



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**ANTIÖKSİDANLARA DUYARLI SOY METAL
NANOPARÇACIK ESASLI YENİ SENSÖRLER
GELİŞTİRİLMESİ**

Nilay GÜNGÖR
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

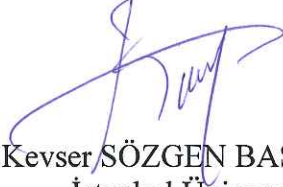
Danışman
Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

Ocak, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 16/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



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



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 26308 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Reşat Apak’a doktora ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin ve içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu anlayış ve hoşgöründen dolayı danışman hocam Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN’a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme jürisinde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK’e tez çalışmalarına verdiği katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Burcu BEKDEŞER’e, Araş. Gör. Dr. Mustafa BENER’e, Yük. Kimyager Sefa BAKİ’ye, Yük. Kimyager Gülşah KIBRISLIOĞLU’na, Araş. Gör. Esin AKYÜZ’e, Yük. Kimyager Ayşe Nur TUFAN’a ve sevgili hocam Araş. Gör. Dr. Saliha Esin ÇELİK’e sonsuz teşekkürler ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, canım dostlarıma ve müstakbel eşim Süleyman BEĞİÇ’e yürekten teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan 26308 numaralı doktora tez projesine maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

Ocak, 2014

Nilay GÜNGÖR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	6
2.1. ANTİOKSİDANLAR.....	6
2.2.1. E vitamini	8
2.2.2. Askorbik Asit (C vitamini).....	8
2.2.3. Antioksidan Enzimler	9
2.2.3.1. Süperoksit Dismutaz	9
2.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz	10
2.2.3.3. Katalaz.....	10
2.2.4. Karotenoidler	10
2.2.5. Polifenoller	11
2.2.5.1. Flavonoidler	11
2.2.5.2. Fenolik Asitler	14
2.2.5.3. Fenolik polimerler (Tanenler)	15
2.2.6. Tiyol Grubu Antioksidanlar.....	16
2.2.6.1. Glutasyon	18
2.2.6.2. N-Asetil Sistein	20
2.2.6.3. Dihidrolipoik asit.....	21

2.2.6.4. Sistein.....	22
2.2.6.5. Homosistein.....	22
2.2.6.6. Sisteamin	23
2.2.6.7. 1,4-Ditiyoeritritol.....	23
2.2.6.8. Glutasyon Etil Ester.....	24
2.2.6.9. Metiyonin.....	24
2.2.7. Selenyum.....	24
2.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNE	
ETKİ EDEN FAKTÖRLER	25
2.3. NANOTEKNOLOJİ	27
2.3.1. Nanoyapılar	29
2.3.2. Soy Metal Nanoparçacıklar.....	30
2.3.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)	31
2.3.3.1. Yüzey Plazmon Bandı.....	34
2.3.3.2. Yüzey Plazmon Absorpsiyonuyla Tayin	34
2.3.4. Gümüş ve Altın Nanoparçacıklar.....	34
2.3.4.1. Gümüş ve Altın Nanoparçacıkların Optik Özellikleri.....	34
2.3.4.2. Sentezi	39
2.3.4.3. Karakterizasyonu	41
2.4. SENSÖRLER.....	42
2.4.1. Kimyasal Sensörler	42
2.4.1.1. Optik Sensörler	43
2.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE VE TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ	45
2.5.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi	45
2.5.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi.....	47
2.5.3. FRAP (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi	47
2.5.4. DPPH Yöntemi	48
2.5.5. Folin Ciocalteu Yöntemi.....	48
2.5.6. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	49
2.5.7. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi.....	49
2.5.8. Luminol Yöntemi.....	50
2.5.9. Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocine Bleaching Assay) Yöntemi	50
2.5.10. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi.....	51

2.5.11. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler.....	51
2.5.12. Ellman Yöntemi	52
2.5.13. Geliştirilen SNPAC (Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	53
2.5.14. Geliştirilen DTNB-Au-NP Yöntemi	54
2.6. LİTERATÜRDE VAROLAN SOY METAL NANOPARÇACIKLAR İLE İLGİLİ ANTİOKSİDAN ÇALIŞMALARI	56
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	59
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	59
3.2. KİMYASAL MADDELER	59
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	60
3.3.1. Gümüş Nanoparçacık Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.3.2. Altın Nanoparçacık Esaslı TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	61
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	63
3.4.1. Gümüş Nanoparçacık Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	63
3.4.1.1. <i>SNP (Gümüş Nanoparçacık) Hazırlanması</i>	63
3.4.1.2. <i>Geliştirilen SNPAC Yöntemi</i>	63
3.4.1.3. <i>CUPRAC Yöntemi</i>	63
3.4.1.4. <i>Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TAC Ölçümü</i>	64
3.4.1.5. <i>Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi</i>	64
3.4.2. Altın Nanoparçacık Esaslı TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Yöntemler	64
3.4.2.1. <i>Au-NP (Altın Nanoparçacık) Hazırlanması</i>	64
3.4.2.2. <i>DTNB-Au-NP (DTNB Bağlı Altın Nanoparçacık) Hazırlanması</i>	65
3.4.2.3. <i>Geliştirilen DTNB-Au-NP Esaslı TiyoL Tayin Yöntemi</i>	65
3.4.2.4. <i>Klasik DTNB Yöntemi</i>	65
3.4.2.5. <i>HPLC Yöntemi</i>	66
3.4.2.6. <i>Sentetik TiyoL Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TTC Ölçümü</i>	66
3.4.2.7. <i>Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi</i>	66

4. BULGULAR	67
4.1. ANTİOKSİDANLARA DUYARLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE (SNPAC) YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ.....	67
4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	67
4.1.1.1. <i>Gümüş Nanoparçacık Sentezinde AgNO₃ ve Trisodyum Sitrat</i> <i>Konsantrasyonunun Etkisi</i>	67
4.1.1.2. <i>SNPAC Yönteminde İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi</i>	69
4.1.2. Sentezlenen Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	71
4.1.2.1. <i>Spektrofotometrik Karakterizasyonu.....</i>	71
4.1.2.2. <i>SEM Analizi ile Karakterizasyonu</i>	73
4.1.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi.....	73
4.1.4. Antioksidan Bileşiklerin SNPAC Yöntemi ile Molar Absorblama Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi.....	75
4.1.5. Antioksidan Bileşiklerin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi ve CUPRAC Yöntemiyle Karşılaştırılması	77
4.1.6. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin SNPAC Yöntemine Göre TAC Ölçümü.....	79
4.1.7. Yöntemin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımının Belirlenmesi	80
4.1.8. SNPAC Yönteminin Bazı Meyve Sularına Uygulanması.....	80
4.1.9. SNPAC Yöntemi ile Bazı Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	81
4.1.10. Enterferans Çalışmaları.....	82
4.2. TİYOL GRUBU ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE DUYARLI DTNB-AU-NP ESASLI YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ.....	84
4.2.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi	84
4.2.1.1. <i>Altın Nanoparçacık Sentezinde HAuCl₄ ve Trisodyum Sitrat</i> <i>Konsantrasyonunun Etkisi</i>	84
4.2.1.2. <i>DTNB-Au-NP Hazırlanmasında Reaksiyon Süresi ve İlave Edilen</i> <i>DTNB Konsantrasyonunun Belirlenmesi</i>	88
4.2.1.3. <i>DTNB-Au-NP Esaslı Yöntemde İnkübasyon Süresi ve pH'ın</i> <i>Belirlenmesi.....</i>	89
4.2.2. Sentezlenen Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	91

4.2.2.1. Spektrofotometrik Karakterizasyonu.....	91
4.2.2.2. SEM Analizi ile Karakterizasyonu.....	92
4.2.3. TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi	93
4.2.4. TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin DTNB-Au-NP Esaslı Yöntem ile Molar Absorblama Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi.....	95
4.2.5. TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin CETC Değerlerinin Belirlenmesi ve Orjinal Ellman Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	96
4.2.6. TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin LOD Değerlerinin DTNB-Au-NP ve Orjinal Ellman Yöntemlerine Göre Karşılaştırılması.....	98
4.2.7. Sentetik TiyoL Grubu Antioksidan Karışım Çözeltilerinin DTNB-Au-NP Yöntemine Göre TTC Ölçümü	98
4.2.8. Yöntemin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımının Belirlenmesi	99
4.2.9. DTNB-Au-NP Yönteminin Farmasötik İlaçlara Uygulanması.....	100
4.2.10. Enterferans Çalışmaları.....	101
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	103
5.1. ANTİOKSİDANLARA DUYARLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ	103
5.2. TİYOL GRUBU ANTİOKSİDANLARA DUYARLI DTNB-AU-NP (DTNB BAĞLI ALTIN NANOPARÇACIK) ESASLI TAYİN YÖNTEMİ...	113
KAYNAKLAR	122
ÖZGEÇMİŞ.....	136

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması	7
Şekil 2.2: α -tokoferolün kimyasal yapısı	8
Şekil 2.3: C vitamininin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.4: β -karotenin yapısı	11
Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı	12
Şekil 2.6: Başlıca flavonoid sınıflarının temel (genel) kimyasal yapıları	13
Şekil 2.7: Fenolik asitlerin (bazı hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlerin) kimyasal yapıları	13
Şekil 2.8: Fenolik polimerlerin yapısı	13
Şekil 2.9: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı	13
Şekil 2.10: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı	20
Şekil 2.11: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı	21
Şekil 2.12: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı	22
Şekil 2.13: Homosistein ve homosistinin kimyasal yapısı	23
Şekil 2.14: Sisteaminin kimyasal yapısı	23
Şekil 2.15: 1,4-ditiyoeritritolün kimyasal yapısı	23
Şekil 2.16: Glutatyon etil esterinin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.17: Metiyoninin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.18: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı	26
Şekil 2.19: Küçük parçacıkların boyut olarak karşılaştırılması	27
Şekil 2.20: Atomik altın, altın nanoparçacık ve yığın halindeki altının karşılaştırılması	28
Şekil 2.21: 1990'dan itibaren altın ve gümüş nanoparçacıklar ile ilgili yayınlanan makale sayısındaki değişim	29
Şekil 2.22: Nanoyapı şekillerinin şematik olarak gösterimi	30
Şekil 2.23: Farklı şekil ve boyutlardaki altın nanoparçacıkların absorpsiyonu	31
Şekil 2.24: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı	33
Şekil 2.25: Bir elektromanyetik alan etkisi altında altın nanoparçacıktaki serbest elektronların kolektif osilasyonunun şematik gösterimi	33
Şekil 2.26: Gümüş ve altın nanoparçacıkların yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu	35
Şekil 2.27: 22, 48 ve 99 nm çaplarında küresel altın nanoparçacıkların yüzey plazmon bandları	36
Şekil 2.28: (a) Kesik küp, (b) kesik sekiz yüzlü, (c) on yüzlü, (d) yirmi yüzlü, (e) küre şeklindeki (f) altın, (g) gümüş ve (h) bakır nanokristallerinin absorpsiyon spektrumları	37
Şekil 2.29: Renk değişimi, UV-vis absorpsiyon spektrumunda lokalize yüzey plazmon bandlarının görünümü [107]	38

