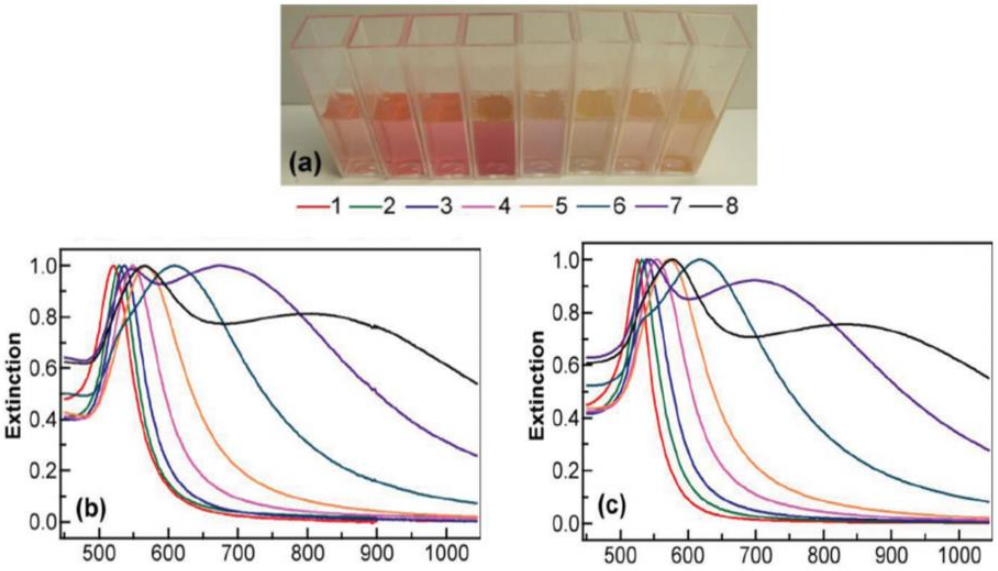
Şekil 2.12: Gümüş ve altın nanoparçacıkların yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu.

ii) *Materyalin Morfolojisi:* Farklı morfolojiye sahip NPs'ler farklı SPR özelliklerine sahiptirler. Şekil 2.13 da görüldüğü gibi NPs'lerin şekilleri küremsi yapıdan uzaklaştıkça plazmon absorpsiyon pikinde kırmızıya doğru kayma olmaktadır.



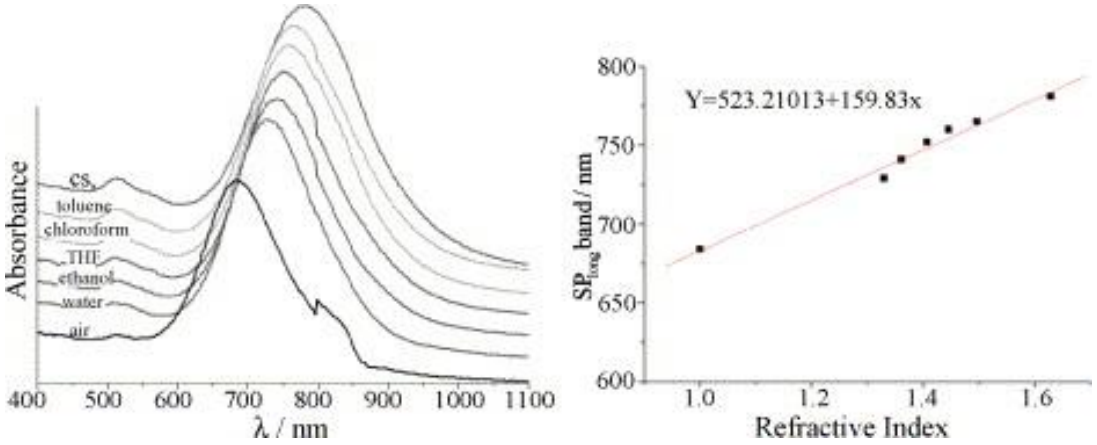
Şekil 2.13: (A-D) Deneysel (siyah) ve hesaplanmış (kırmızı) absorpsiyon spektrumları. (A) 40 nm çapında Ag küreler, (B) kenar uzunluğu 40 nm küpler, (C) kenar uzunluğu 40 nm oktahedronlar, (D) ve kenar uzunluğunda 75 nm sağ bipiramit. Deneysel veriler sulu çözelti ölçümlerinden elde edilmiş ve hesaplanan veriler sırasıyla Mie teorisi (küreler) ve DDA yöntemi (diğer şekiller) kullanılarak elde edilmiştir [59].

iii) *Parçacıkların Boyutu:* Parçacık boyutu NPs'lerin optik özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Daha büyük parçacıklar daha güçlü saçılma meydana getirmeye eğilimlidir [61]. Şekil 2.14' de verilen spektrumlar farklı boyutlarda elde edilen AuNPs'lere ait kolloidal çözeltilerine aittir. AuNS'lerin ortalama çapı 24 nm'den 221 nm'ye yükseldiğinde, plazmon absorpsiyon piki kademeli olarak 521 nm'den 806 nm'ye kayar. Daha büyük boyutlara sahip AuNS'ler için artan ışıma kayıpları nedeniyle tepe genişlemesi açıkça gözlenir [62]. 1'den 8'e kadar olan örnekler, ortalama çapları 24 ± 2 nm, 54 ± 2 nm, 69 ± 3 nm, 88 ± 4 nm, 103 ± 6 nm, 137 ± 9 nm, 177 ± 14 nm ve AuNS örnekleridir. Sırasıyla 221 ± 16 nm. Hesaplamalarda, AuNS'ler, çapları karşılık gelen ortalama değerlere eşit olacak şekilde modellenir. Tüm absorpsiyon spektrumları, karşılaştırma amacıyla normalleştirilmiştir.



Şekil 2.14: AuNS örneklerinin renkleri ve absorpsiyon spektrumları. (a) Farklı boyutlardaki AuNS numunelerinin kolloidal çözeltilerinin dijital fotoğrafı, sırasıyla soldan sağa numuneler 1 ila 8'e karşılık gelir. (b) Bir UV/görünür/NIR spektrofotometresinde ölçülen 1 ila 8 numunelerinin normalleştirilmiş absorpsiyon spektrumları. (c) Mie teorisine göre hesaplanan normalleştirilmiş absorpsiyon spektrumları.

iv) *Parçacıkları Çevreleyen Çevresel Ortam:* Nanoparçacıkların etrafını çevreleyen ortamın değişmesi rezonans açısını etkiler. Rezonans açısı, kırılma indisi değişikliklerine karşı duyarlıdır, genellikle ortamın yüksek kırılma indisine sahip olması düşük plazmon frekansı meydana getirir (Şekil 2.15).



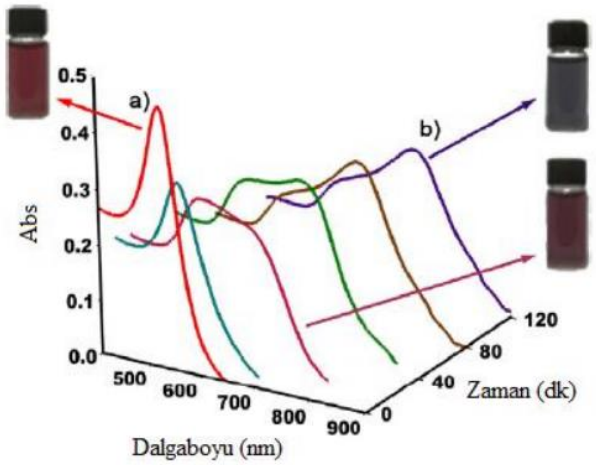
Şekil 2.15: Farklı çözücülerdeki (solda) altın nanoçubukların deneysel spektrumları ve kırılma indeksi ile uzunlamasına plazmon bant pozisyonundaki değişim (sağda) [63].

2.4.3.2 Altın Nanopartiküllerin Agregasyonu

Metal nanoparçacıkların agregasyonu, plazmon absorpsiyonunda daha uzun dalga boylarına kaymaya ve daha düşük plazmon frekanslarına neden olur.

Altın nanoparçacıklar, kolaylıkla polarize olabilen çok sayıda elektrona sahiptir ve gelen ışığın elektromanyetik alanıyla etkileşimi sonucu yüzeyindeki bu elektronlar 520 nm civarında görünür bölgede geniş bir absorpsiyon bandı (yüzey plazmon bandı) oluşturur.

Altın nanoparçacıklarda agregasyon şiddette bir azalmaya sebep olarak yüzey plazmon rezonans (SPR) pikinde uzun dalga boyuna kaymaya sebep olur. Ayrıca agregasyon devam ederse 720 nm'de lokalize yüzey plazmon bandı gözlenir ve bu spektral değişimlerle kolloidal çözeltideki renk değişimi kırmızıdan maviye doğru kayar [64]. AuNP agregasyonu, AuNP oluşumundan farklı olarak çok daha yüksek molar absorptivite değerlerine ve dolayısıyla yüksek tayin duyarlılığına neden olmaktadır.



Şekil 2.16: Kolloidal çözeltideki renk değişimi, UV-vis absorpsiyon spektrumunda yüzey plazmon rezonans (SPR) pikinin uzun dalgaboyuna kayması [64].

2.4.3.3 Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Nano malzeme ve yapı üretilmesinde yukardan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya olarak iki üretim yaklaşımı bulunmaktadır [65]. Yukardan-aşağıya olarak isimlendirilen ilk yaklaşımda bütün halindeki malzeme ile işleme başlanır ve malzeme küçük parçalara ayrılır. Aşağıdan yukarıya üretim yaklaşımında ise atom ve moleküler boyutlarla başlanıp, kimyasal reaksiyonlarla boyutça büyüme sonucu malzeme sentezlenerek elde edilir. Atomik ve moleküler elemanlar daha büyük sistemler, kümeler, organik örgüler, çok moleküllü yapılar ve sentezlenmiş makro-moleküller oluşturacak şekilde kontrollü olarak bir arada toplanması sağlanır [66].

Altın (III) türevlerinin indirgenmesiyle 20 nm civarında altın nanoparçacıkların hazırlanmasını sağlayan ve en çok baş vurulan klasik sentez yöntemlerinden biri, 1951‟de Turkevich tarafından ortaya konan $HAuCl_4$'ün sudaki çözeltisinin sitrat ile indirgenmesiyle oluşan küresel altın nanoparçacık sentez yöntemidir [67]. Bu yöntemde hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak sitrat molekülleri kullanılır. Frens, bu yöntemi geliştirerek 1973 yılında kontrollü oluşum aracılığıyla istenilen boyutta (16-147 nm aralığında) altın nanoparçacıklar hazırlamak amacıyla indirgeyici/stabilize edici ajanların oranlarının (trisodyum sitratın altın türevlerine oranının) değiştirildiği bir yöntem önermiştir [68].

2.4.3.4 Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanoparçacıklar karakterize edilirken genellikle boyutlar, şekil, yüzey alanı ve dağılımları gibi özelliklerine başvurulmaktadır. Bu özelliklerin homojenliği birçok uygulamada önem teşkil etmektedir. Nanoparçacıkların karakterize edilmesinde yaygın olarak kullanılan teknikler ise şu şekilde verilebilir: UV-görünür bölge spektrofotometrisi, dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), toz difraksiyonu (X-ışını kırınımı) (XRD) ve enerji dağılımlı spektroskopi (EDS) [69,70].