Şekil 2.30: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH) _n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatinin oluşumu.....	46
Şekil 2.31: ABTS ⁺ katyonunun yapısı	47
Şekil 2.32: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında 5-tiyo-2-nitrobenzoik aside dönüşümü	53
Şekil 2.33: Sentezlenen SNP'lerin antioksidanlarla (Ar(OH) _n) reaksiyonu sonucu SNP'lerin büyümesi	54
Şekil 2.34: DTNB-Au-NP'nin tiyol bileşiği ile reaksiyonunun şematik gösterimi.....	55
Şekil 4.1: Gümüş iyonu konsantrasyonunun SNP plazmon absorbansı üzerine etkisi...	68
Şekil 4.2: Trisodyum sitrat konsantrasyonunun SNP plazmon absorbansı üzerine etkisi	69
Şekil 4.3: SNP (referans çözelti) ve GA, CT, CFA ve AA varlığında SNPAC reaksiyon kinetiği	70
Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda oluşan SNP'lere pH'ın etkisi	71
Şekil 4.5: Sentezlenen gümüş nanoparçacığın UV-görünür bölge spektrumu ($\lambda_{\max}$: 417 nm)	72
Şekil 4.6: (a) Gallik asit varlığında oluşan SNP, (b) gallik asit yokluğunda oluşan SNP'lerin ve (c) gallik asidin UV-görünür bölge spektrumları	72
Şekil 4.7: (a) Trisodyum sitrat, (b) trisodyum sitrat + GA ile sentezlenen SNP'lerin SEM görüntüleri.....	73
Şekil 4.8: Polifenolik bileşiklerden seçilen epikateşin gallat, epigallokateşin gallat, rutin ve luteolinin SNPAC yöntemine göre kalibrasyon grafikleri.....	74
Şekil 4.9: Geliştirilen SNPAC yöntemine göre farklı QR konsantrasyonları varlığında oluşan SNP'lerin görünür bölge spektrumu: (a) 0, (b) 3.57, (c) 7.14, (d) 10.71, (e) 14.28, (f) 17.85 μ M ve renk değişimi	75
Şekil 4.10: Bazı meyve sularının SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mM-TR eşdeğeri).....	81
Şekil 4.11: Bazı bitki ekstraktlarının SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mmol TR/g-örnek eşdeğeri).....	82
Şekil 4.12: (a) Elma suyu, (b) Elma suyu + SNP'den oluşan olası karışımların UV-görünür bölge spektrumları	83
Şekil 4.13: (a) Siyah çay, (b) Siyah çay + SNP'den oluşan olası karışımların UV-görünür bölge spektrumları	84
Şekil 4.14: Farklı HAuCl ₄ konsantrasyonları ile hazırlanan Au-NP'lerin görünür bölge spektrumları: (a) % 0.002 , (b) % 0.004, (c) % 0.006, (d) % 0.008, (e) % 0.01 HAuCl ₄	85
Şekil 4.15: Farklı HAuCl ₄ konsantrasyonları ile hazırlanan Au-NP'lerin görüntüleri: (a) % 0.002, (b) % 0.004, (c) % 0.006, (d) % 0.008, (e) % 0.01 HAuCl ₄	86
Şekil 4.16: Farklı hacimlerde % 1'lik trisodyum sitrat ile hazırlanan Au-NP'lerin görünür bölge spektrumları: (a) 0.1, (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.4, (e) 0.5 mL trisodyum sitrat.....	87
Şekil 4.17: % 1'lik trisodyum sitrat çözeltisinin farklı hacimleri ile hazırlanan Au-NP'lerin görüntüleri: (a) 0.1 , (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.4, (e) 0.5 mL trisodyum sitrat.....	87
Şekil 4.18: Farklı reaksiyon sürelerinde hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile sistein varlığında oluşan TNB'lerin absorbans değişimi.....	88

Şekil 4.19: Farklı DTNB konsantrasyonlarında hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile sistein varlığında oluşan TNB'lerin absorbans değişimi	89
Şekil 4.20: DTNB-Au-NP (referans) ve NAC, GSH, Cys varlığında DTNB-Au-NP'nin bu tiyoller ile reaksiyonu sonucu oluşan TNB'nin reaksiyon süresine bağlı olarak değişimi	90
Şekil 4.21: Sistein varlığında oluşan TNB'ye pH'ın etkisi	91
Şekil 4.22: Sentezlenen altın nanoparçacığının UV-görünür bölge spektrumu (λ_{max} : 520 nm) ve rengi.....	92
Şekil 4.23: Trisodyum sitrat ile sentezlenen Au-NP'lerin SEM görüntüsü.....	93
Şekil 4.24: Tiyol grubu antioksidan bileşiklerden seçilen glutatyon, homosistein, 1,4-ditiyoeritritol ve N-asetil sisteinin DTNB-Au-NP yöntemine göre kalibrasyon grafikleri	94
Şekil 4.25: Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemine göre farklı Cys konsantrasyonları varlığında oluşan TNB'nin görünür bölge spektrumu: (a) 0, (b) 6.6, (c) 13.2, (d) 19.8, (e) 26.4, (f) 33.0 μ M ve renk değişimi.....	95

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitasyon konumları ve besin kaynakları [47].....	14
Tablo 2.2: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri.....	17
Tablo 4.1: Antioksidan bileşiklerin SNPAC yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları	76
Tablo 4.2: Antioksidan bileşiklerin SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları	78
Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin SNPAC yöntemine göre mM trolox (TR) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TAC değerlerinin karşılaştırılması	79
Tablo 4.4: Geliştirilen SNPAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı.....	80
Tablo 4.5: Bazı bitki ekstraktlarının SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.....	82
Tablo 4.6: SNPAC analizinde gıda örneklerinde bulunan çeşitli bileşenlerin etkileri...	83
Tablo 4.7: Tiyo grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları	96
Tablo 4.8: Tiyo grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP ve orijinal Ellman yöntemlerine göre CETC katsayıları.....	97
Tablo 4.9: Tiyo grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP ve orijinal Ellman yöntemlerine göre hesaplanan LOD değerleri	98
Tablo 4.10: Sentetik tiyo grubu antioksidan karışım çözeltilerinin DTNB-Au-NP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TTC değerlerinin karşılaştırılması.....	99
Tablo 4.11: Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı	100
Tablo 4.12: DTNB-Au-NP, orijinal Ellman ve HPLC yöntemlerine göre bazı farmasötik örneklerin tiyo içerikleri ve elde edilen geri kazanımlar	100
Tablo 4.13: DTNB-Au-NP yöntemiyle 0.1 mM Cys tayininde çeşitli bileşiklerin etkileri	102

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
ϵ	: Molar absorplama katsayısı
Kısaltmalar	Açıklama
AA	: Askorbik asit
Au-NP	: Altın nanoparçacık
BIL	: Bilirubin
CA	: Sisteamin
CETC	: Cysteine equivalent thiol content; Sistein eşdeğeri tiyol içeriği
CFA	: Kafeik asit
CHA	: Klorojenik asit
CT	: Kateşin
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Cu(II)-Nc	: Bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: Bakır(I)-neokuproin
CYS	: Sistein
DHLA	: Dihidrolipoik asit
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTE	: 1,4-ditiyoeritritol
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
DTNB-Au-NP	: DTNB bağlı altın nanoparçacık
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EDS	: Enerji dağılımlı spektroskopi
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin gallat
FR	: Ferulik asit
FTIR	: Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
GA	: Gallik asit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyon
GPx	: Glutatyon peroksidaz
HCYS	: Homosistein
LA	: Lipoik asit
LT	: Luteolin
NAC	: N-asetil sistein
NG	: Naringin
NP	: Nanoparçacık
QR	: Kuersetin
RA	: Rosmarinik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT	: Rutin
SERS	: Yüzeyde zenginleştirilmiş raman saçılması

SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
SNPAC	: Gümüş nanoparçacık antioksidan kapasite
SNP	: Gümüş nanoparçacık
SOD	: Süperoksit dismutaz
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopisi
TP	: α -tokoferol
TR	: Troloks
UA	: Ürik asit
XRD	: Toz difraksiyonu (X-ışını kırınımı)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ANTIOKSİDANLARA DUYARLI SOY METAL NANOPARÇACIK ESASLI YENİ SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ

Nilay GÜNGÖR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

Antioksidanların insan sağlığına olan yararlarından dolayı (kanser, kardiovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesi gibi) toplam içeriğinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Nanoparçacıklar – 1-100 nm arasında bir boyuta sahip yapılar – yığın halindeki malzemelerden daha üstün ve olağanüstü özelliklere sahip olduğundan dolayı artan şekilde ilgi çekici hale gelmiştir. Bu kapsamda bu tez çalışmasında, sağlıklı beslenme açısından ve biyolojik olarak kritik öneme sahip antioksidanların tayin edilebilmesi için, nanoparçacıkların olağanüstü özelliklerinden yararlanılarak soy metal nanoparçacık esaslı sensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk kısmında polifenollerin (flavonoidler, basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler gibi) antioksidan kapasitelerinin tayini için sitratla stabilize edilmiş gümüş çekirdekleri varlığında polifenollerle Ag (I) iyonlarının indirgenmesi esasına dayanan hassas kolorimetrik bir yöntem geliştirilmiştir. Kararlı süspansiyonun renginin kontrolü, trisodyum sitrat, gümüş nitrat ve gümüş çekirdeklerinin konsantrasyonları değiştirilerek sağlanmıştır. Trisodyum sitrat ve gümüş çekirdekleri varlığında, Ag (I) iyonlarının polifenollerle küresel gümüş nanoparçacıklara (SNP'lere) indirgenmesi 423 nm'de çok yoğun bir yüzey plazmon rezonans absorpsiyon bandı oluşturmuştur. SNP'lerin plazmon absorbansı, polifenollerin spektrofotometrik olarak kantitatif tayinine imkan sağlar. Geliştirilen yöntem geniş bir konsantrasyon aralığındaki standart polifenolik bileşiklere lineer bir cevap vermiştir. Rapor edilen nanoparçacık esaslı antioksidan analizlerinin aksine bu çalışmada SNP'lerin çekirdeklenmesi değil büyümesi konsantrasyona bağlı lineer bir cevap vermiştir. Çeşitli (hidrofilik ve lipofilik) antioksidanların geliştirilen yöntem kullanılarak elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri, CUPRAC yöntemiyle elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Okzalot, sitrat, meyve asitleri, amino asitler ve indirgeyici şekerler gibi gıdalarda yaygın olarak bulunan türler geliştirilen yöntemi enterfere etmemiştir. Bu yöntem lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri

kazanım açısından valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem güvenilir ve kararlıdır. Geliştirilen yöntem, ön işleme gerek olmaksızın bazı meyve suları ve bitki çaylarının toplam antioksidan kapasitesini (TAC) belirlemek için kullanılmış ve geniş bir aralıkta gıda bitkilerinin içerdiği antioksidan envanterinin çıkarılması için uygun bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Biyolojik sistemlerdeki önemli rollerinden dolayı biyotiyollerin tayini için hassas ve seçici yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir. Tez çalışmasının ikinci kısmında Ellman reaktifinin (DTNB) adsorbe edildiği altın nanoparçacıklar (Au-NP'ler) (DTNB-Au-NP) kullanılarak biyolojik örnekler ve farmasötik ilaçlardan biyolojik açıdan önemli tiyollerin (biyotiyollerin) seçimli olarak tayinine olanak sağlayan yeni bir optik sensör geliştirilmiştir. Çözelti fazında serbest sülfhidril gruplarının kantitatif belirlenmesinde kullanılan suda çözünür bir bileşik olan, 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kovalent olmayan etkileşimle Au-NP'lerin üzerine adsorbe edilmiş ve biyotiyollerle reaksiyonunun bir sonucu olarak sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB^{2-}) anyonunun oluşumuyla meydana gelen absorbans değişimleri 410 nm'de ölçülmüştür. Sensör geniş bir konsantrasyon aralığında sistein, glutatyon, homosistein, sisteamin, dihidrolipoik asit ve 1,4-ditiyoeritritolü kapsayan standart biyotiyol bileşiklere lineer bir cevap vermiştir. Her bir biyotiyol için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve bu bileşiklerin molar absorptivite ve lineer konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. Çeşitli biyotiyollerin DTNB-Au-NP yöntemi kullanılarak elde edilen sistein eşdeğeri tiyol içeriği (CETC) değerleri, tiyollere karşı reaktivitesi bulunan DTNB reaktifinin kullanıldığı klasik DTNB yöntemiyle elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. Amino asitler, flavonoidler, vitaminler ve plazma antioksidanları gibi genel biyolojik örnek içerikleri geliştirilen tayin yöntemini enterfere etmemiştir. Bu yöntem lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından valide edilmiş ve ortaya konulan yöntem güvenilir ve kararlı bir yöntemdir. DTNB bağlı Au-NP'ler, biyotiyol tayininde klasik DTNB reaktifine göre daha yüksek duyarlılık (daha düşük dedeksiyon limitleri) sağlamıştır. Optimize edilmiş koşullar altında sistein (Cys) geliştirilen yöntemle tayin edilmiştir. Sisteinin geliştirilen yöntemle elde edilen dedeksiyon limiti (LOD) 0.31 μM 'dır ve 0.4 – 29.0 μM konsantrasyon aralığında lineerdir ($r = 0.998$).