Nanoparçacıkların optik özellikleri UV-görünür spektroskopisi (UV-vis spektroskopisi) ile değerlendirilebilir. NP'lerin kütle konsantrasyonunu Beer'in yasasına göre ölçmek için basit ve kullanışlı bir analitik tekniktir. Bir numune tarafından emilen ve dağılan ışığı ölçmek için kullanılan tekniktir [71]. NP'ler optik özelliklere sahip olup boyut, şekil, konsantrasyon, aglomerasyon durumu ve nanopartiküllerin yüzeye yakın kırılma indeksine duyarlı olmasından dolayı UV-görünür bölge ile karakterize edilmesi ve incelenmesi için uygundur.

2.5 SENSÖRLER

Sensörler, bir ölçümü (bir miktar veya parametre) bilgi taşıyan bir sinyale dönüştüren algılayıcı sistemlerdir. İnsan vücudunda beş farklı duyu organıyla bağlantılı sensör sistemi bulunmaktadır ve sensörler bu duyulara analog olacak şekilde tasarlanabilirler.

Bir sensör üç elemana sahip olarak tanımlanabilir: reseptör, sinyal dönüştürücü ve okuyucu. Bir reseptör, belirli bir madde veya madde karışımı ile seçici olarak etkileşime girebilen (yani moleküler tanıma), bir reaksiyonu seçici olarak katalize edebilen veya analit ile kimyasal bir dengeye katılabilen kritik bir elemandır. Reseptörün seçici olması hedef analitin diğer girişimlerden ayırılarak tanınmasını sağlamaktadır. Sinyal dönüştürücü ise fiziksel ya da kimyasal olarak meydana gelen değişimleri okuma için farklı forma dönüştürmekten sorumludur. Okumaya iletilen bu form elektronik bir sinyal veya optik değişiklik olabilir.

Sensörlerde genel olarak aranan özellikler [72,73];

i. *Duyarlılık:* Sensörde ölçülen sinyalin değişimi ile hedef molekülün derişimindeki değişimi arasındaki oran olarak tanımlanır [74]. Sensörler yanıt verdikleri

konsantrasyon aralığını belirleyen bir hassasiyet aralığına sahiptir. Bu aralığın altında, temiz sinyal alınması gürültü ve parazitlerden etkileneceği için zordur.

ii. *Seçicilik:* Sensör farklı türleri ayırt edebilmeli ve sadece analite özgün olmalıdır.

iii. *Dedeksiyon limiti:* Analitin tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur.

Bu özellikler haricinde sensörün ölçüm süresi, kararlı olması, tekrarlanabilir olması ve maliyeti gibi özellikleri de sensörün performansını etkileyen özelliklerdir. Aynı zamanda sensörlerin ölçüm sonuçlarında tutarlı olması da önemli bir faktördür.

Tablo 2.4: Sensörlerin sınıflandırılması [75].

Sensör teknolojisi	Tarif
Optik sensörler	Absorbans, reflektör, lüminesans, floresan, kırılma indeksi, optotermal etki ve hafif saçılma prensibine dayanmaktadır.
Elektrokimyasal sensörler	Voltammetrik ve potentiyometrik cihazlar, kimyasal olarak hassaslaştırılmış alan etkisi transistörü ve potensiyometrik katı elektrolit gaz sensörlerinden oluşur
Elektrik sensörleri	Metal oksit ve organik yarı iletkenlere sahip sensörlerin yanı sıra elektrolitik iletkenlik sensörleri
Kütleye duyarlı sensörler	Piezoelektrik cihazları ve yüzey akustik dalgalarına dayalı olanları içerir
Manyetik sensörler	Paramanyetik gaz özelliklerine dayanır (esas olarak oksijen için)
Termometrik sensörler	Analit içeren belirli bir kimyasal reaksiyonun veya adsorpsiyonun ısı etkisinin ölçümüne dayanarak

Sensörleri farklı özellikler altında sınıflandırmak mümkündür. Algılanan enerji transferi türüne göre sensör sınıflandırması Tablo 2.5' de verilmiştir. Sinyal türlerine bağlı olarak sensörler üç ana kategoriye ayrılabilir: fiziksel özellik sensörleri, kimyasal sensörler ve biyosensörler. Fiziksel sensörler sıcaklık, basınç, seviye, nem, hız ve mesafe gibi fiziksel değişikliklere yanıt oluştururlar. Kimyasal sensörler ve biyosensörler spesifik kimyasal analizleri hedef almaktadır, ancak iki sensör arasındaki fark biyosensörlerin biyolojik algılama tanıma elemanına sahip olmasıdır [76].

2.5.1 Kimyasal Sensörler

Kimyasal sensörler, belirli bir analit ile etkileşime giren ve analit konsantrasyonu gibi kimyasal bilgileri alan reseptör ve analitik olarak yararlı sinyale dönüştüren fizikokimyasal dönüştürücü bulunduran sistemlerdir. Kimyasal sensörler hedef bileşene karsı duyarlılığı ve seçimliliği arttırmaktadır [77]. Bu sensörler sinyal iletim yöntemlerine göre yani dönüştürücü türüne üç grupta verilebilir: (1) elektrik ve elektrokimyasal, (2) termometrik ve (3) optik.

2.5.1.1 Optik Sensörler

Optik sensörler dalga-boyu seçilebilir bir ışık kaynağı, analit ile etkileşime giren sensör malzemesi ve alınan sinyali işleyen, kuvvetlendiren ve çıkış veren bir dedektörden oluşur. Dedektörün dayandığı optik parametrelerin (kırılma indisi, saçılma, kırınım, absorbans, yansıma, fotolüminesans, kemilüminesans) değişiklik göstermesi, elektromanyetik spektrumun farklı bölgelerini (UV-IR-NIR-Görünür bölge) kapsayabilir ve birden fazla özelliğin ölçülmesine izin verebilir [78].

2.6 KOLORİMETRİK SENSÖR OLARAK ALTIN NANOPARÇACIKLAR

Kolorimetrik optik sensörler genellikle, analit için seçici olan uygun bir materyal üzerinde tutturulmuş durumda bulunan reaktif ile analitin reaksiyonu sonucunda meydana gelen renk değişimine bağlı olarak oluşturulmaktadırlar. Nanoparçacık kullanılan optik sensörlerin hassasiyetleri genelden farklı olarak böyle bir optik sensörün hassasiyeti, nanoparçacıkların boyutuna, şekline, yapısına ve nanoparçacıkları çevreleyen ortama bağlıdır [48].

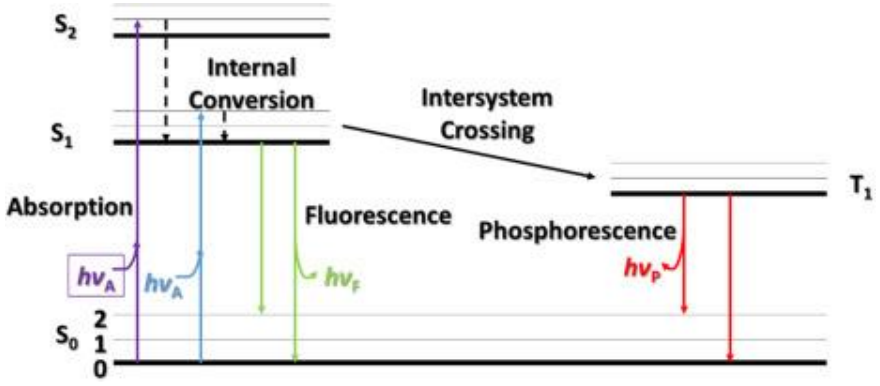
Gümüş ve altın nanoparçacıklar, sahip oldukları yüzey plazmon absorpsiyonlarının çevresel değişimlere olan hassasiyeti sebebiyle altın yüzeyinde bağlayıcı malzemenin optik tayininde kolorimetrik sensör olarak kullanılmaktadır [52]. Altın metali diğer metallere göre atmosferik kirlenmeler ve oksidasyona karşı oldukça dirençlidir. Diğer metaller altın kadar kullanışlı olmayıp örneğin indiyum çok pahalı, sodyum oldukça reaktif, gümüş ise oksidasyana karşı dirençli olmadığı için pek tercih edilmezler.

AuNP tabanlı optik sensörler, kullanılan algılama ilkesine bağlı olarak kolorimetrik sensör, elektrokimyasal, SERS tabanlı, SPR tabanlı ve floresan tabanlı sensörler olarak sınıflandırılabilir.

2.7 FLOROMETRİK SENSÖR OLARAK NANOPARÇACIKLAR

Floresans, Jablonski diyagramında (Şekil 2.17) gösterildiği gibi, uyarılmış elektronların ilk uyarılmış halden (S_1) temel duruma (S_0) foton emisyonu yoluyla enerji düzeyinin değişmesidir. Floresans, duyarlı ve hızlı bir görsel yanıt olduğu için genellikle bir optik dönüştürücü olarak kullanılır. Floresan algılama genellikle şu karakterlerden birini kullanır: floresan enerji transferi (FRET) (“sönümü” veya “artma”), spektral kayma (renk değişimi), floresan yaşam süresi

değişimi ve polarizasyon değişimi. Bu değişiklikler, sensörler ve ilgilenilen analitler arasındaki etkileşim ile tetiklenebilir.



Şekil 2.17: Jablonski diyagramı [79].

Floremetrik sensör olarak nanomalzemeler, eser miktarda analitin taranması için geleneksel floresans moleküllere kıyasla mükemmel fotostabilite, yüksek stabilite ve doğruluk gösterir [80]. Floresans temelli bu sensörler floresan rezonans enerji transferi (FRET) ve agregasyon mekanizmalarına dayanılarak oluşturulmuştur.

2.8 LİTERATÜRDE VAROLAN OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Lipid oksidasyonunun derecesi, kaybedilen doymamış yağ asitlerinin, primer peroksidasyon ürünlerinin, karboniller ve hidrokarbon gazları gibi sekonder ürünlerin miktarlarının ölçülmesine dayandırılan fiziksel (polarografi, infared spektroskopi, refraktometri, floresans ve konjugat dien metodu) ve kimyasal (peroksit değeri, kreis test, total ve uçucu karbonil bileşiklerinin tespiti ve tiyobarbiturik asit test) pek çok analitik yöntemler ile belirlenebilmektedir.

2.8.1 Kimyasal Yöntemler

2.8.1.1 Tiyobarbitürik Asit Testi

Rowley ve arkadaşları tarafından [81] lipid peroksidasyonunun ölçülmesinde Tiyobarbitürik asidin (TBA) testini kullanmışlardır. Yöntemin esası iki mol TBA'in bir mol malondialdehit (MDA) ile reaksiyona girerek asidik ortamda 532 nm'de maksimum absorbans, 553 nm'de emite edebilen kırmızı renkli MDA-TBA kompleksi oluşmasına dayanmaktadır.

Yu ve arkadaşları tarafından [82,83] TBA yöntemi geliştirilerek besinlere uygulanabilir şekilde yenilenmiştir. Böylece numune, doğrudan TBA solüsyonu ile ısıtılarak, sonucunda oluşan butanol ile ekstrakte edilebilmiştir.

Sun ve arkadaşları tarafından [83] TBA, MDA ile oluşan renkli reaksiyon ürününün spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) yöntemi lipid peroksidasyona bağlı oksidatif stresin belirlenmesinde standart bir belirteç olarak kullanılmıştır.