Ocak 2014, 137 Sayfa.

Anahtar kelimeler: Antioksidanlar, soy metal nanoparçacıklar, sensör, biyotiyoller.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

DEVELOPMENT OF NOVEL NOBLE METAL NANOPARTICLE SENSORS SENSITIVE TO ANTIOXIDANTS

Nilay GÜNGÖR

**Istanbul University
Graduate School of Science and Engineering
Department of Chemistry**

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN

Making estimation of total content of antioxidants is very important due to their possible health benefits (i.e., prevention of oxidative stress related diseases such as cancers and cardiovascular and neurodegenerative diseases). Nanoparticles – structures with at least one dimension between 1 nm and 100 nm – have attracted steadily growing interest due to fascinating properties and superior to those of bulk materials. In this regard, the aim of this thesis work is to develop novel noble metal nanoparticle sensors for detection of antioxidants crucial in healthy diet and biologically, utilizing the amazing surface properties of nanoparticles.

A sensitive colorimetric method for the detection of polyphenols (i.e., flavonoids, simple phenolic, and hydroxycinnamic acids) was developed at first part of this thesis work based on the reduction of Ag (I) ions by polyphenols in the presence of citrate-stabilized silver seeds. The color of the stable suspension was controlled by varying the concentration of trisodium citrate, silver nitrate, and silver seeds. The reduction of Ag (I) to spherical silver nanoparticles (SNPs) by polyphenols in the presence of trisodium citrate and silver seeds produced a very intense surface plasmon resonance (SPR) absorption band of SNPs at 423 nm. The plasmon absorbance of SNPs allows the quantitative spectrophotometric detection of the polyphenols, and the developed method gave a linear response over a wide concentration range of standard polyphenolic compounds. In contrast to other reported NP-based antioxidant assays, it was established in this work that growth but not nucleation of SNPs gave a linear concentration-dependent response. The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of various (hydrophilic and lipophilic) antioxidants using the developed method were comparable to those of the CUPRAC assay. Common food ingredients like

oxalate, citrate, fruit acids, amino acids, and reducing sugars did not interfere with the proposed sensing method. This assay was validated through linearity, additivity, precision and recovery, demonstrating that the assay is reliable and robust. The developed method was used to screen total antioxidant capacity (TAC) of some commercial fruit juices and herbal teas without preliminary treatment, and showed a promising potential for the preparation of antioxidant inventories of a wide range of food plants.

Development of sensitive and selective methods of determination for biothiols is important because of their significant roles in biological systems. We present a new optical sensor using Ellman's reagent (DTNB)-adsorbed gold nanoparticles (Au-NPs) (DTNB-Au-NP) in a colloidal solution devised to sensitively determine biologically important thiols (biothiols) from biological samples and pharmaceuticals at second part of this thesis work. 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), a versatile water-soluble compound for quantitating free sulfhydryl groups in solution, was adsorbed through non-covalent interaction onto Au-NPs, and the absorbance changes associated with the formation of the yellow-colored 5-thio-2-nitrobenzoate (TNB^{2-}) anion as a result of reaction with biothiols was measured at 410 nm. The sensor gave a linear response over a wide concentration range of standard biothiols comprising cysteine, glutathione, homocysteine, cysteamine, dihydrolipoic acid and 1,4-dithioerythritol. The calibration curves of individual biothiols were constructed, and their molar absorptivities and linear concentration ranges determined. The cysteine equivalent thiol content (CETC) values of various biothiols using the DTNB-Au-NP assay were comparable to those of the conventional DTNB assay, showing that the immobilized DTNB reagent retained its reactivity toward thiols. Common biological sample ingredients like amino acids, flavonoids, vitamins, and plasma antioxidants did not interfere with the proposed sensing method. This assay was validated through linearity, additivity, precision and recovery, demonstrating that the assay is reliable and robust. DTNB-adsorbed Au-NPs probes provided higher sensitivity (*i.e.*, lower detection limits) in biothiol determination than conventional DTNB reagent. Under optimized conditions, cysteine (Cys) was quantified by the proposed assay, with a detection limit (LOD) of 0.31 μM and acceptable linearity ranging from 0.4 to 29.0 μM ($r = 0.998$).

January 2014, 137 Pages.

Keywords: Antioxidants, noble metal nanoparticles, sensor, biothiols.

1. GİRİŞ

Antioksidanların insan sağlığına olan yararlarından dolayı (kanser, kardiovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesi gibi) toplam içeriğinin değerlendirilmesi ve beslenme ve tıp alanındaki uygulamaları oldukça büyük önem kazanmıştır [1]. Gıda ve biyolojik materyallerde bulunan tüm antioksidanların kapasitesini ölçen toplam antioksidan kapasite (TAC), bu matrislerin analizinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [2,3]. Karmaşık gerçek örneklerle uygulanan standardize edilmiş TAC testleriyle gıdalar, farmasötik ilaçlar ve diğer ticari ürünlerin antioksidan değerleri anlamlı bir şekilde karşılaştırılabilmiş ve ürünler arasındaki veya içindeki farklılıklar kontrol edilebilmiştir. Gıda ve bitki ekstraktları, meyve suları ve biyolojik sıvıların [3] toplam antioksidan kapasite tayini için elektron transferine (ET) dayalı (CUPRAC, Folin-Ciocalteu, FRAP, ferrisiyanür), hidrojen atom transferine (HAT) dayalı (ORAC) ve ET/HAT esaslı (ABTS-persülfat/TEAC, DPPH) yöntemler gibi çok çeşitli moleküler spektroskopik yöntem geliştirilmiştir [4,5].

Gümüş nanoparçacıklar (SNP'ler) küçük boyutları (1-100 nm) ve çok yüksek, özel yüzey alanları nedeniyle çok fazla ilgi çekmiş ve tıp, kataliz, tekstil mühendisliği, biyoteknoloji ve biyomühendislik, su arıtımı, elektronik ve optik gibi birçok farklı alanda uygulama alanı bulmuştur [6]. Buna rağmen nanomateryal esaslı yöntemler gıda biliminde (özellikle antioksidan araştırmalarında) muhtemelen antioksidanlarla nanoparçacık oluşumunda ilgili indirgenme reaksiyonunun subsitokiyometrik karakterinden dolayı nadiren kullanılmaktadır. Polifenoller ve bu polifenolleri içeren gıda ve biyolojik örneklerin uygun bir duyarlılık ve konsantrasyon aralığında çok çeşitli antioksidan bileşikler için SNP esaslı bir yöntemin kullanıldığı toplam antioksidan kapasite tayini henüz rapor edilmemiş ve tez çalışmasının literatürdeki bu boşluğu doldurması hedeflenmiştir.

Gümüş nanoparçacıklar elektriksel iletkenlik, kimyasal kararlılık, katalitik ve antibakteriyel aktivite, DNA sekanslama (sıralama) ve yüzeyde zenginleştirilmiş Raman

saçılması (SERS) [7,8] gibi çeşitli özellik ve uygulamalara sahiptir. Kararlı SNP'lerin sentezlenmesinde yaygın olarak kullanılan indirgeme ajanları sodyum borhidrür, sodyum sitrat, askorbik asit ve elementel hidrojen [7]. Başlangıçta farklı Ag (I) türlerinin indirgenmesi gümüş atomlarının (Ag^0) oluşumuna yol açar ve bunu takiben gümüş atomları oligomerik yığınlar halinde bir araya gelirler. Sonuç olarak bu yığınlar koloidal gümüş parçacıkların oluşumuna yol açar [9]. Klasik indirgeme ajanlarının dışında çeşitli bitki ve biyolojik ekstraktlar, SNP'lerin sentezinde indirgeyici olarak kullanılmışlardır [10]. Fakat yapılan ön çalışmalar göstermiştir ki nanoparçacık oluşumunda (çekirdek oluşumu) indirgeyici olarak bir tek antioksidan kullanımı TAC yöntemi geliştirilmesinde faydalı değildir. Çünkü konsantrasyona bağlı olarak lineer bir cevap (antioksidan konsantrasyonuna karşı SPR, yüzey plazmon rezonans absorbansı gibi) elde edilmez. SNP'lerin kontrollü bir şekilde sentezi, sodyum borhidrür indirgemesi ve sitrat stabilizasyonundan oluşan iki aşamalı indirgeme prosesine [11] bağlıdır. SNP'ler sıvı ortama dağıldığında yığın halindeki metalin spektrumunda var olmayan güçlü bir UV-vis absorpsiyon bandı gösterir [12]. Bu absorpsiyon bandı yüzeyde elektron yoğunluğundaki periyodik bir değişimle parçacıklardaki elektronların kolektif uyarılmasına (SPR, yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu) dayandırılır [13]. SNP'lerin SPR absorpsiyonu çok yüksek molar absorpsiyon katsayılarına ($\epsilon \approx 3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sahiptir ve optik dedeksiyon yöntemlerinde daha yüksek duyarlılığa sahip olması beklenir [12] fakat bu ϵ SNP'lerin molaritesi temelinde hesaplanmış doğru bir değerdir [14] ve NP-esaslı TAC tayinlerinde reaksiyon stokiometrisi, parçacık boyutu ve şekli, metal ve bulunduğu ortamın dielektrik sabiti gibi SPR absorpsiyonunu etkileyen faktörlerden dolayı ideal duyarlılık elde edilemez [15]. Nanoparçacık yüzeyi ve özellikle kabuk kalınlığı değişiminin bir sonucu olarak yüzey plazmonları değiştirilebildiğinden bu çalışmada çekirdek-merkezli parçacık büyütme tekniği [16] kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında polifenolik bileşiklerin, bu bileşiklerin sentetik antioksidan karışımlarının ve gerçek örneklerin (meyve suları, bitki çayları gibi gıda örneklerinin) toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için gümüş nanoparçacık esaslı (SNP-esaslı) yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Polifenolik bileşiklerin Ag (I) iyonu indirgeyebilme yeteneği ölçülmesi sebebiyle yöntem araştırma grubumuz tarafından SNPAC yani "Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite" yöntemi olarak

adlandırılmıştır. İlk olarak zayıf bir indirgen olan trisodyum sitratla Ag (I) iyonlarının indirgenmesiyle gümüş çekirdek parçacıkları hazırlanmıştır. İkinci aşamada, gümüş çekirdekleri üzerindeki Ag (I) iyonlarının da indirgenmesini sağlayarak çekirdek-kabuk yapısını oluşturmak üzere ikicil indirgeyici ajan olarak bir antioksidan ilave edilmiştir. Çekirdek-kabuk halindeki NP'ler en dış tabakadır ve gelen ışıkla etkileşir [16]. Antioksidan ve Ag (I) iyonları SNP'lerin büyümesiyle sonuçlanan elektron transferinin gerçekleştiği çekirdek halindeki parçacıkların yüzeyine difüzlenir. TAC tayini için geliştirilen nanomateryal esaslı yeni yöntem polifenolik bileşik ortamında SNP'lerin büyümesine ve ilgili plazmon absorpsiyon bandlarının optik olarak gözlenmesine dayanır. Bu şekilde polifenol ortamında büyümüş SNP'lerin optik özellikleri ilgili fenolik asitlerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılıdır. Ayrıca optik özelliklerin başlıca nanokabuk kalınlığına bağlı olmasından dolayı [16], bu özellikler antioksidan molekülüyle Ag (I) indirgeme reaksiyonunun sitokiyometrisiyle yakından ilişkilidir. SNPAC yöntemi meyve suları gibi karmaşık örneklerle ön işlem uygulanmadan ve bozucu etki göstermeksizin başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Böylece SNP'lerin olağanüstü optik özellikleri kullanılarak gıda polifenoller ve antioksidan vitaminler için hızlı, basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Biyolojik antioksidanlar düşük molekül ağırlıklı, hücresel yağlar, proteinler ve nükleik asitleri serbest radikallerin oksidatif hasarından koruyan bileşikler içermektedir. Biyotiyoller reaktif oksijen türleri (ROS) giderme kapasitesi ve güçlü indirgeyebilme güçlerinden dolayı bu bileşikler arasında önemli bir biyolojik rol oynamaktadırlar [17]. Organizmada biyotiyol düzeylerinin azalmasının karaciğer yetersizliği, koroner atardamar hastalığı, felç ve diğer nörolojik rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu görülmektedir. Son zamanlarda biyotiyoller kullanılarak bu hastalıkların tedavisi araştırılmaktadır. Glutasyonun indirgenmiş/yükseltgenmiş formlarının (GSSG/GSH) redoks potansiyeli, hücre içerisindeki redoks ortamının temel bir indikatörüdür [18] ve GSH hücreler arası dehidroaskorbik asitten askorbik asit oluşumunda rol oynar. Bu nedenlerden dolayı biyotiyollerin antioksidan özelliklerine olan ilgi oldukça fazla artmıştır.

Nanoparçacıklar (NP'ler) biyolojik makromoleküllerle boyutsal benzerlikleri ve boyuta-bağılı olağanüstü optik ve elektronik özellikleri itibarıyla biyolojik tavinlerde kullanım açısından gittikçe daha çekici hale gelmektedirler [19]. Ortaya çıkan fiziksel özellikler ne yığın halindeki metalin ne de moleküler bileşiklerin özelliklerine benzemez, bu özellikler parçacık boyutuna, parçacıklar arasındaki uzaklığa, koruyucu organik kabuğun doğasına ve nanoparçacıkların şekline bağılıdır [20]. Özellikle altın nanoparçacıklarının (Au-NP'ler) asosiyasyonu ve olası agregasyonu (yığışımı) sonucunda oluşan renk değişimi, birbirinden farklı pek çok analitin basit, yüksek seçimli tavinine olanak vermektedir [19]. Au-NP'ler en kararlı metal nanoparçacıklardır ve parçacıkların bireysel davranışını, boyutla ilgili elektronik, manyetik ve optik özelliklerini (kuantum boyut etkisi) kapsayan malzeme bilimiyle ilgili konuları ve kataliz ve biyoloji alanındaki uygulamaları içeren ilgi çekici yönler sunar [20]. Analitik veya biyolojik bilimlerde kullanılmak üzere nanoteknoloji esaslı ultra hassas tavin ve görüntüleme yöntemleri geliştirilmesi bilim dünyasında gittikçe ilgi çekici hale gelmektedir. Özellikle fonksiyonel altın nanoparçacıklar, benzersiz optik özellikleri (yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve rezonans ışık saçılması gibi), bir çeşit yüzey kaplama halinde birleşebilme özelliği ve mükemmel biyouyumluluk (genellikle modifiye edilmemiş Au-NP'ler toksik değildir ve modifiye edilmiş Au-NP'lerin biyolojik toksisitesi onların ligandlarına bağılıdır) gibi özelliklerinden dolayı biyolojik ve farmasötik alanlarda geniş kullanım alanı bulmuştur [21].

Kolloidal altın Au-NP çözeltileri çok küçük boyutlarda ortaya çıkan belirgin kırmızı bir renge sahiptir. Nanometre boyutlarında elektron bulutu parçacık yüzeyinde salınım yapar ve belirli bir enerjide elektromanyetik ışığa absorplar. Yüzey plazmon rezonansı olarak bilinen bu rezonans nanoparçacıkların küçük boyutlarının bir sonucudur. Nanoparçacık boyutu birçok faktör tarafından etkilenebilir. Özellikle çözücü ve yüzey modifikasyonu bandın frekansını ve şiddetini etkileyen önemli faktörlerdir. Yüzey etkilerine olan bu bağımlılık nedeniyle yüzey plazmon bandı, parçacık yüzeyi üzerine adsorpsiyonun ideal bir şekilde gözlemlenmesini sağlar [22].

Altın nanoparçacıklar, boyut-bağımlı optik özellikleri olması ve tiyoller ve tiyol-modifiye moleküllere yüksek ilgi göstermesi nedeniyle duyarlı algılama materyalleri olarak ilgi çekmektedir [23]. Tiyol tavininde kullanılan optik problemlerin büyük bir kısmı,

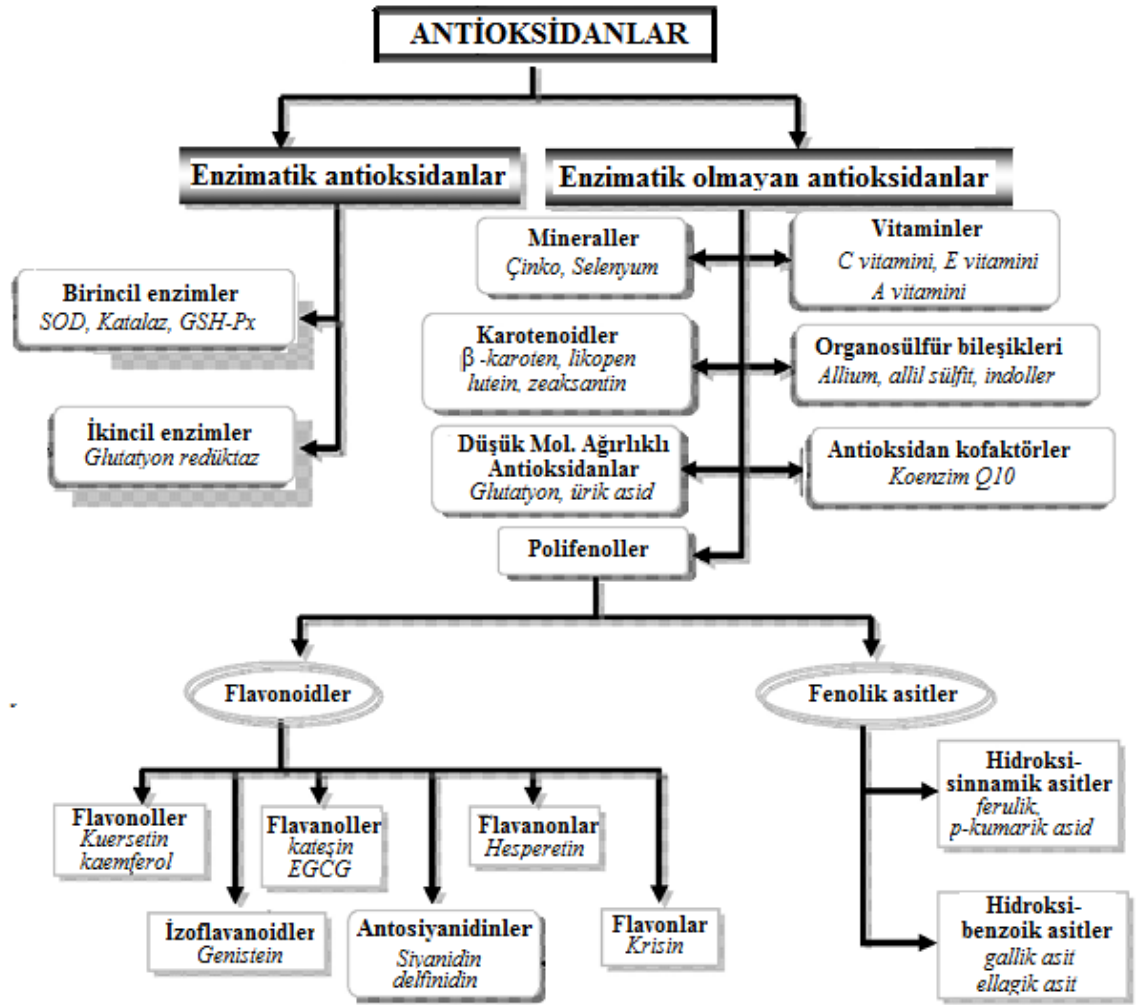
tiyollerin kuvvetli nükleofilik özelliği ve metal iyonlarına yüksek bağlanma eğilimi gibi iki temel özellikten yararlanmaktadır. Bu doğrultuda, optik problemlerin büyük bir kısmı, algılamada tiyoller ve problemler arasındaki bazı özel reaksiyonları, örneğin aldehitlerle halka kapanması, sülfonamid ve sülfonat esterlerinin tiyollerle parçalanması, selenyum-azot bağının tiyollerle koparılması, metal komplekslerinin yükseltgenme-indirgenmesi, metal komplekslerinin ligand değişimi, nano-taneciklerle etkileşimler ve diğer benzeri reaksiyonlar kullanılmaktadır [19,24-26]. Özellikle antioksidan karışımlarından seçimli tiyol tayininde basit, düşük-maliyetli ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Tez çalışmasının bu kısmında, üzerinde DTNB adsorplanmış Au-NP'lerin (DTNP-Au-NP'ler) oluşturduğu sol çözeltisi kullanarak yeni bir spektrofotometrik tiyol tayin yöntemi geliştirilmiştir. Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid) çözelti fazında serbest sülfhidril gruplarının kantitatif belirlenmesinde kullanılan suda çözünür bir bileşiktir. DTNB, bir disülfür karışımı ve pH 7.27'de sarı renkli dianyon formunda bulunan ve 412 nm dalgaboyunda 1.415×10^4 L mol⁻¹ cm⁻¹ molar absorpsiyon katsayısına sahip 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB²⁻) vermek üzere serbest bir sülfidril grubuyla reaksiyona girer. DTNB nötral pH'da -SH gruplarına karşı özgülüğü, yüksek molar absorpsiyon katsayısı ve reaksiyon süresinin kısalığı açılarından önemli bir tiyol tayin reaktifidir [27]. Öncelikle Au-NP'ler Turkevich ve Frens [28,29] yöntemlerine göre, indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat varlığında altın (III) bileşiklerinin altın atomlarına indirgenmesiyle sentezlenmiştir. Bu yöntem parçacık yüzeylerindeki sitratların gevşek kabuğundan dolayı istenen liganlarla kolayca yer değiştirebilmesinden dolayı sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [21]. İkinci aşamada toksik olmayan ve kararlı, tiyollere karşı yüksek bir afinite ve bağlanma kapasitesi gösteren DTNB bağlı Au-NP'ler hazırlanmıştır [30]. Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi karmaşık biyolojik örnekler ve farmasötiklere ön işlem uygulanmadan ve bozucu etki göstermeksizin başarılı bir şekilde uygulanmıştır. DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen sonuçlar klasik DTNB yöntemiyle elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Böylece biyolojik örnekler ve farmasötiklerdeki biyotiyollerin seçimli olarak tayini için hızlı, basit ve hassas bir yöntem geliştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ANTiOKSiDANLAR

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük konsantrasyonlarda, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir [31]. Yaşayan organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asid, α -tokoferol, β -karoten, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerirler [32] (Şekil 2.1). Bu antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif türleri (serbest radikaller) etkin bir şekilde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu reaktif bileşiklerin (reaktif oksijen türleri vb.) varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikleri ve enzimleri önemli kılmaktadır [33,34]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin ($\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2) süpürücüleri olarak bilinirler [32].