2.8.1.2 Peroksit Değeri Testi

Başvurulan bu kimyasal testte, yağların primer oksidasyon ürünleri olan hidroperoksitler peroksit sayısıyla hesaplanır. Ölçülen peroksit sayısı oksidasyon derecesini gösteren bir parametredir [84]. Yağların bozulma (acılaşma) durumlarının tespiti için peroksit sayısı tayini veya kreiss testi uygulanır. Peroksit sayısı tayinin esası, potasyum iyodürün yağdaki peroksit oksijeni ile okside olarak iyodun serbest hale geçmesi ve bu serbest haldeki iyodun da tiyosülfat ile titre edilerek miktarının bulunmasıdır.

2.8.1.3 Anisidin Değeri Testi

Bu test ile yağlarda bulunan sekonder oksidasyon ürünlerinden olan aldehitlerin, özellikle 2 alkenallerin miktarını belirler. *p*-Anisidin değeri, okside olmuş bir yağda peroksitler daha ileri safhalarda karbonil gibi bozunmuş sekonder türlere dönüşürler. Anisidin değeri yüksek molekül ağırlıklı bu karbonil bileşiklerini (aldehitler, 2-alkenler vs.) ifade eder.

Anisidin değeri; 100 ml *p*-anisidin veya çözücü ile 1 gram yağın reaksiyonu sonucu 350 nm dalga boyunda oluşan absorbansın 100 katı olarak tanımlanır.

Diğer sonradan yapılan çalışmalara göre ise bu metodun sekonder oksidasyon ürünlerini tam yansıtamayabileceği bildirilmiştir [84].

2.8.2 Fiziksel Yöntemler

Literatürde Fourier-dönüşümlü infrared spektrometrisi (FTIR), yakın-infrared spektrometrisi (NIR), gaz kromatografisi (GC), Lipid peroksitleri ve aldehitlerin tayini için kullanılan GC-kütle spektrometrisi (GC-MS), peroksitlerin tayini için yüksek performanslı sıvı kromatografisi

(HPLC), termogravimetri, elektron spin rezonans (ESR), aldehitlerin tayini için kullanılabilen floresans yöntemler mevcuttur.

Bu yöntemlerin yanı sıra ticari Rancimat yöntemi gibi sekonder oksidasyon ürünlerinin oluşumuna kadar geçen süreyi (indüksiyon periyodu) ölçen cihazlar mevcuttur.

3 MALZEME VE YÖNTEM

3.1 KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin inkübasyon işlemi için Memmert marka WNB 10 model su banyosu, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde Hanna HI2202 model pH-metre ve bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanılmıştır. Absorbans ölçümlerinde Agilent marka Cary 100 Bio model UV-Vis spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Hellma marka 10 mm ışıma yollu kuartz küvet çifti kullanılmıştır. Floresans ölçümleri için VARIAN Cary Eclipse spektroflorometre ve ölçüm yapmak için Hellma marka 10 mm ışıma yollu kuartz küvet çifti kullanılmıştır.

3.2 KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; Kloramin-T (Ch-T), n-hekzan, potasyum iyodür (KI), potasyum hidroksit (KOH), asetik asit (CH_3COOH), sodyum asetat (CH_3COONa), trans-2-heptenal, trans-2-desenal, trans-2-nonenal, t-t-2,4-dekadienal, 2,4-heptadienal, tetrakloroaurik asit ($HAuCl_4$) çözeltisi, trisodyum sitrat, floresein izotiyosiyanat (FITC), *tert*-butil hidroperoksit (TBHP), kloroform ($CHCl_3$), ksilen oranj, anisidin, demir II çözeltisi (Fe(II)), etanol (EtOH), metanol (MeOH), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), linoleik asit, 2,2′-azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorür (AAPH), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) analitik saflıktadır.

Bu çalışmada Bunge Gıda San. ve Tic. A.Ş. firmasına ait Komili marka ve Savola Gıda San. ve Tic. A.Ş. firmasına ait Yudum marka İstanbul'da yerleşik marketlerden temin edilen yağlar kullanılmıştır.

3.3 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1 Floresein İzotiyosiyanat-Altın Nanopartikül (FITC-AuNP) Esaslı Nano-Sensör Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

38,8 mM sitrat çözeltisi, 0,57 g tartım alınıp distile su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 1,0 mM $HAuCl_4$ çözeltisi hazırlamak için %17'lik ticari stok çözeltisinden 70 µL alınıp bidistile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 2,57 mM FITC çözeltisi, 10 mg tartım alınıp 10 mL EtOH ile

çözülerek hazırlandı. 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 mM FITC çözeltileri, 2,57 mM FITC çözeltisinden distile su ile 1 mL'ye tamamlanıp hazırlandı. $6{,}0\times10^{-3}$ M Ch-T çözeltisi için 0,169 g tartım alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 0,2 M KI çözeltisi için 1,66 g tartım alınıp asetat tamponu ($1{,}0\times10^{-2}$ M, pH 4) ile 50 mL'ye tamamlandı. Ortam pH ayarlamasında 0,2 M fosfat tamponu (pH 8) kullanıldı. 7,27 M stok TBHP çözeltisinden 1:20 (v/v) oranında suyla seyreltme yapılarak 0,36 M çözelti hazırlandı. Linoleik asit (%1,36) metanolde hazırlandı. Linoleik asit peroksidasyon denemesi için 46,35 mM AAPH 0,2 M fosfat tamponunda (pH=7) hazırlandı.

3.4 UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1 FITC-AuNP Esaslı Nano-Sensör Yöntemi

Chen vd. (2009) tarafından sentezlenen FITC-AuNP bazı ufak modifikasyonlar yapılarak bu çalışmada kullanıldı. FITC-AuNP sentezi için, $HAuCl_4$ çözeltisi (1 mM, 100 mL) 90°C'ye kadar reflüks altında ısıtıldı. 90°C'ye ulaşıldığında 10 mL sitrat çözeltisi (38,8 mM, 50 mL) ilave edilerek 15 dakika manyetik balık ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan çözeltiye 100 µL FITC (0,5 mM, 1 mL) ilave edilerek 24 saat buzdolabında bekletildi.

3.4.1.1 FITC-AuNP Esaslı Florometrik Nano-Sensör Yöntemi ile Primer Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini

Primer peroksidasyon ürünleri olan lipid peroksitlerin tayini için öncelikle bir peroksit türü olan *tert*-butil hidroperoksit referans standart olarak kullanıldı. FITC-AuNP yöntemi 2 aşamalı olarak uygulandı.

1. Aşama: x mL (0,3 – 0,7 mL) 0,36 M TBHP çözeltisi + (1,5-x) mL su + 0,2 mL 10^{-2} M asetat tamponu (pH=4) + 1 mL 0,2 M KI çözeltisi. Toplam hacim 2,7 mL'dir.

2. Aşama: Hazırlanan çözeltilerden alınan 1,5 mL üzerine 0,1 mL distile su, 1,8 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH 8), 0,6 mL FITC-AuNP (toplam hacim 4 mL) ilave edilerek floresans şiddetleri (470 nm eksitasyon; 517 nm emisyon) ölçüldü.

Örnek içermeyen reaksiyon karışımına ait floresans şiddeti (I_0) örneğin bulunduğu reaksiyon karışımının floresans şiddetinden (I) çıkartılarak ΔI değerleri hesaplandı.

3.4.1.2 FITC-AuNP Esaslı Florometrik Nano-Sensör Yöntemi ile İkincil Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini

1. Aşama: İkincil peroksidasyon ürünlerinin tayini için; deney tüpü içerisine x mL alkenal, (4,5-x) mL n-hekzan, 1 mL Ch-T çözeltisi ($6{,}0\times10^{-3}$ M) ilave edilip tüpler 15 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Toplam hacim 5,5 mL olacak şekilde hazırlanan reaksiyon karışımı ağzı kapalı olarak 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda sulu fazına çekilen çözelti 2,0 mL n-hekzan çözeltisi ile yıkama yapılarak, tekrar ağzı kapalı olarak 10 dakika bekletildi.

2. Aşama: Toplam hacim 2,7 mL olacak şekilde sulu faza 1 mL KI çözeltisi (0,2 M), 0,2 mL asetat tamponu ($1{,}0\times10^{-2}$ M, pH 4), 0,5 mL distile su ilave edildi.

3. Aşama: Hazırlanan çözeltilerden alınan 1,5 mL üzerine 0,1 mL distile su, 1,8 mL fosfat tamponu (0,2 M, pH 8), 0,6 mL FITC-AuNP (toplam hacim 4 mL) ilave edilerek floresans şiddetleri (470 nm eksitasyon; 517 nm emisyon) ölçüldü.

Referans (blank) aynı hacimlerde, içerisinde alkenal çözeltisi olmayacak şekilde hazırlandı. Örnek içermeyen reaksiyon karışımına ait floresans şiddeti (I_0) örneğin bulunduğu reaksiyon karışımının floresans şiddetinden (I) çıkartılarak ΔI değerleri hesaplandı. Yağ örneğindeki sekonder oksidasyon ürünleri içeriği aşağıda belirtilen formül ile g nonenal/g yağ cinsinden hesaplanır;

$$\frac{(I-I0\pm Int)}{\varepsilon nonenal}\times\frac{5.5\ mL}{V}\times\frac{2.7\ mL}{1\ mL}\times\frac{4\ mL}{1.5\ mL}\times\frac{1\ L}{0.9\ g}\times MA \qquad (3.2)$$

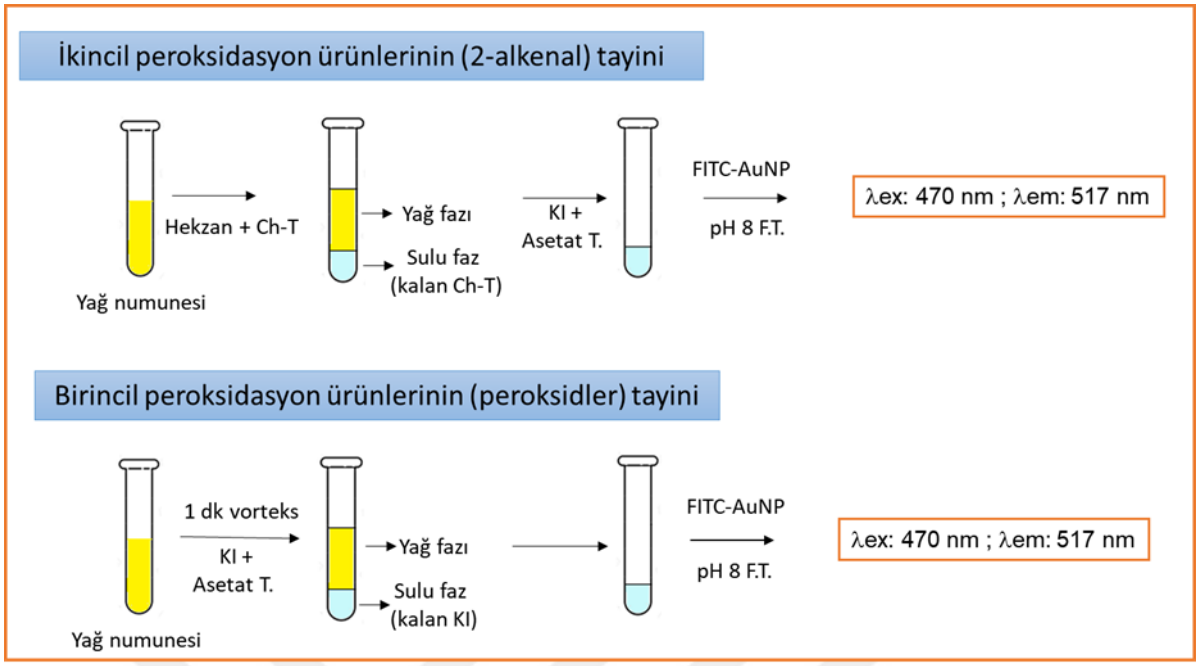
Ɛ: Nonenal'e ait molar floresans değeri (5547)

V: Alınan yağ hacmi (mL)

I_0: Referans çözeltisine ait floresans şiddeti

I: Örnek çözeltisine ait floresans şiddeti

MA: Molekül ağırlığı



Şekil 3.1: FITC-AuNP yönteminin şematik gösterimi.