SOD= Süperoksit dismutaz; GSH-Px= Glutasyon peroksidaz, EGCG= Epigallo kateşin gallerat

Şekil 2.1: Antioksidanların sınıflandırılması.

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı şekilde etki ederler:

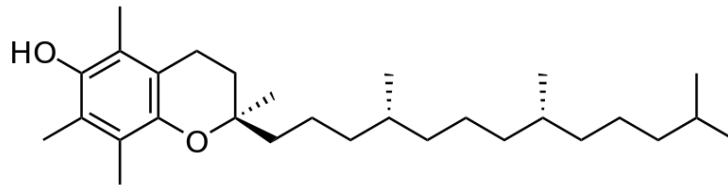
- i-) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz, GSH-Px vb.) bu şekilde etkilidir.
- ii-) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme, “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- iii-) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki, “zincir kırıcı” etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.

iv-) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması, “onarıcı” etkidir.

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretildikleri (endojen) gibi, gıdalar yoluyla da (eksojen) alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C ve E vitaminleri), fenolik bileşikler (basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler, flavonoidler vb.) ve karotenoidlerdir. Birçok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [35]. Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Örneğin, oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler veya hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali gibi ROS türlerini sönmeye uğratarlar (süpürürler). Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonların başlamasını önlerler, metal iyonu katalizörlerini bağlarlar [36].

2.2.1. E vitamini

E vitamini; hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan koruyan yağda çözünen bir antioksidandır. Dört tokoferol ve dört tokotrienol olmak üzere 8 moleküler formu vardır. Bunlardan α -, β -, γ - ve δ - tokoferoller antioksidan aktivite için gerekli olan hidroksil grupları içerirler. Antioksidan özellik α -tokoferolde en fazladır. Tokoferollerin gösterdiği antioksidatif aktivitenin esası, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikale aktarma yolu ile serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek onların vücutta yaptıkları hasarı onarmaktır [37].

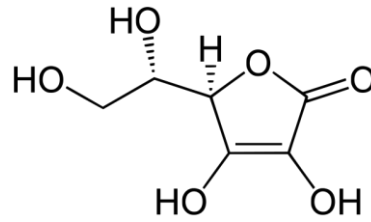


Şekil 2.2: α -tokoferolün kimyasal yapısı.

2.2.2. Askorbik Asit (C vitamini)

Askorbik asit, C vitamininin meyvelerde bulunan en baskın formu olup, biyolojik sistemler için önemli indirgen ajanlardanır. Askorbik asit, lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu elektron vererek durdurur. Askorbik asit serbest radikalleri hücre membranına varmadan etkisiz hale getirir. Askorbik asit antioksidan mekanizmaya singlet oksijeni gidererek, lipid peroksidasyonu ile oluşan peroksi serbest radikalini

süpürerek, α -tokoferol radikalini α -tokoferole indirgeyerek katkı sağlar. Askorbik asit türevleri de metabolizma için önemlidir. İnsan, glukozu C vitaminine dönüştüren enzimden yoksundur [38]. Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yeşil biber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır [39].



Şekil 2.3: C vitamininin kimyasal yapısı.

2.2.3. Antioksidan Enzimler

Gıdalarda ve bu gıdaları tüketen insanlarda bazı enzimler, oksidatif hasara yol açan oksijeni, hidrojen peroksit ve süperoksit radikalleri gibi aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidatif aktivite göstermektedir. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz bu gruba giren enzimler arasında yer almaktadır [40].

2.2.3.1. Süperoksit Dismutaz

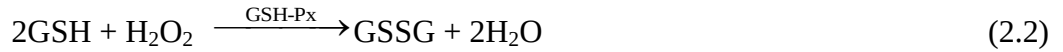
Süperoksit dismutaz enziminin başlıca görevi, dokularda ve hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktır. Süperoksit dismutaz enzimi, çok önemli bir süperoksit süpürücüsüdür. Daha çok ekstrasellüler matrikste olmak üzere hücre yüzeylerinde bulunur. Süperoksit dismutaz enzimi, oksidatif strese karşı hücreleri korumada en etkili enzimdir. Çünkü bu enzimin aktivitesi, Haber-Weiss reaksiyon substratlarının ($O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2) konsantrasyonlarını belirler.

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksit dismutaz, katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir [41].



2.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hücredeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu anahtar rolü oynayan bir enzimdir. Glutasyon peroksidaz enzimi, sitozol ve mitokondride bulunur. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen glutasyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutasyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüştürmektedir. Glutasyon peroksidaz glutasyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücresel membranları korumaya yarar [42].



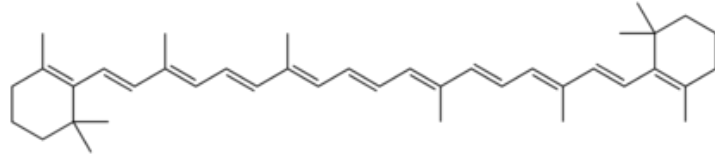
2.2.3.3. Katalaz

Hücrelerin aktiviteleri sonucu ürün olarak hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit, katalaz tarafından parçalanmazsa vücut için çok tehlikeli bir serbest radikal olan hidroksil radikalının öncülü olarak davranır ve bu radikal hücrede kalıcı hasarlara neden olur. Katalaz enzimi, toksik hidrojen peroksiti hücrelerden uzaklaştırmada önemli bir rol oynar. Bu amaçla, hücrelerin aktiviteleri sonucu oluşan hidrojen peroksiti vücut dokularına dağılmadan önce su ve moleküler oksijene ayrıştırır [36].



2.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. En önemlileri, β -karoten, likopen, lutein ve zeaksantindir. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunurlar. En yaygın kullanılan A-provitamini olarak da bilinen β -karoten'dir (Şekil 2.4). A-vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β -karoten antioksidan aktiviteye sahiptir [43].



Şekil 2.4: β -karotenin yapısı.

2.2.5. Polifenoller

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler olarak üç sınıfa ayrılır.

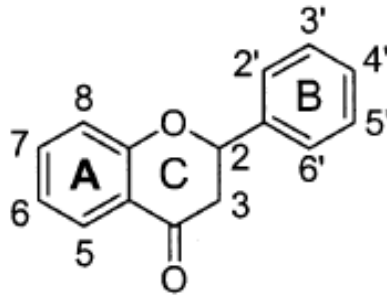
Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenollerini multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar [44]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük derşimlerde bulunduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [45].
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [46].

2.2.5.1. Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.5). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan

4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma (inhibe etme) özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-*orto* glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Bu gruptaki bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal süpürme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [47].



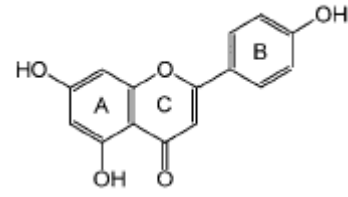
Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Flavonoidler, fenolik halkalardan oluşan benzo- γ -pyran türevleridir [47]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve şekerleri süstituent olarak içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (Şekil 2.5) [43]:

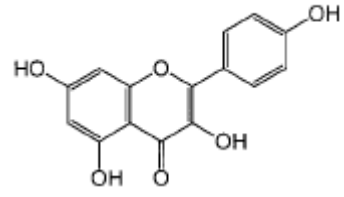
1. Antoksaninler

- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

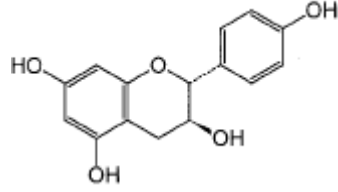
2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



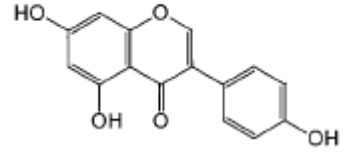
flavon



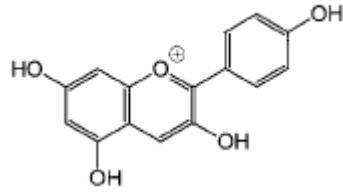
flavonol



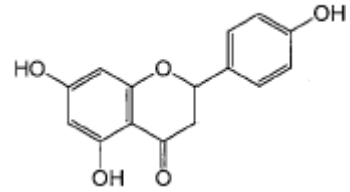
flavanol



izoflavon



antosyanidin



flavanon

Şekil 2.6: Başlıca flavonoidlerin sınıflarının temel (genel) kimyasal yapıları.

Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitüsyon modelleri ve bazı besin kaynakları Tablo 2.1’de verilmiştir [47].

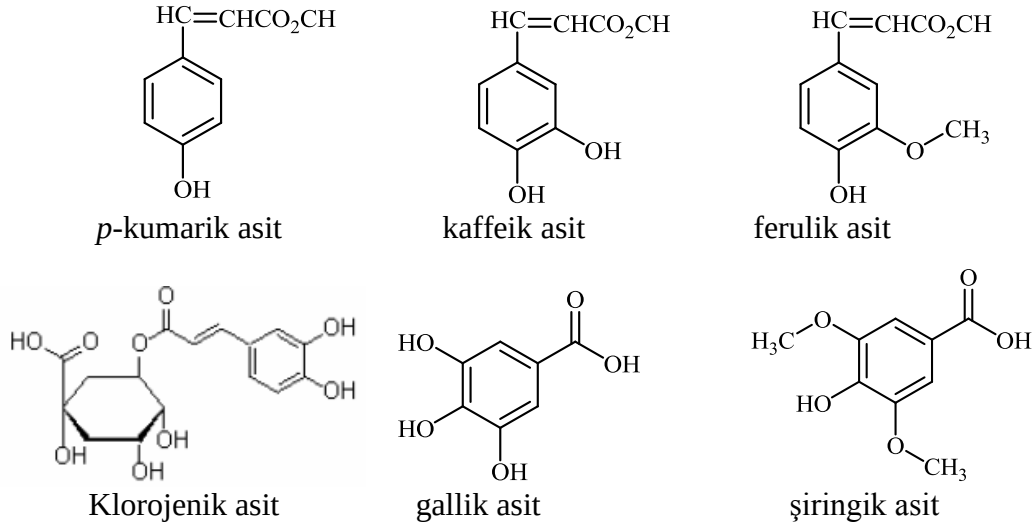
Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitüsyon konumları ve besin kaynakları [47].

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

2.2.5.2. Fenolik Asitler

Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur [48]. L-fenil alanin veya L-tirosinden *p*-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir (Şekil 2.7).

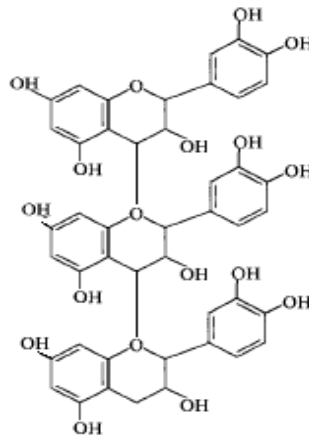
Yapılarındaki $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ gruplarının varlığı, hidrojen atomu verebilme yeteneklerini arttırmanın yanı sıra benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik asit, protokateşuik asit'dir.



Şekil 2.7: Fenolik asitlerin (bazı hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlerin) kimyasal yapıları.

2.2.5.3. Fenolik polimerler (Tanenler)

Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda mevcuttur [48].



Şekil 2.8: Fenolik polimerlerin yapısı.

2.2.6. Tiyol Grubu Antioksidanlar

Tiyoller, bunların aktif halleri olan sülfidril kalıntılarının (-SH) varlığıyla tanımlanmış organik sülfür türevleri sınıfıdır. Kimyasal olarak tiyoller merkaptanlardır (R-SH) ve biyolojik merkaptanlar çoğu zaman biyotiyoller olarak adlandırılırlar. Biyotiyoller, büyük molekül ağırlıklı protein tiyoller ve düşük molekül ağırlıklı serbest tiyoller olarak sınıflandırılabilirler.

Tiyoller, aerobik yaşam şekillerine dağılmıştır. Biyolojik sistemlerde bulunan tiyoller antioksidan savunma sistemlerinin koordinasyonunda esas rolü oynaması dahil olmak üzere sayısız fonksiyona sahiptir [49].

Tiyol antioksidanlar çeşitli mekanizmalarda rol oynarlar;

- Tiyol / disülfür redoks tamponu bileşeni olarak
- Metal kelatlayıcı olarak
- Radikal süpürücü olarak
- Özel redoks reaksiyonlarında substrat olarak (glutasyon gibi)
- Sadece proteinlerdeki disülfat bağlarının özel indirgeyicisi olarak (tiyoredoksin gibi) [50]

Tiyollerin önemli bir karakteristik özelliği, indirgeme yeteneğine sahip olmalarıdır. Tiyoller indirgen özellikte olup negatif standart indirgeme potansiyeline sahiptir (Tablo 2.2). Bu yüzden oksidan-tiyol etkileşiminde, oksidan tiyolün indirgeyici gücünün harcanmasıyla daha az toksik ilgili bir türe dönüşür, tiyolün kendisi ise disülfür haline (R-S-S-R) yükseltgenir. Bir tiyol (R-SH), -SH grubundan bir H atomu kaybıyla ve kükürten bir elektron kaybıyla bir tiyil radikali (R-S[•]) oluşur. Fizyolojik pH'ta tiyil radikalleri kararsızdır ve disülfür haline dönüşebilir [51].

Tablo 2.2: Bazı biyolojik redoks çiftlerinin redüksiyon potansiyelleri.

İndirgenme yarı reaksiyonu	Standart redüksiyon potansiyeli / V
$1/2 \text{ O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	0.816
$\text{Fe}^{3+} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	0.771
$\text{Sistin} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2 \text{ sistein}$	-0.220
$\text{GSSG} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2 \text{ GSH}$	-0.230
$\text{Lipoik asit} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2 \text{ dihidrolipoik asit}$	-0.290

GSSG,yükseltgenmiş glutatyon; GSH, indirgenmiş glutatyon [49]

Biyotiyoller, hücreleri reaktif oksijen türler sebebiyle oluşan oksidatif hasara karşı koruyan olağanüstü etkili antioksidanlardır. Bu antioksidan reaksiyonlarda tiyolün bir elektron kaybetmesiyle tiyil radikali oluşur [17].



Kükürt içeren bileşiklerin antioksidan aktiviteleri genel bir eğilim izler. Bileşiğin yapısındaki indirgenmiş form (–SH grubu) ne kadar fazla ise bileşik o kadar güçlü antioksidan etki gösterir [52].

Tiyol bileşikleri, glutatyon peroksidaz reaksiyonunda bir subtrat olan GSH gibi özel antioksidan fonksiyonlarına [50,53] sahip olduğu kadar radikal süpürücü [54,55] gibi genel antioksidan özelliklere de sahiptir.

Canlı dokulardaki tiyol bileşiklerin önemli özelliklerinden bir diğeri de tiyol/disülfür bileşimini düzenleyici görev yapmalarıdır [56,57]. Disülfür bağları, çözünebilir proteinlerin yapısal kararlılığının sağlanmasında temeldir. Disülfür bağlarının oluşumu ve kırılması, ortamın redoks potansiyelini tayin eden elektron donör ve akseptörlerin varlığına bağlıdır. Böylece hücre içi veya hücre dışı ortama tiyol ilavesi protein yapı ve fonksiyonunda kuvvetli etkilere neden olabilir.

Tiyol ve disülfür arasındaki denge reaksiyonu (2.5) denkleminde tanımlanmıştır.

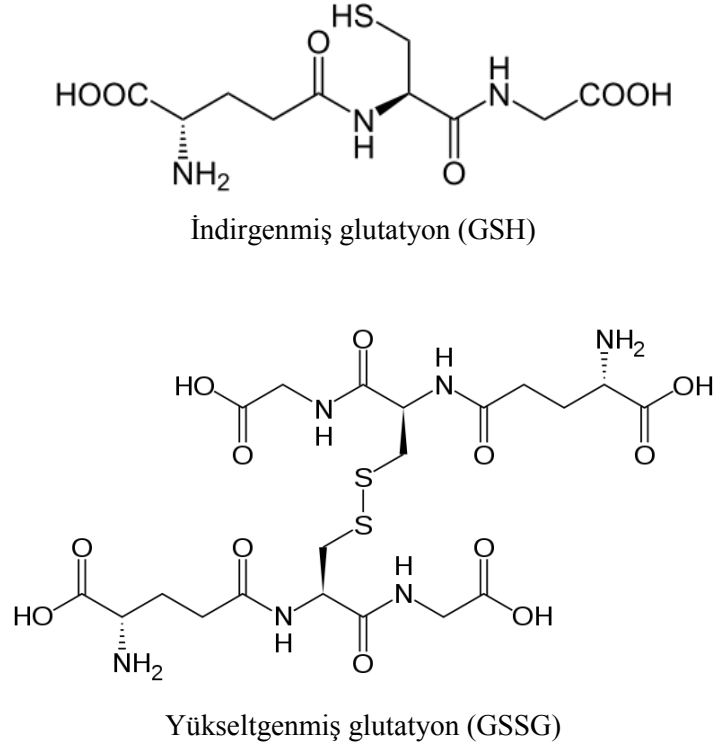


Glutatyonun (GSH), yükseltgenmiş formu olan GSSG'ye oranı biyolojik bir sistemde oksidatif stresin etkili bir ölçüsü olmuştur [58]. Oksidatif stres koşulları altında belli antioksidanların varlığındaki artış genel olarak yararlıdır. Hücreler oksidatif strese karşı GSH ve tiyoredoksin gibi tiyollerin hücre içindeki düzeylerini artırmak için bir takım mekanizmalar geliştirmişlerdir. Ekzojen tiyoller insan ve hayvan hücre kültürlerindeki tiyol seviyelerini artırmak için başarılı bir şekilde kullanılmışlardır. GSH ve diğer tiyol seviyelerinin artışı, insanların hastalıklardan korunmasında ve hastalıkların tedavisinde oksidatif strese karşı olan toleransı artırmıştır [50].

2.2.6.1. Glutatyon

Tiyol grubu içeren endojen antioksidan bileşiklerden en önemlisi glutatyondur. Glutatyon (GSH), tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Bu sentez 2 basamakta gerçekleşir. Birinci basamakta, γ -glutamilsistein sentetaz isimli enzim GSH'ın prekürsör amino asitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteinin oluşumunu katalizler. İkinci basamakta ise glutatyon sentetaz, glisin ve γ -glutamilsisteinden glutatyonu oluşturur.

İndirgenmiş glutatyon, serbest bir sülfidril gurubu içeren bir tripeptiddir. İndirgenmiş durumda hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin sistein artıklarını muhafaza eden bir sülfidril tamponu olarak görev yapar. İndirgenmiş glutatyonun (GSH), yükseltgenmiş forma (GSSG) oranı normalde yaklaşık 500/1'dir. İndirgenmiş form, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin sebep olduğu detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar [59].



Şekil 2.9: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.

GSH aynı zamanda GSH peroksidazlar (selenyum içeren ve diğerleri) için substrat olabilir. GSH peroksidaz, H_2O_2 'nin indirgenmesini sağlar. GSH, askorbatın yanı sıra birçok hücrenel bileşiğin indirgenmesinden de sorumlu olan bir yapıya sahiptir.

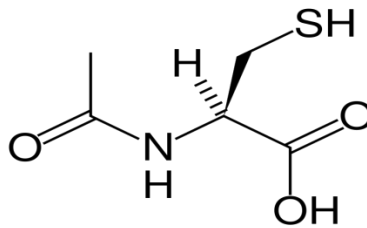
Glutatyon, doğadaki en bol ve her yerde bulunan küçük organik moleküllerden biridir. Nerdeyse tüm yaşayan hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bu endojen antioksidanın birçok önemli fonksiyonel rolü olduğu birçok defa incelenmiştir. Kseno biotikler, karsinojenler, serbest radikaller ve lipid peroksitler gibi birçok endojen ve ekzojen maddenin detoksifikasyonunda, intrasellüler indirgenme reaksiyonlarında, kataliz olaylarında, metabolizmada ve aminoasitlerin aktarımında, protein yapılarının ve fonksiyonlarının korunması, protein sentezinin ve yıkımının düzenlenmesi, oksidatif hasara karşı koruma ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kanseri, diyabet, alkolik karaciğer hastalığı, katarakt, AIDS ve Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere birçok dejeneratif durumun ve hastalığın nedeni olarak GSH/GSSG dengesinin bozulması gösterilmektedir. Ayrıca GSH'ın serbest radikallerin genotoksik etkilerine karşı koruduğu düşünülmüştür [60].

İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutatyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; çeşitli stres faktörlerinin, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığı gösterilmiştir. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir. 'In vivo' ve 'in vitro' koşullarda yapılan deneylerde, endojen GSH'nin çeşitli hasarlarda, mide mukozası bütünlüğünün korunmasında önemli bir bileşik olabileceği görüşü ileri sürülmektedir [59].

2.2.6.2. N-Asetil Sistein

Tiyol grubu bileşiklerden olan N-asetil sistein (NAC), doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellikler gösterir. NAC'nin serbest tiyol grubu, ROS'un elektrofilik gruplarıyla etkileşime girebilecek kapasitededir [61,62]. Ayrıca NAC, bir GSH ön maddesi olarak dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir [61].

N-asetil sistein, 'in vivo' ve 'in vitro' koşullarda bir antioksidan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. N-asetil sistein, kuvvetli bir hipokloröz asit süpürücüdür. Aynı zamanda iyi bir hidroksil radikali süpürücüdür. NAC, hidrojen peroksitle ise yavaş bir şekilde reaksiyona girmektedir [62].

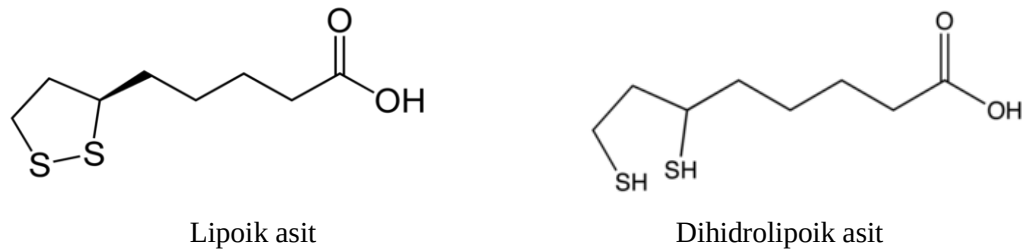


Şekil 2.10: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.

NAC'nin mukolitik etkisinin mukus makromolekülleri arasındaki disülfür bağı arasına girerek bu bağı kırdığı sanılmaktadır [63,64]. NAC'nin diğer bir etkisi, plazmadaki tiyol bileşiklerinin metabolizmasına bir girişim yapmasıdır. NAC'deki sülfidril grubunun varlığı, sistein ve diğer endojen sülfidril içeren bileşiklere bağlanma eğilimini açıklar [64].

2.2.6.3. Dihidrolipoik asit

Lipoik asit (LA) ve indirgenme ürünü olan dihidrolipoik asidin (DHLA) antioksidan özellikleri son birkaç yıldan beri yaygın bir şekilde incelenmektedir. α -lipoik asit (LA: 1,2-ditiyolan-3-pentanoik asit), pruvat dehidrojenaz ve ketoglutarat dehidrojenaz için koenzim olarak mitokondride bulunan bir disülfür bileşiğidir [65]. Birçok hayvan ve bitki dokusunda olduğu kadar çoğu prokaryot ve ökaryot mikroorganizmalarda da bulunur [66]. Hücresel lipoik asidin dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenmesinin memeli hücre ve dokularında olduğu belirtilmiştir.