3.4.1.3 AAPH Kaynaklı Linoleik Asit Peroksidasyonu ile Sentetik Olarak Hazırlanmış Yağ Ortamında Primer ve İkincil Oksidasyon Ürünlerinin Tayini

Tüp 1 (kontrol): 1,4 mL 1,36% (w/v) metanollü linoleik asit çözeltisi + 1,4 mL 0,2 M fosfat tamponu + 1,2 mL su (50°C 'de 3 saat boyunca karanlıkta bekletildi).

Tüp 2 (lipid peroksit oluşumu): 1,4 mL 1,36% (w/v) metanollü linoleik asit çözeltisi + 1,4 mL 0,2 M fosfat tamponu + 1 mL su + 0,2 mL 46,35 mM AAPH çözeltisi (50°C'de 3 saat boyunca karanlıkta bekletildi).

Tüp 3 (sentetik olarak hazırlanmış yağ): 1,4 mL 1,36% (w/v) metanollü linoleik asit çözeltisi + 1,4 mL 0,2 M fosfat tamponu + 0,5 mL su + 0,5 mL trans-2-nonenal + 0,2 mL 46,35 mM AAPH çözeltisi (50°C'de 3 saat boyunca karanlıkta bekletildi).

Tüp 4 (TBHP katkılı sentetik yağ): 1,4 mL 1,36% (w/v) metanollü linoleik asit çözeltisi + 1,4 mL 0,2 M fosfat tamponu + 0,5 mL 0,36 M TBHP çözeltisi + 0,5 mL trans-2-nonenal + 0,2 mL 46,35 mM AAPH çözeltisi (50°C'de 3 saat boyunca karanlıkta bekletildi).

Yukarıdaki reaksiyon karışımlarına florometrik nano-sensör uygulandı (N=3). Sentetik yağ ortamında primer oksidasyon ürünleri mM *tert*-butil hidroperoksit eşdeğeri cinsinden hesaplandı. İkincil oksidasyon ürünleri, mM trans-2-nonenal eşdeğeri cinsinden hesaplandı.

3.4.1.4 Gerçek Yağ Numunesine Nano-Sensörün Uygulanması ve Yöntemin Analitik Parametrelerinin Hesaplanması

Gerçek yemeklik yağ numunesi olarak ayçiçek yağı alındı. Yağ numunelerine standard katkı yöntemi ile bilinen miktarlarda primer ve sekonder oksidasyon ürün standardları eklendi ve geliştirilen nano-sensör ile analiz edildi. Önerilen nano-sensör için % geri kazanım (REC), tekrarlanabilirlik (RSD), dedeksiyon limitleri ve lineer çalışma aralıkları gibi analitik başarım parametreleri hesaplandı.

3.4.2 FOX Referans Yöntemi ile Primer Peroksidasyon Ürünlerinin Tayini

Peroksit sayısı yağlarda bulunan aktif oksijen miktarının ölçüsü olup, 1 kg yağdaki aktif oksijenin mikrogram olarak miktarıdır.

Primer peroksidasyon ürünlerinin tayini için; deney tüpü içerisine 1 mL gerçek yağ numunesi, 9 mL kloroform:metanol (7:3), 100 mL 10 mM ksilen oranj çözeltisi ilave edilip tüpler 5 saniye girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından 100 mL 20 mM Fe (II) çözeltisi ilave edildi. 560 nm de referansa karşı absorbans ölçümü yapıldı. Referans (Blank) çözeltisi içerisinde gerçek yağ numunesi ilave edilmeden hazırlandı.

3.4.3 *p*-Anisidin Referans Yöntemi ile İkincil Oksidasyon ürünlerinin Tayini

Yağ numunelerinin sekonder oksidayon ürünlerinin hesaplanması için Egan vd. [85] tarafından geliştirilen *p*-Anisidin yöntemi kullanılmıştır. 1 g gerçek yağ numunesi n-hekzan ile 25 mL'ye tamamlanır. Absorbans 350 nm'de refreransa karşı okunur, A_1 değeri olarak kaydedilir. 5 mL örnek çözeltisi ile 1 mL asetik asit içerisinde hazırlanmış %0.25'lik *p*-Anisidin çözeltisi karıştırılır. Referans çözeltisi içerisinde yağ numunesi olmadan 5 mL n-hekzan ile aynı şekilde hazırlanır. Referans ve numene çözeltisi oda sıcaklığında ve karanlıkta 10 dk. bekletilir. Absorbans tekrar referansa karşı 350 nm'de okunur, A_2 değeri olarak kaydedilir. *P*-Anisidin değeri (PAV) aşağıda belirtilen formül yardımı hesaplanır[86].

$$PAV=25(1.2\times A_2-A_1)/m \quad (3.2)$$

A_1 = Yağ numunesi hekzan karışımı çözeltisine ait absorbans

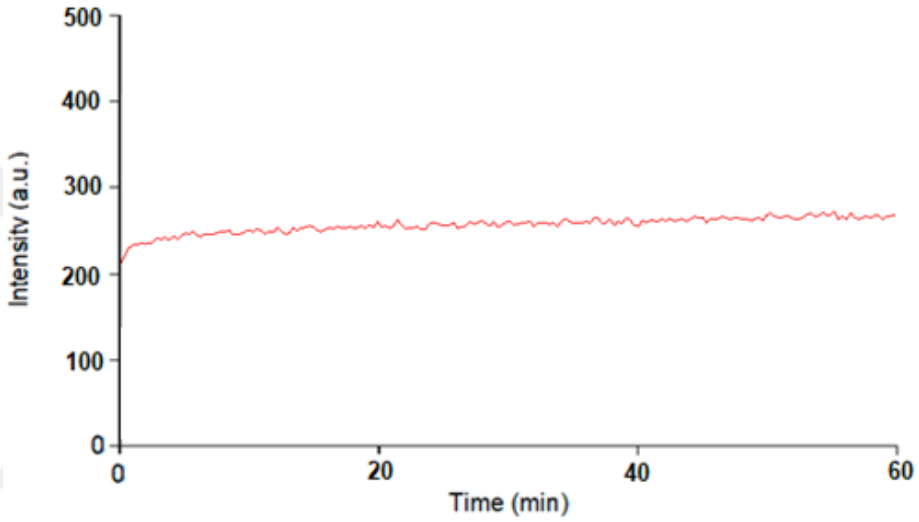
A_2 = *p*-Anisidin ilavesi yapılmış yağ numunesine ait absorbans

m = Alınan yağ numune miktarı (g)

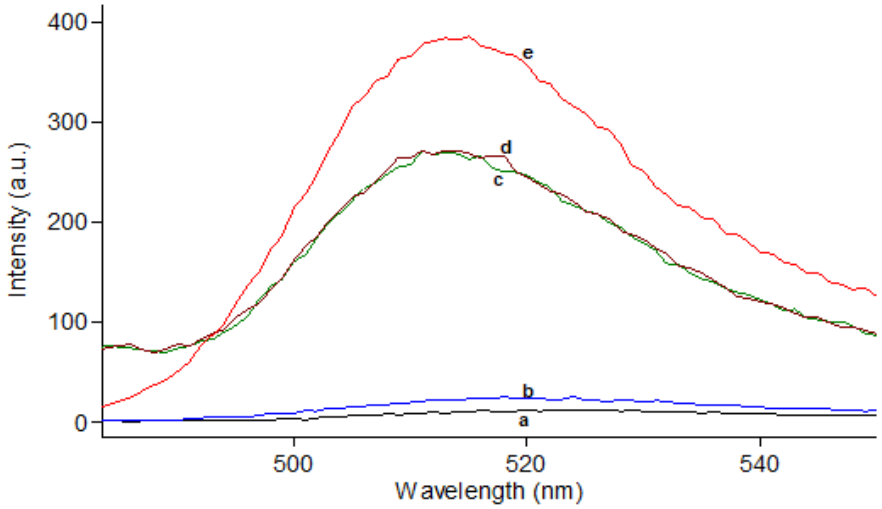
4 BULGULAR

4.1 FITC-AUNP ESASLI NANO-SENSÖR YÖNTEMI IÇIN OPTIMUM DENEY KOŞULLARININ BELIRLENMESI

Şekil 4.1, FITC-AuNP esaslı nano-Sensör yöntemi ile nonenal (73,8 mM) tayinine ait reaksiyon kinetiğini göstermektedir. Şekil 4.2, çalışılan farklı Kloramin-T konsantrasyonlarına ait görünür bölge spektrumlarını göstermektedir.



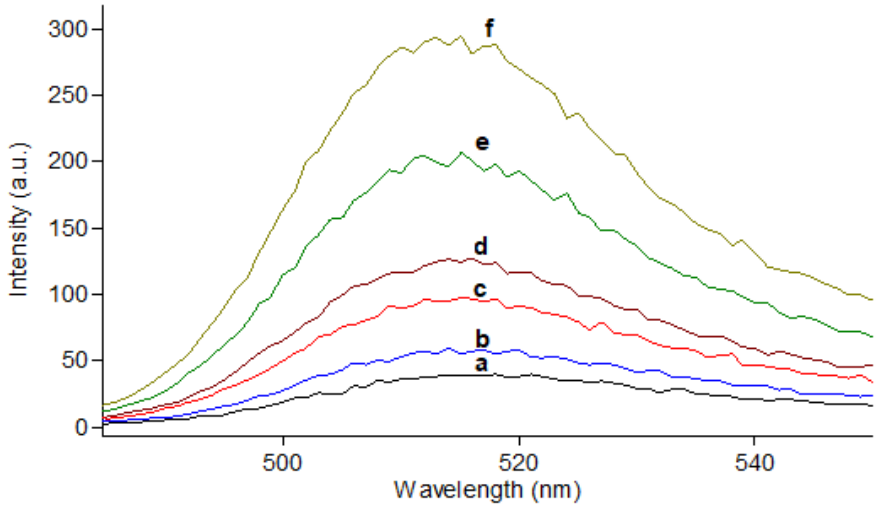
Şekil 4.1: FITC-AuNP esaslı nano-sensör yöntemi ile nonenal (73,8 mM) tayinine ait reaksiyon kinetiği.



Şekil 4.2: Çalışılan farklı Kloramin-T konsantrasyonlarına ait görünür bölge spektrumları; a) 8 mM; b) 6 mM c) 0,8 mM; d) 0,1 mM; e) 0,08 mM.