Şekil 2.11: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

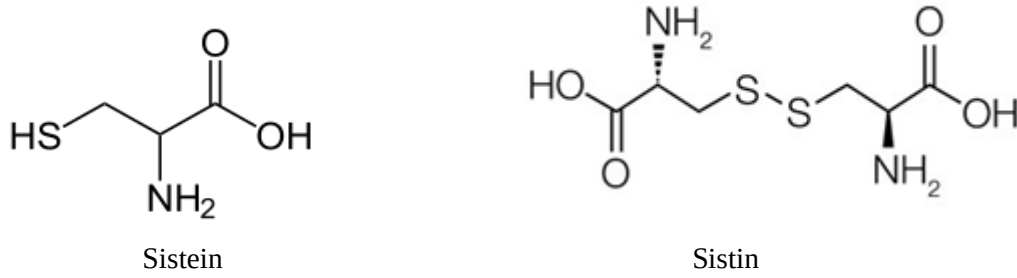
Yükseltgenmiş hal olan lipoik asit, hidroksil radikali, hipokloröz asit ve singlet oksijen süpürücü olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda geçiş metallerini kelatlayıcı olarak da rol oynamaktadır. Canlı dokularda lipoik asit lipoamid dehidrojenazla DHLA'ya indirgenir. Redüksiyon potansiyelinden dolayı DHLA, E vitamini ve glutatyon gibi endojen antioksidanları rejenere etme yeteneğine sahiptir. Dihidrolipoik asit, GSSG'yi GSH'a indirgeme yeteneğine sahip, oldukça reaktif bir tiyoldür [67]. Askorbatı rejenere edebilir. Ayrıca lipoik aside benzer şekilde radikal süpürücü ve metal kelatlayıcı rol oynar.

Lipoik asidin GSH'a göre en önemli avantajı, lipoik asidin gıdalardan hızlıca absorbe edilebilmesi ve çoğu hücre tarafından kullanılabilmesidir. Halbuki GSH'ın çoğu doku tarafından kullanılmadan önce parçalanması ve yeniden sentezlenmesi gerekmektedir [68]. LA ve DHLA'nın antioksidan aktivitelerinin iyi olduğu bilinir. Sadece doğrudan serbest radikal süpürücü olarak değil, dolaylı olarak diğer hücresel antioksidanların rejenerasyonunda etkilidirler [67].

2.2.6.4. Sistein

Glutasyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar açısından önemlidir [53]. Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında önemli rolü olan GSH'ın sentetik bir ön maddesidir [58].

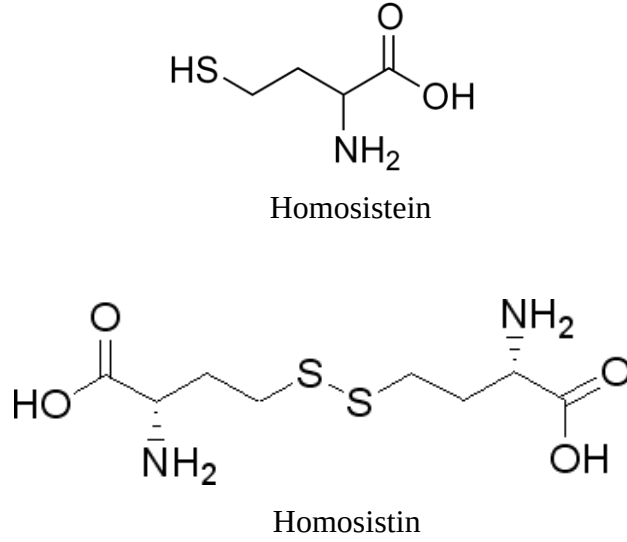
Sülfidril grubu içeren bir aminoasit olan sisteinin dokulardaki miktarı diğer aminoasitlerin miktarından daha azdır. Sisteinin oksijene karşı olan kendine has reaktivliği ve tehlikeli reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla birlikte yürüyen sisteinin sistine yükseltgenmesi, dokudaki sistein miktarının düşük olmasının nedenidir. Sistein, hem reaktif oksijen süpürücü hem de reaktif oksijen kaynağı olabilir [69].



Şekil 2.12: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı.

2.2.6.5. Homosistein

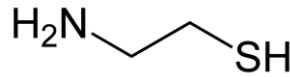
Tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden bir diğeri olan homosistein, temel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasında oluşan bir ara üründür [70]. Homosisteinin yükseltgenmiş hali homosistindir. Homosistin ve protein bağlı homosistein gibi homosisteinin yükseltgenmiş formlarını içeren toplam plazma homosisteinindeki artış kalp rahatsızlıklarında başlı başına bir risk faktörüdür. Toplam plazma homosisteini düzeyindeki azalma damar tıkanıklığı hastalığının azalmasında tedavi edici bir etki gösterebilir. Homosisteinin kalp rahatsızlıklarına neden olduğu patolojik mekanizma hala bilinmemektedir. Bu nedenle biyolojik örneklerdeki bu tiyol bileşikleri ve bunların disülfürlerinin tayin edilmesi gereklidir [70].



Şekil 2.13: Homosistein ve homosistin kimyasal yapısı.

2.2.6.6. Sisteamin

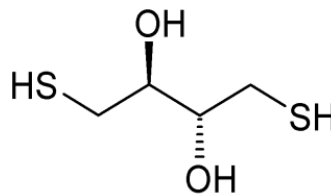
Sisteamin (2-aminoethanthiol), koenzim A (CoA)'nın bozunmasıyla oluşur [71]. Sisteamin memeli hücrelerinde bulunan doğal bir üründür ve farmakolojik olarak yararlı olduğu görülmüştür [72]. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu şizofreni hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [73]. Ayrıca sisteamin, oksidatif strese karşı korunmada anahtar rol oynayan glutatyon miktarını artırır [74].



Şekil 2.14: Sisteaminin kimyasal yapısı.

2.2.6.7. 1,4-Ditiyoeritritol

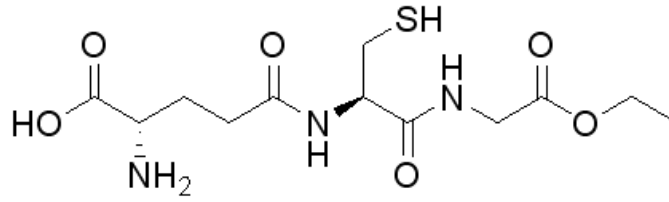
1,4-ditiyoeritritol (DTE) de, tiyol grubu içeren önemli antioksidan bileşiklerden biridir. Genellikle enzim çözeltilerinin hazırlanması sırasında oksidatif hasarı engellemek amacıyla koruyucu antioksidan olarak kullanılmaktadır [75].



Şekil 2.15: 1,4-ditiyoeritritolün kimyasal yapısı.

2.2.6.8. Glutatyon Etil Ester

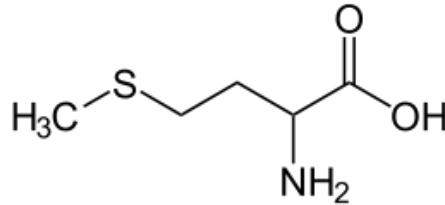
Glutatyon etil ester (GSHEE), glutatyon biyosentezinde bir ön maddedir ve glutatyon düzeyini artırır. Erken evrede diyabetik kataraktın ilerlemesini engeller. Katarakt, göz merceğindeki proteinlerin yükseltgenmesiyle oluşur ve GSHEE içeren göz damlası kullanımı göz merceğindeki glutatyon düzeyini artırdığından kataraktın ilerlemesi engellenir [76]. Glutatyon esterlerinin antioksidan etkileri ‘*in vivo*’ [77] ve ‘*in vitro*’ [78] koşullarda olmak üzere birçok çalışmada gösterilmiştir.



Şekil 2.16: Glutatyon etil esterin kimyasal yapısı.

2.2.6.9. Metiyonin

Serbest tiyol grubu değil, fakat Me-S- grubu içeren antioksidan bileşiklerden bir diğeri de metiyonindir [52]. Kükürt içeren bir amino asit olan metiyonin vücudumuzda sentezlenemez. Bu nedenle besin yoluyla vücuda alınmak zorundadır [79].



Şekil 2.17: Metiyoninin kimyasal yapısı.

2.2.7. Selenyum

Selenyum, vücudun en önemli antioksidan enzimi olan glutatyon peroksidazın (GSH-Px) bir komponenti olması nedeniyle, lipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin yıkımında önemli rol oynar. Böylece, hücre zarlarının bütünlüğünün sağlanması ve korunmasında etkin fizyolojik bir görev üstlenir. Selenyum biyolojik bir siklusla topraktan bitkilere, hayvanlara ve insanlara geçer. Organizmada eser miktarda bulunduğu için dışardan alınması gerekmektedir. Selenyum, bitkilerde selenometionin, Se-metil-selenometionin, selenosistin ve selenosistein, hayvan dokularında ise genellikle selenometiyonin ve selenosistein olarak bulunur [80].

Yüksek konsantrasyonlarda toksik olan bu ametalin eser element olarak düşük konsantrasyonları vücut için esansiyeldir. Vücudumuzda birçok enzimin kofaktörüdür ve temel olarak antioksidan fonksiyonuyla bilinen esansiyel bir iz elementtir. Selenyum, insanlarda organizmayı oksidatif hasarlardan koruyan glutatyon peroksidazların (GPx), iototiroin deiyodinazların, tiyoredoksin redüktazın ve selenoprotein P'nin de dahil olduğu pek çok metabolizmada rol oynamaktadır [81].

2.2. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki süstitüentlerin yerleşimi itibarıyla antioksidan aktiviteleri, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu aktiviteden daha yüksek olabilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür [82,83].

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



Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır:

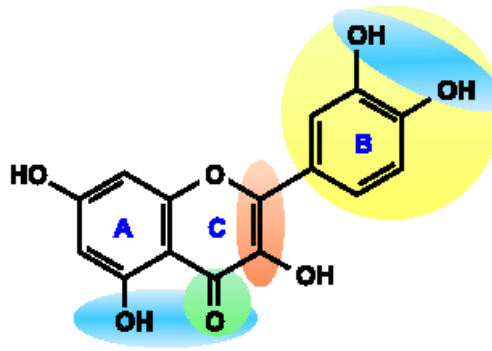
- B halkasındaki o-dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyonundaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)

Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır [46].

B halkası hidroksil konfigürasyonu; reaktif oksijen (ROS) ve reaktif azot (RNS) türlerinin süpürülmesinde en önemli öğedir. B halkasındaki hidroksil grupları; hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen ve elektron vererek onları kararlı hale getirirler [82].

B halkasındaki 3',4'-kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır [84]. Bu yerleşim çoğu antioksidanın en göze çarpan özellikleridir. Örneğin luteolin kaemferol'den daha güçlü antioksidan kapasitesine sahiptir. Her ikisi de benzer hidroksil sayısına sahip olmalarına rağmen kaemferol B halkasındaki kateşol yapısından yoksundur. Kateşinin radikal süpürme yeteneği çoğunlukla bu kateşol yapısına sahip olmasından kaynaklanır. Kateşol veya pirogallol sistemlerinden yoksun flavonlar kararsız radikaller oluşturur ve zayıf süpürücülerdir [83,85].

Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler radikallere karşı daha etkilidirler. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [47]. Şekil 2.18'de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya orto-dihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı, yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonel gruplar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transisyon metallerini kelatlama yeteneği sağlar [86].