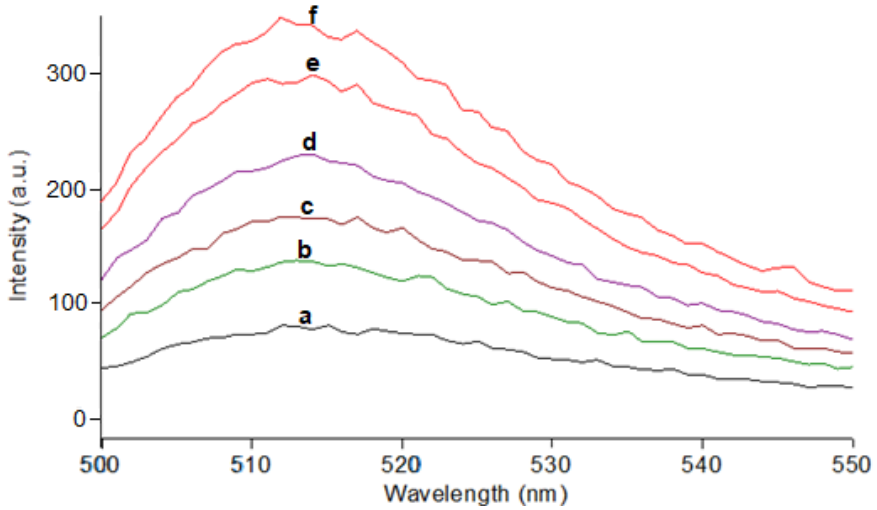
4.2 FITC-AUNPS ESASLI FLOROMETRİK NANO-SENSÖR YÖNTEMİYLE OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ

Proje kapsamında çalışılan oksidasyon ürünlerinden trans-2-nonenal için FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.3' de görülmektedir.



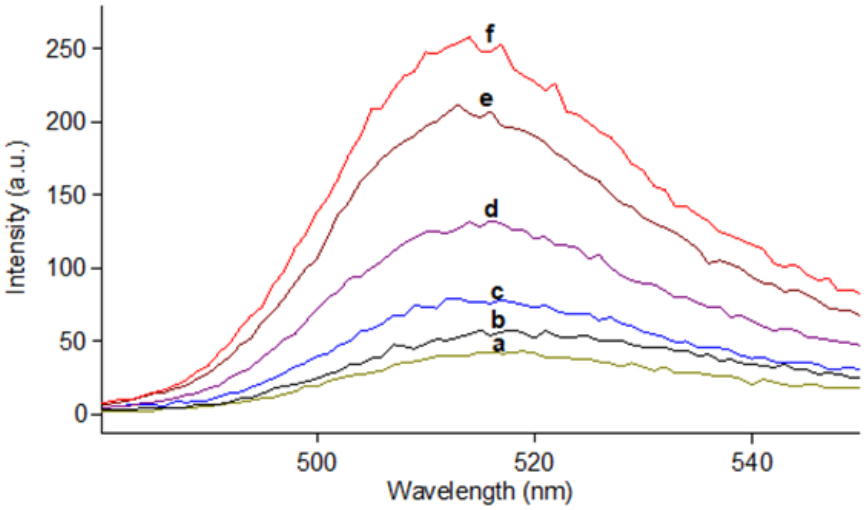
Şekil 4.3: Trans-2-nonenal'ın FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 14,7 mM; c) 29,5 mM; d) 44,3 mM; e) 60,0 mM; f) 73,8 mM.

Çalışılan oksidasyon ürünlerinden trans-2-heptenal için FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.4'de görülmektedir.



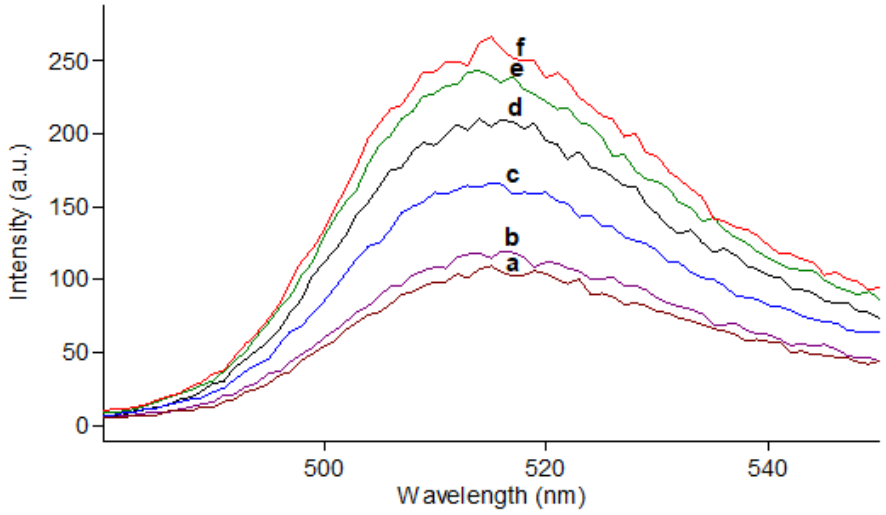
Şekil 4.4: Trans-2-heptenal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları; a) 0 mM; b) 1,87 mM; c) 5,61 mM; d) 9,35 mM; e) 14,00 mM; f)18,70 mM.

Çalışılan oksidasyon ürünlerinden trans-trans-2,4-dekadienal için FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5: Trans-trans-2,4-dekadienal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 6,41 mM; c) 12,90 mM; d) 19,20 mM; e) 25,70 mM; f) 32,10 mM.

Çalışılan oksidasyon ürünlerinden 2,4-heptadienal için FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları ve kalibrasyon grafikleri Şekil 4.6' da görülmektedir.



Şekil 4.6: 2,4-heptadienal'in FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumları a) 0 mM; b) 3,63 mM; c) 5,44 mM; d) 7,26 mM; e) 8,17 mM; f) 9,08 mM.

Oksidasyon ürünleri için FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğru denklemi, korelasyon katsayısı, lineer çalışma aralığı Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Oksidasyon ürünlerinin FITC-AuNPs esaslı nano-sensör yöntemi ile elde edilen lineer denklem ve korelasyon katsayıları, lineer aralıkları (ΔI: floresans şiddeti artışı; c: analit derişimi).

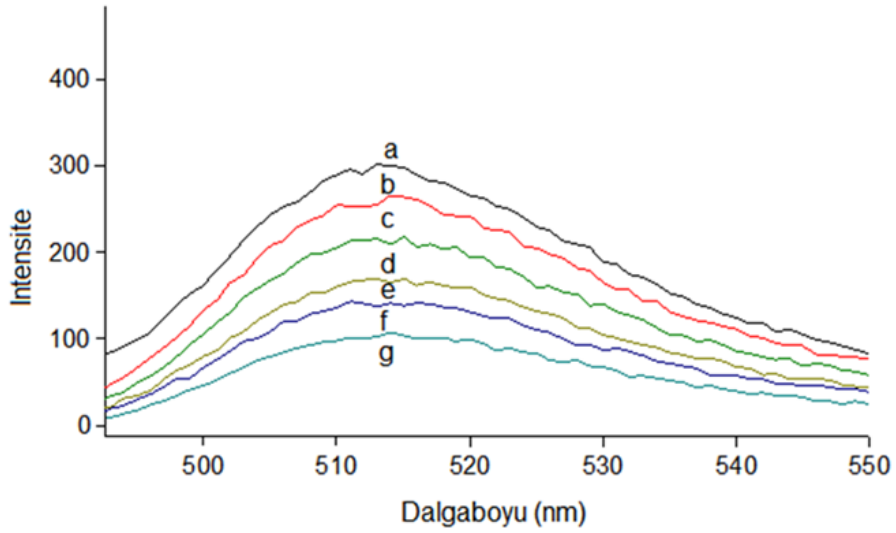
Oksidasyon Ürünleri	**Lineer denklem ve korelasyon katsayısı (r)**	**Lineer aralık (mM)**
Trans-2-nonenal	ΔI = 5547c – 14.58 r=0,9750	9 – 25
Trans-2-heptenal	ΔI = 9212c + 29 r = 0,9940	2.17 – 17.40
Trans-trans-2,4-decadienal	ΔI = 18000c – 1.0 r=0,9450	2.14 – 21.4
2,4-heptadienal	ΔI = 41280c – 29 r=0,9660	1.5 – 3.33

C= mg L^{-1} cinsinden analit derişimidir

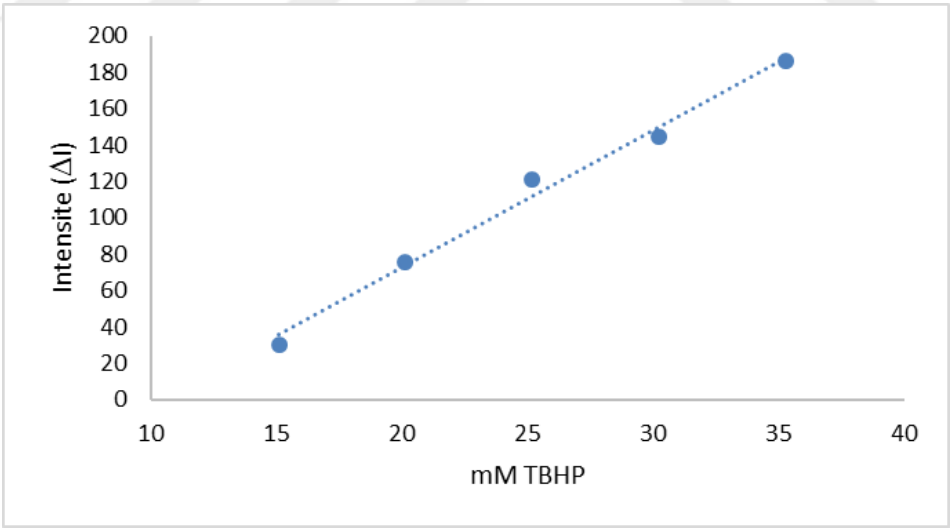
4.3 FITC-AUNP YÖNTEMİ İLE *TERT*-BUTİL HİDROPEROKSİT TAYİNİ

Hazırlanma koşulları materyal ve yöntem kısmında verilen TBHP standart çözeltisinin önerilen florometrik yöntem ile 480-550 nm aralığında emisyon spektrumu elde edildi (Şekil 4.7). Ölçülen floresans şiddeti (I_0) örneğin bulunduğu reaksiyon karışımının floresans şiddetinden

(I) çıkartılarak ΔI değerleri hesaplandı. FITC-AuNP yöntemine göre derişim ile ΔI arasında çizilen TBHP'nin kalibrasyon grafiğine (Şekil 4.8) ait doğru denklemi ΔI = 7545 c – 79 (Konsantrasyon (c), Molar olarak ifade edilmiştir.) olarak elde edildi.



Şekil 4.7: TBHP'nin FITC-AuNP yöntemine göre (a) TBHP yokluğunda ve (b→g) artan derişimlerdeki TBHP varlığında elde edilen emisyon spektrumu (470 nm eksitasyon; 517 nm emisyon).



Şekil 4.8: TBHP'nin FITC-AuNP yöntemine göre elde edilen kalibrasyon grafiği.

4.4 AAPH KAYNAKLI LINOLEIK ASIT PEROKSIDASYONU ILE SENTETIK OLARAK HAZIRLANMIŞ YAĞ ORTAMINDA PRIMER VE İKINCIL OKSIDASYON ÜRÜNLERININ TAYINI

Linoleik asit peroksidasyonu sonucu, sentetik yağ ortamında primer oksidasyon ürünleri *tert*-butil hidroperoksitin kalibrasyon denklemi kullanılarak TBHP eşdeğeri cinsinden 13,00±0,50 mM olarak hesaplandı. TBHP katkılı sentetik yağ numunesi için TBHP miktarı 11,00±0,55 mM, yüzde geri kazanım %110 olarak elde edildi.

İkincil oksidasyon ürünlerinin tespiti için, linoleik asit peroksidasyonu ortamına bilinen miktarda trans-2 nonenal katkısı yapıldı. Bu kapsamda, trans-2 nonenalin kalibrasyon denklemi kullanılarak alkenal içeriği 8,83±0,4 mM belirlendi. Yüzde geri kazanım %96 olarak hesaplandı.

Tablo 4.2: Sentetik yağ ortamında primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	Eklenen	Bulunan	%REC	%RSD
Sentetik yağ numunesi	-	13,00±0,50 mM*	-	-
TBHP katkılı sentetik yağ numunesi	10,00 mM	11,00±0,55 mM	110	5,0
Trans-2-nonenal katkılı sentetik yağ numunesi	9,20 mM	8,83±0,40 mM	96	4,5

*TBHP eşdeğeri

4.5 KATKI YAPILAN GERÇEK YAĞ NUMUNESINE NANO-SENSÖRÜN UYGULANMASI

Yemeklik ayçiçek yağı numunesine ve peroksidasyon ürünlerinin bilinen miktarlarının ilavesi yapıldıktan sonraki katkılı yağ numunesine FITC-AuNP yöntemi uygulanarak doğruluk, kesinlik parametreleri incelendi. % REC, % RSD değerleri hesaplandı (Tablo 4.3-4).

Tablo 4.3: Gerçek yağ numunesinde primer oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	Eklenen	Bulunan	%REC	%RSD
Ayçiçek yağı	-	0,28 ± 0,01 mmol/g*	-	3,6
Ayçiçek yağı (TBHP katkılı)	15,0 mM	14,0 ± 0,5 mM	93,4	3,5

*mmol/g TBHP eşdeğeri

Tablo 4.4: Gerçek yağ numunesinde sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	Eklenen	Bulunan	%REC	%RSD
Ayçiçek yağı	-	2,16±0,11* mmol/g	-	5,1
Ayçiçek yağı (trans-2-nonenal katkılı)	10,7 mM	10,1±0,4 mM	94,3	3,9
Ayçiçek yağı (trans-2-desenal katkılı)	29,7 mM	28,7±1,3 mM	95,6	4,5
Ayçiçek yağı (trans-2-heptenal katkılı)	12,1 mM	13,1±0,3 mM	109,0	2,3
Ayçiçek yağı (t-t-2,4-dekadienal katkılı)	2,3 mM	2,55±0,1 mM	109,4	3,9
Ayçiçek yağı (2,4-heptadienal katkılı)	1,6 mM	1,37±0,1 mM	83,5	7,3

*mmol/g trans-2-nonenal eşdeğeri

4.6 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FOX REFERANS YÖNTEMİ İLE PRİMER OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN (HİDROPEROKSİT) TAYİNİ

Farklı sürelerde okside edilmiş iki farklı ayçiçek yağında bulunan primer oksidasyon ürünlerinin FOX yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da özetlenmiştir.

Tablo 4.5: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FOX referans yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	Fe (III) /kg yağ
Ayçiçek yağı 1 (0. gün)	5,51
Ayçiçek yağı 1 (1. gün)	23,00
Ayçiçek yağı 1 (5. gün)	46,86
Ayçiçek yağı 1 (10. gün)	64,35

Tablo 4.6: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FOX referans yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	Fe (III) /kg yağ
Ayçiçek yağı 2 (0. gün)	10,00
Ayçiçek yağı 2 (1. gün)	35,89
Ayçiçek yağı 2 (5. gün)	58,80
Ayçiçek yağı 2 (10. gün)	35,50

4.7 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE ANİSİDİN REFERANS YÖNTEMİ İLE İKİNCİL PEROKSİDAYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ

Farklı sürelerde okside edilmiş ayçiçek yağında bulunan sekonder oksidasyon ürünlerinin *p*-Anisidin yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’ de özetlenmiştir.

Tablo 4.7: Ayçiçek yağı (1) numunesinde *p*-Anisidin yöntemi ile PAV değerinin hesaplanması.

Örnek	A_1	A_2	PAV
Ayçiçek yağı 1 (0. gün)	0,0129	0,1204	6,40
Ayçiçek yağı 1 (1. gün)	0,0840	0,8103	32,68
Ayçiçek yağı 1 (5. gün)	0,1040	2,0563	80,94
Ayçiçek yağı 1 (10. gün)	0,0857	1,7269	85,84

Tablo 4.8: Ayçiçek yağı (2) numunesinde *p*-Anisidin yöntemi ile PAV değerinin hesaplanması.

Örnek	A_1	A_2	PAV
Ayçiçek yağı 2 (0. gün)	0,0246	0,063	2,45
Ayçiçek yağı 2 (1. gün)	0,0549	0,7820	38,95
Ayçiçek yağı 2 (5. gün)	0,0514	1,3353	173,87
Ayçiçek yağı 2 (10. gün)	0,0609	1.0227	186,08

4.8 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FITC-AUNP İLE BİRİNCİL OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ

Farklı sürelerde okside edilmiş ayçiçek yağında bulunan primer oksidasyon ürünlerinin geliştirilen nano-sensör yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da özetlenmiştir.

Tablo 4.9: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	g TBHP/kg yağ
Ayçiçek yağı 1 (0.gün)	4,36
Ayçiçek yağı 1 (1.gün)	7,95
Ayçiçek yağı 1 (5.gün)	5,65
Ayçiçek yağı 1 (10.gün)	5,53

Tablo 4.10: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile primer oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	g TBHP/kg yağ
Ayçiçek yağı 2 (0.gün)	5,04
Ayçiçek yağı 2 (1.gün)	8,44
Ayçiçek yağı 2 (5.gün)	4,83
Ayçiçek yağı 2 (10.gün)	5,62

4.9 GERÇEK YAĞ NUMUNELERİNDE FITC-AUNP İLE İKİNCİL OKSİDASYON ÜRÜNLERİNİN TAYİNİ

Farklı sürelerde okside edilmiş ayçiçek yağında bulunan sekonder oksidasyon ürünlerinin FITC-AuNP yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo 4.11 ve Tablo 4.12’ de özetlenmiştir.

Tablo 4.11: Ayçiçek yağı (1) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini.

Örnek	g Nonenal/g yağ
Ayçiçek yağı 1 (0.gün)	2,26
Ayçiçek yağı 1 (1.gün)	4,57
Ayçiçek yağı 1 (5.gün)	22,40
Ayçiçek yağı 1 (10.gün)	32,21

Tablo 4.12: Ayçiçek yağı (2) numunesinde FITC-AuNP yöntemi ile sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini.

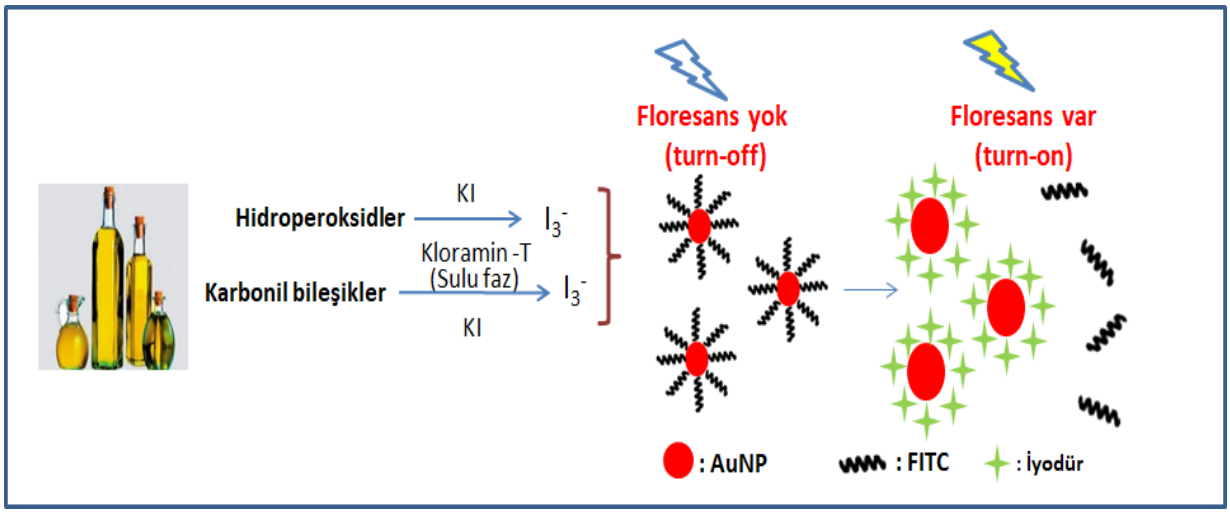
Örnek	g Nonenal/g yağ
Ayçiçek yağı 1 (0.gün)	1,69
Ayçiçek yağı 1 (1.gün)	9,14
Ayçiçek yağı 1 (5.gün)	23,83
Ayçiçek yağı 1 (10.gün)	52,03

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, yağ örneği içinde primer ve sekonder peroksidasyon ürünlerinin tayini FITC-AuNP florometrik nano-sensörü kullanılarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Yağ bozunmasında başvurulan analitik indislerden biri olan peroksit değeri testi doymamış yağ asitlerinden primer oksidasyon ürünlerinin nicel tayinine dayanmaktadır. Primer yağ oksidasyon ürünlerinin tayini için TBHP standart madde olarak kullanılmıştır.

$$ROOH + 2I^- + 2\,H^+ \rightarrow I_2 + ROH + H_2O \qquad (5.1)$$

Denklem 5.1'de görüldüğü gibi peroksitler asidik ortamda hızlıca iyodürü iyoda yükseltgemektedir [87]. FITC-AuNP sensörü ile primer peroksidasyon ürünleri olan lipid peroksitler, iyodürü yükseltgeme yeteneklerinden yararlanılarak tayin edilebilmektedir. Ortamda lipid peroksidasyonuna bağlı oluşan peroksitler yukarıdaki reaksiyonda görüldüğü gibi KI varlığında indirgenmekte, böylece başlangıçtaki KI derişiminde azalma gözlenmektedir. İyodürün Floresein-5-izotiyosiyonat-altın nanoparçacıkların (FITC-AuNP) (floresans sönümü: turn-off) yüzeyine adsorpsiyonu sonucu yüzeydeki (yer değiştirme tepkimesiyle) FITC molekülleri serbest hale geçmekte ve floresansta artış gözlenmektedir (turn-on) [4] (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Yağ oksidasyon derecesinin belirlenmesi için önerilen FITC-AuNP esaslı florometrik nano-sensör.

FITC-AuNP yönteminde, optimal inkübasyon süresi ve kloramin-T konsantrasyonu belirlenmesi için deneysel çalışmalar yapıldı. Uygun inkübasyon süresini belirlemek için 73.8 mM trans-2-nonenal bileşiği varlığında FITC-AuNP sensörünün floresans şiddeti 60 dakika

boyunca kinetik olarak ölçülmüştür (Şekil 4.1). Kinetik çalışma sonucunda FITC-AuNP yöntemi için sürenin ciddi bir etkisinin olmadığı ve floresans şiddeti ölçümünün hemen yapılabileceği kanaatine varılmıştır. Başlangıçta reaksiyon ortamına ilave edilmesi gereken kloramin-T konsantrasyonu, ikinci reaksiyon ortamında bulunan iyodürün tamamına yakını ile reaksiyona girecek şekilde belirlenmiştir. Optimal kloramin-T konsantrasyonu için alınan beş farklı konsantrasyona FITC-AuNP yöntemi uygulanmıştır (Şekil 4.2). 6 mM kloramin-T ile FITC-AuNP yönteminde minimal floresansın oluştuğu, yani ortama katılan iyodürün tamamına yakınının tüketildiği belirlenmiştir; bu nedenle deneysel çalışmalara kloramin-T'nin 6 mM son konsantrasyondaki çözeltisi ile devam edilmiştir. Sonuç olarak, karbonil bileşikleri varlığında eklenen kloramin-T'nin bir kısmı tüketilecek ve kloramin-T'deki azalmaya paralel olarak ortamda kalan iyodür, FITC-AuNP sensörünün floresansında artışa neden olacaktır.

FITC-AuNPs esaslı florometrik nano-sensör yöntemiyle yağ oksidasyon ürünlerinden trans-2 nonenal, trans-2-heptenal, trans-trans-2,4-dekadienal ve trans-trans-2,4-heptadienal'den kaynaklanan görünür alan floresans spektrumları (Şekil 4.3-4.6) ve kalibrasyon doğruları elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve lineer çalışma aralıkları Tablo 4.1'de verilmiştir.

Artan peroksit miktarına bağlı olarak başlangıçtaki iyodür miktarının azalmasıyla orantılı biçimde FITC-AuNP sensörünün floresans şiddetinde azalma görülmektedir (Şekil 4.7). TBHP'nin FITC-AuNP yöntemine göre elde edilen kalibrasyon grafiği çizilerek $y = 7545c - 79$ denklemi elde edildi (Şekil 4.8). TBHP için gözlenebilme sınırı 4,71 mM, lineer çalışma aralığı 15-35 mM olarak belirlendi.

AAPH kaynaklı linoleik asit peroksidasyonu ile sentetik olarak hazırlanmış yağ ortamında primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. AAPH'ın termal bozunması sonucunda oluşan radikalik türler, linoleik asid emülsiyonunun oksidasyonuna ve böylece peroksitlerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bu kapsamda, linoleik asit içermeyen kontrol çözeltisi (Tüp 1) ve linoleik asit emülsiyonu (Tüp 2) hazırlanıp 50°C'de 3 saat AAPH ile peroksidasyon işlemine maruz bırakılmış ve reaksiyon ürünü peroksitler florometrik sensör ile tayin edilmiştir. AAPH içeren linoleik asit emülsiyon ortamına sekonder peroksidasyon ürünü olan trans-2 nonenal standart çözeltisi ilave edilerek sentetik (yükseltgenmiş) yağ ortamı oluşturuldu (Tüp 3). Bunun yanı sıra, yöntemin doğruluk ve kesinliğini ölçmek için sentetik yağ ortamına TBHP standart katkısı yapıldı (Tüp 4). Sentetik yağ ortamında primer oksidasyon

ürünleri *tert*-butil hidroperoksit eşdeğeri cinsinden 13,00±0,50 mM olarak hesaplandı. TBHP ve *t*-2-nonenal katkılı sentetik yağ numunelerinde yüzde geri kazanım sırasıyla %110 ve %96 olarak elde edildi (Tablo 4.2). Bu sonuçlar, yöntemin primer ve sekonder peroksidasyon ürünleri için başarıyla uygulanabildiğini göstermektedir. Önerdiğimiz FITC-AuNP floresans yöntemi hem primer hem de sekonder lipid peroksidasyon ürünlerine uygulanabilmekte ve kloramin-T yokluğunda primer, kloramin-T varlığında ise sekonder oksidasyon ürünleri dedekte edilmekte, böylece önerilen florometrik yöntemle lipid peroksidasyon sürecinin primer ve sekonder oksidasyon ürünleri ayrı ayrı tayin edilebilmektedir.

Gerçek yağ örneklerinde yöntemin uygulanabilirliğini test etmek amacıyla primer ve sekonder oksidasyon ürünleri Şekil 3.1'de verildiği gibi 2 aşamalı olarak belirlendi. Ayçiçek yağının yanı sıra TBHP veya 2-alkenal katkılı yağ numunelerine FITC-AuNP yöntemi uygulanarak doğruluk, kesinlik parametreleri incelendi. % REC, % RSD değerleri hesaplandı (Tablo 4.2). Primer ürünler TBHP eşdeğeri cinsinden 0,28±0,01 mmol/g olarak hesaplandı. Standart TBHP çözeltisi katkılı ayçiçeği yağında % REC 93,4, %RSD 3,6 olarak bulundu (Tablo 4.3). İkincil oksidasyon ürünleri t-2-nonenal eşdeğeri cinsinden 2,16±0,11 mmol/g olarak hesaplandı. Ayçiçek yağına 2-alkenal bileşiklerinin standart çözeltilerinin katkısı sonucunda % REC değerleri 83,5 ile 109,4, %RSD değerleri 2,3 ile 7,3 aralığında bulundu (Tablo 4.4).

Sonuç olarak, primer ve sekonder yağ peroksidasyon ürünlerinin tayini için geliştirilen FITC-AuNP florometrik nanosensörün başarılı bir şekilde sentetik yağ ve gerçek yağ örneklerine uygulanabildiği görülmüştür.

Bu tez kapsamında Ayçiçek yağlarına 160 °C ısıl işlem uygulanarak yağlar bozundurulmuştur. Ayçiçek yağlarındaki primer ve sekonder ürünler hem geliştirilen altın nanoparçacık esaslı yöntem hem de referans yöntemler (FOX Yöntemi ve Anisidin Yöntemi) kullanılarak başlangıç (ısıl işlem uygulanmayan), 1. gün, 5. gün ve 10. gün aşamalarında ölçülmüştür. Ayçiçek yağlarında ısıl işlem sonucunda primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin başlangıç değerlerinden daha yüksek olduğu ve uygulanan ısıl işlem süresinin artmasıyla oksidasyon ürün miktarının arttığı görülmüştür. Yağların primer ve sekonder oksidasyon ürünlerinin tayini için tez kapsamında geliştirilen altın nanoparçacık esaslı yöntem sonuçları ile referans yöntemler ile elde edilen sonuçlar son derece uyumlu bulunmuştur.

6 KAYNAKLAR

[1] E. N. Frankel, Recent advances in lipid oxidation, Journal of the Science of Food and Agriculture, cilt 54, no. 4, pp. 495-511, 1991.

[2] S. Paul ve G. S. Mittal, Regulating the Use of Degraded Oil/Fat in DeepFat/ Oil Food Frying, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, cilt 37, pp. 635-662, 1997.

[3] B. Saad, W. T. Wai, B. P. Lim ve M. I. Saleh, Flow injection determination of anisidine value in palm oil samples using a triiodide potentiometric detector, Analytical Chimica Acta, cilt 591, pp. 284-254, 2007.

[4] Y. M. Chen, T. L. Cheng ve W. L. Tseng, Fluorescence turn-on detection of iodide, iodate and total iodine using fluorescein-5-isothiocyanate-modified gold nanoparticles, Analyst, cilt 134, pp. 2106-2112, 2009.

[5] H. Baydar, Bitkilerde yağ sentezi, kalitesi ve kaliteyi artırmada ıslahın önemi, Ekin Dergisi, no. 11, pp. 50-57, 2000.

[6] S. Nas, H. Y. Gökalp ve M. Ünsal, %1 içinde Bitkisel Yağ Teknolojisi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayınları, 2001, pp. 10-180.

[7] H. M. Evans ve G. O. Burr, A New Dietary Deficiency With Highly Purified Diets. III. The Beneficial Effect of Fat in the Diet, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, cilt 25, no. 5, pp. 390-397, 1928.

[8] P. A. Mayes, Biyoenerji vericiler ve karbonhidrat ile lipid metabolizması, %1 içinde Harper'ın Biyokimyası, İstanbul, Barış Kitapevi, 1996, pp. 116-306.

[9] M. Nizamlıoğlu, Lipidler, %1 içinde Biyokimya, Konya, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 1998, pp. 216-264.

[10] P. Y. Bruice, Bruice, P.Y., (2004). Organik Chemistry ., Upper Saddle River, NJ: Pearson / Prentice Hall, 2004.

[11] R. K. Murray, D. K. Granner, R. A. Mayes ve V. W. Rodwell, Fizyolojik öneme sahip lipidler, %1 içinde T. Harper'ın Biyokimyası, İstanbul, Barış Kitabevi, 1996.

[12] R. W. Riemenschneider, Oxidative Rancidity and Antioxidants, %1 içinde Handbook of Food and Agricultire, London, Chapman Hail Ltd, 1955.

[13] B. Özdalyan, Doğal Antioksidant Vitaminler, Gıda Sanayii, cilt 5, no. 3, p. 27, 1991.

[14] J. D. Dziezak, Preservatives: Antioxidants. The Ultimate Answer to Oxidation, Food Technology, cilt 40, no. 9, pp. 94-102, 1986.

[15] E. N. Frankel, Recent advances in lipid oxidation, Journal of the Science of Food and Agriculture, cilt 54, no. 4, pp. 495-511, 1991.

[16] S. Çakmakçı ve H. Y. Gökalp, Gıdalarda Kısaca Oksidasyon; Antioksidantlar ve Gıda Sanayiinde Kullanımları, Atatürk Ü.Zir.Fak.Der., cilt 23, no. 2, pp. 174-192, 1992.

[17] İ. Saldamlı, Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyenler, Ankara: Hacettepe Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Böl., 1985.

[18] A. Dinçer, Gıdalarda Kullanılan Antioksidantlar ve Fonksiyonları, Gıda Sanayii, cilt 1, pp. 40-42, 1987.

[19] A. Khayat ve D. Schwall, Lipid Oxidation in Seafood, Food Technology, pp. 130-140, 1983.

[20] A. K. Göğüş ve N. Kolsarıcı, %1 içinde Su Ürünleri İşleme Teknolojisi, Ankara, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1992, p. 260.

[21] N. P. Das ve T. A. Pereira, Effects of Flavonoids on Thermal Autoxidation of Palm Oil: Structure-ActiviN Relationships, Laboratory of Flavonoid Research, Journal of the American Oil Chemists' Society, cilt 67, no. 4, pp. 255-258, 1990.

[22] J. A. Benedet ve T. Shibamoto, Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II), and Cd(II) in lipid peroxidation, Food Chemistry, cilt 107, pp. 165-168, 2008.

[23] T. F. Slater, Free Ra d i cal Mechanisms in Tissue Injury, Biochem J., cilt 222, pp. 1-15, 1984.

[24] B. Halliwell , Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease, The American Journal of Medicine, cilt 91, pp. 14-22, 1991.

[25] T. F. Slater, Free Radical Mechanisms in Tissue Injury, Biochem. J., cilt 222, pp. 1-15, 1984.

[26] B. Halliwell ve J. M. Gutteridge , Role of Free Radicals and Role of Free Radicals and Oveview, Method Enzymol, cilt 186, pp. 1-85, 1990.

[27] B. Halliwell ve J. M. Gutteridge , The Importance of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Diseases, Molecular Aspects of Medicine, cilt 8, pp. 89-193, 1985.

[28] G. S. Devi , M. H. Pra, I. Saraswathi, D. Raghu , D. N. Rao ve P. P. Reddy , Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias, Clin. Chim. Acta., cilt 293, no. 1-2, pp. 53-62, 2000.

[29] J. D. McCord, The evolution of free radicals and oxidative stress, Am. J. Med, cilt 108, no. 8, pp. 652-659, 2000.

[30] L. A. Pham-Huy , H. He ve C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, Int. J. Biomed. Sci, cilt 4, no. 2, pp. 89-96, 2008.

[31] N. Bashan, J. Kovsan ve I. Kachko, Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species, Physiological Reviews, cilt 89, pp. 27-71, 2009.

[32] D. Harman, Free radical theory of aging: an update, Annals of the New York Academy of Sciences, cilt 1067, pp. 10-21, 2006.

[33] M. Deanna, I. Minich, I. Benjamin ve T. Ramsarma, Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview), Indian J. Biochem. Biophys., cilt 40, no. 5, pp. 300-308, 2003.

[34] B. A. Freeman ve J. D. Crapo, Biology of Disease. Free Radicals and Tissue Injury, Lab. Invest., cilt 47, pp. 412-426, 1982.

[35] M. Ünsal , H. Y. Gökalp ve S. Nas, Yemeklik Yağlarda Oksidasyon; Önemi ve Mekanizması, Standart ve Ekonomik Dergi, cilt 31, no. 367, pp. 50-54, 1992.

[36] O. I. Aruoma, B. Halliwell , M. J. Laughton, G. J. Quinlan ve J. M. Gutteridge, The Mechanism of Initiation of Lipid Peroxidation. Evidence Against a Requirement for an Iron {II)- Iron (III) Complex, Biochem Journal, cilt 258, pp. 617-620, 1989.

[37] P. D. Thomas ve M. J. Poznansky , A Modified Tetramethylbenzidine Method for Measuring Lipid Hydroperoxides, Analytical Biochem., cilt 188, pp. 228-232, 1990.

[38] N. A. Porter, Chemistıy of Lipid Peroxidation, Method Enzymol Journal, cilt 105, pp. 273-282, 1984.

[39] B. Halliwell , Oxidants and Human Disease: Some New Concept, FASEB J., cilt 1, pp. 358-364, 1987.

[40] G. R. Buettner ve B. A. Jurkiewicz, Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid, Radiation Research, cilt 145, pp. 532-541, 1996.

[41] E. Karabudak, Etlerdeki Lipid Peroksidasyonunun Bir Ürünü Olarak Malonaldehid Ve Ölçüm Yöntemler, Beslenme ve Diyet, cilt 31, no. 1, pp. 43-48, 2002.

[42] R. Guillen-Sans ve M. Guzman-Chozas , The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A review, CRV Food Scien and Nutr., cilt 38, pp. 315-330, 1998.

[43] B. Halliwell ve J. M. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine., Oxford: Ciarendon Press, 1989.

[44] M. K. Hutchins ve D. Swern, Generation of cyanonitrene: study of the reaction of sodium hydrogen cyanamide, tert-butyl hypochlorite and tertiary amines, The Journal of Organic Chemistry, cilt 47, no. 25, pp. 4847-4850, 1982.

[45] S. Eustis ve M. A. El-Sayed, 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, Chemical Society Reviews, pp. 35, 209-217, 2006.

[46] T. Joseph ve M. Morrison, Nanotechnology in agriculture and food. Nanoforum report, Institute of Nanotechnology, 2006. [Çevrimiçi]. Available: www.nanoforum.org.

[47] V. V. Pokropivny ve V. V. Skorokhod, Biomimetic Materials, Sensors and Systems, Materials Science and Engineering. C, cilt 27, no. 5-8, pp. 990-993, 2007.

[48] H. Haick, Nanotechnology and Nanosensorsi,Introduction to Nanotechnology, Technion Israel Institue of Technology, Israel.

[49] J. N. Tiwari, R. N. Tiwari ve K. S. Kim, Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and electrochemical energy devices, Progress in Materials Science three-dimensional nanostructured materials for advanced, cilt 57, no. 4, pp. 724-803, 2012.

[50] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy ve M. El-Sayed, The golden age: gold nanoparticles for biomedicine, Chemical Society Reviews, cilt 41, no. 7, pp. 2740-2779, 2012.

[51] M. Farre, . K. Gajda-Schrantz, L. Kantiani ve D. Barceló, Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment, Analytical and Bioanalytical Chemistry, cilt 393, no. 1, pp. 81-95, 2009.

[52] Y. Xia ve N. Halas, Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures, MRS Bulletin, cilt 30, pp. 338-347, 2005.

[53] E. Katz ve I. Willner, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications, Angew Chem Int Ed Engl, cilt 43, no. 45, pp. 6042-108, 2004.

[54] S. Eustis ve M. A. El-Sayed, 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., cilt 35, pp. 209-217, 2006.

[55] L. K. Kelly, E. Coronado, L. Zhao ve G. C. Schatz, The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment, Journal of Phsical Chemistry B., cilt 107, pp. 668-677, 2003.

[56] M. P. Pileni, Optical properties of nanosized particles dispersed in colloidal solutions or arranged in 2D or 3D superlattices, New Journal of Chemistry, pp. 693-702, 1998.

[57] S. Lal, S. Link ve N. J. Halas, Nano-optics from sensing to waveguiding, Nature Photonics, cilt 1, no. 1, pp. 641-648, 2007.

[58] E. Hutter ve J. H. Fendler, Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance, Advanced Materials, cilt 16, no. 19, pp. 1685-1706, 2004.

[59] M. Rycenga, C. M. Cobley, J. Zeng, W. Li, C. H. Moran ve Q. Zhang, Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications, Chem. Rev., cilt 111, pp. 3669-712, 2011.

[60] Q. Ruan, L. Shao, Y. Shu, J. Wang ve H. Wu, Growth of monodisperse gold nanospheres with diameters from 20 nm to 220 nm and their core/satellite nanostructures, Advanced Optical Materials, cilt 2, pp. 65-73, 2014.

[61] M. El-Sayed ve S. Link, Shape and size dependence of radiative, nonradiative and photothermal properties of gold nanocrystals, International Reviews in Physical Chemistry, cilt 19, no. 3, pp. 409-453, 2000.

[62] J. Rodríguez-Fernández , J. Pérez-Juste, F. J. García de Abajo ve A. M. Liz-Marzán, Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes, Langmuir, cilt 22, no. 16, pp. 7007-10, 2006.

[63] J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzan ve P. Mulvaney, Gold nanorods: synthesis, characterization and applications, Coord. Chem. Rev., cilt 249, pp. 1870-1901, 2005.

[64] T. Kim, C. H. Lee, S. W. Joo ve K. Lee, Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling, Journal of Colloid and Interface Science, cilt 318, pp. 238-243, 2008.

[65] NSTC, The National Nanotechnology Initiative-Strategic Plan, Executive Office of the President of the United States, US, 2007.

[66] Y. K. M. Menceloğlu, Uluslararası Rekabet Stratejileri: Nanoteknoloji ve Türkiye", Tüsiad Rekabet Stratejileri Dizisi, Sabancı Üniversitesi, İstanbul, 2008.

[67] J. Turkevich, P. C. Stevenson ve J. Hillier , A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, Discussions of thr Faraday Societyy, cilt 11, pp. 55-74, 1951.

[68] G. Frens, ontrolled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, Nature Physical Science, cilt 241, pp. 20-22, 1973.

[69] L. Feldheim ve C. A. Foss, Metal nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications, Journal of the American Chemical Society, cilt 124, no. 26, 2002.

[70] A.-R. Shahverdi,, M. Shakibaie, ve P. Nazari, Basic and practical procedures for microbial synthesis of nanoparticle, %1 içinde Metal Nanoparticles in Microbiology, Berlin, Springer, 2011, pp. 177-195.

[71] M. Tejamaya, I. Roemer, R. C. Merrifield ve J. R. Lead, Stability Of Citrate, PVP, And PEG Coated Silver Nanoparticles In Ecotoxicology Media, Environ. Sci. Technol., cilt 46, pp. 7011-7017, 2012.

[72] D. A. Healy, C. J. Healy,, P. Leonard, L. McKenna ve R. O. Kennedy, Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection, Trends Biotechnol., cilt 25, p. 125, 2007.

[73] G. A. Besselink, R. P. Kooyman, P. J. Os, G. H. Engbers ve R. B. Schasfoort, Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen, Anal. Biochem., cilt 333, p. 165, 2004.

[74] A. Chen, W. Wu ve J. Jones, Polymers and Molecular Wires as Chemical Sensors, %1 içinde Comprehensive Supramolecular Chemistry II, Oxford, Pergamon, 2017, pp. 179-195.

[75] P. Gründler, Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers, NY: Springer, 2007.

[76] B. R. Eggins, Chemical Sensors and Biosensors, cilt 2, NY: John Wiley & Sons., 2008, pp. 26-39.

[77] W. R. Cattrall, Chemical Sensors, Oxford, Oxford Universıty Press, 1997, p. 71.

[78] P. C. Jeromina, A. N. Araujo ve M. C. B. Montenegro, Optical sensors and biosensors based on sol–gel films, Talanta, cilt 72, no. 1, pp. 13-27, 2007.

[79] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer Science & business media, 2013.

[80] S. Liang, D. T. Pierce, C. Amiot ve X. Zhao, Photoactive Nanomaterials for Sensing Trace Analytes in Biological Samples, Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, cilt 35, no. 9, pp. 661-668, 2007.

[81] D. Rowley, J. Gutteridge, D. Blake , M. Farr ve B. Halliwell , Lipid Peroxidation in Rheumatoid Arthritis: Thiobarbituric Acid-Reactive Material and Catalytic Iron Salts in Synovial Fluid Fron1 Rheumatoid Patients, Clin. Sci., no. 66, pp. 691-695, 1984.

[82] T. Yu ve R. Sinnhuber, 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products, Food Tech., no. 8, p. 104, 1957.

[83] Q. Sun, C. Faustman, A. Senecal, A. Wilkinson ve H. Furr, Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage, Meat Science, cilt 57, pp. 55-60, 2001.

[84] E. N. Frankel, %1 içinde Lipid oxidation, Bridgewater, Oily Press. XVI, 2005, p. 470.

[85] H. Egan, R. S. Kirk ve R. Sawyer, %1 içinde Pearson's chemical analysis of foods (8th ed.), Leith Walk, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1981, pp. 537-538.

[86] N. Erkan, G. Ayranci ve E. Ayranci, Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil,carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol, Food Chemistry, cilt 110, pp. 76-82, 2008.

[87] W. C. Bray ve H. A. Liebhafsky, Reactıons Involvıng Hydrogen Peroxıde, Iodıne And Iodate Ion. I. Introductıon, Journal of the American Chemical Society, cilt 53, no. 1, pp. 38-44, 1931.

[89] C. M. Seppanen ve A. S. Csallany, Simultaneous Determination of Lipophilic Aldehydes by High-Performance Liquid Chromatography in Vegetable Oil, Journal of the American Oil Chmeists Society, cilt 78, p. 1258, 2001.

7 EKLER