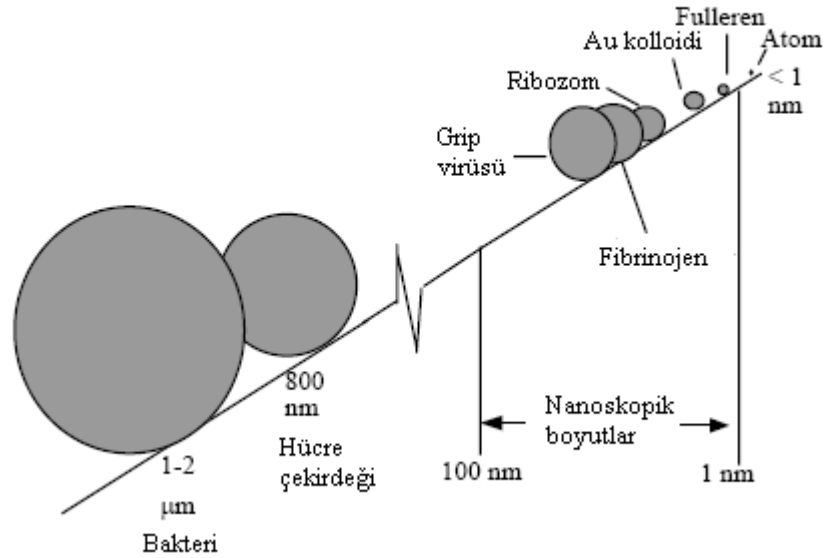


Şekil 2.18: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.

2.3. NANOTEKNOLOJİ

Son yıllarda araştırma ve geliştirme çalışmalarında gittikçe küçük ve daha küçük yapılara doğru bir eğilim olmuştur. 80'li yılların ortalarında başlayan ve 90'lı yıllarda ivme kazanan bu eğilim genel olarak “nanoteknoloji” adı altında özetlenebilir.

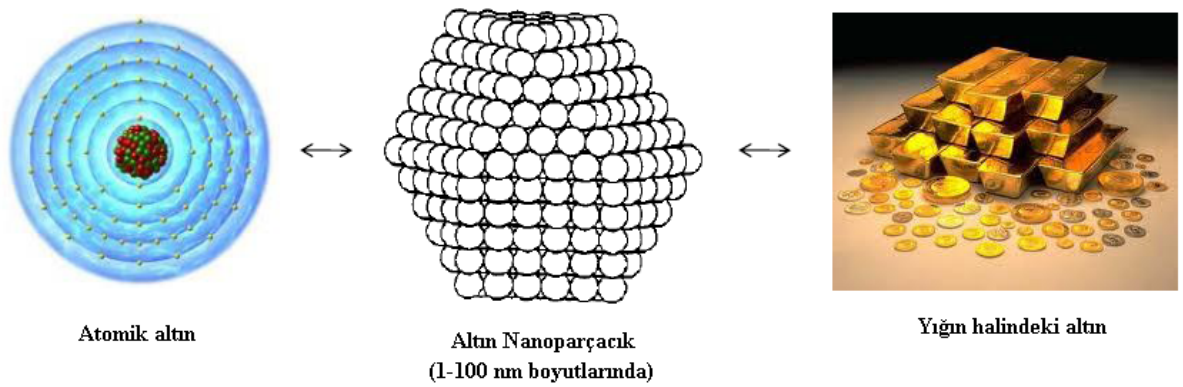
Nanoteknoloji, maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol etme bilimidir. Maddeler boyutlarına göre geniş bir kategoride yer alırlar. Makroskopik maddeler çıplak gözle görülebilir. Bakteri ve hücreler gibi mezoskopik parçacıklar ise yaklaşık olarak mikronlarla ifade edilebilecek boyuttadır [87]. 1 atom yaklaşık olarak 1 angstrom veya 10^{-10} metre olarak ölçülür. 1 nanometre (1 nm) veya 10^{-9} metre, birkaç atom veya molekülün bir araya gelmesiyle oluşan ölçü olarak ifade edilebilir [15]. Şekil 2.19'da nanoparçacıkların diğer küçük parçacıklara göre boyutları kıyaslanmıştır [87].



Şekil 2.19: Küçük parçacıkların boyut olarak karşılaştırılması.

Nanoteknoloji, 1-100 nm aralığındaki nanometre boyutlarında gerçekleşen işlemlerle ilgilidir. Mikrometre boyutlarında ve daha büyük boyutlarda yığın halindeki malzemelerin özellikleri, katı hal fizikçileri ve malzeme bilimcileri tarafından yıllardan beri çalışılmaktadır ve günümüzde çok iyi bir şekilde anlaşılmıştır. 1-100 nm boyutlarındaki malzemelerle ilgili geçmişte herhangi bir grup tarafından çalışılmamıştır. Son çalışmalar göstermiştir ki bu boyut skalasındaki bir malzemenin özellikleri boyut

ve şekline bağlıdır. Nanometre skalası (1-100 nm) atom veya molekülleri toplu halde içine alır. Bu boyuttaki maddenin özellikleri ne bu maddeyi oluşturan bireysel bileşenlerin ne de yığın haldeki maddenin özelliklerine benzemez. Bu boyutta atomların çoğu yüzeyde ya da yüzeyden bir tabaka uzakta yer alır. Bu boyutta ara yüzeyden dolayı gözlemlenen yeni özellikler, yığın halindeki veya bireysel atomlarda gözlemlenmez. Özellikler malzemenin doğası yerine yapısının boyutuna bağlı olduğundan tek bir malzeme kullanılarak güvenilir ve devamlı bir değişim sağlanabilir. Şekil 2.20’de atomik altın, altın nanoparçacık ve yığın halindeki altının gösterimi verilmiştir.

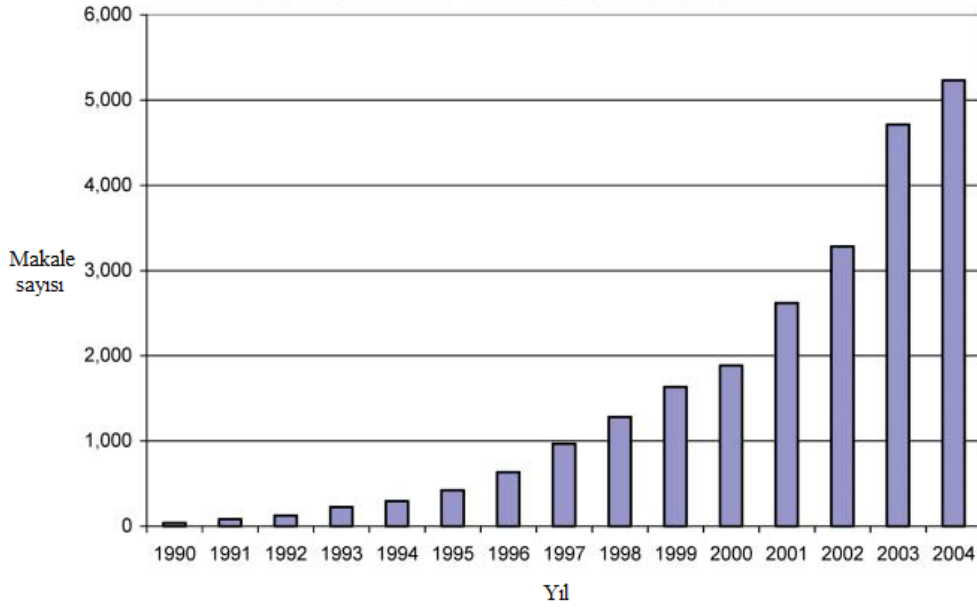


Şekil 2.20: Atomik altın, altın nanoparçacık ve yığın halindeki altının karşılaştırılması.

Nanometre skalası aynı zamanda biyolojik sistemlerle de alakalıdır [88,89]. Proteinlerin çoğu yaklaşık 10’larla ifade edilen nanometre boyutlarındadır. Yapılar nanometre boyutunda hazırlandığında benzer boyutları nedeniyle biyolojik sistemlere katılabilir. Biyolojik sistemler sentezleri, yapıları ve fonksiyonlarının detaylı olarak bütünüyle anlaşılabilirdiği zor, karmaşık sistemlerdir. Biyolojik moleküllerle benzer boyutta yapılar dizayn edilmesi biyolojik sistemlerin modifiye edilmesini ve prob özelliği kazanmasını sağlar. Ayrıca biyolojik sistemler belirli boyut ve fonksiyonlara sahip nanomateriyaller hazırlamak için kullanılır. Nanoyapılar, ilaç taşıyıcı ajanlar, etiketleme ajanları ve sensörler olarak kullanılmaktadırlar [15] .

Nanoteknoloji alanı son 20 yılda artan bir şekilde ilgi çekmiştir. Altın ve gümüş nanoparçacıklarla ilgili yayınların sayısı Şekil 2.21’de görüldüğü gibi katlanarak artmıştır. Yapılan çalışma sayısındaki bu artış, nano boyuttaki materyallerin yeni ve değişen özelliklerinden kaynaklanmaktadır. İstenen boyut, şekil ve dağılımda

nanoparçacıklar oluşturulmasındaki zorluk nedeniyle yeni ve hassas tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır [15].



Şekil 2.21: 1990’den itibaren altın ve gümüş nanoparçacıklar ile ilgili yayınlanan makale sayısındaki değişim.

2.3.1. Nanoyapılar

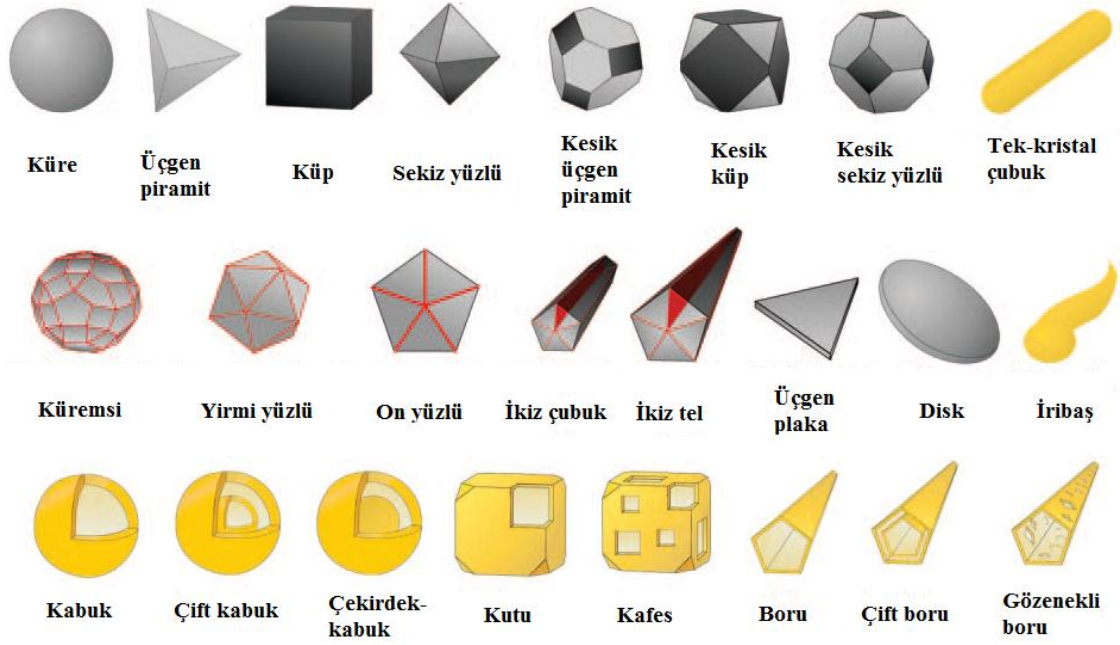
Nanoyapılar – en az 1-100 nm arasında bir boyuta sahip yapılar – yığın halindeki malzemelerden daha üstün ve olağanüstü özelliklere sahip olduğundan dolayı artan şekilde ilgi çekici hale gelmiştir [90]. Nanoyapılı malzemelerle ilgili günümüzde birçok terim kullanılmaktadır.

Nanoparçacık: Bir nanoparçacık (NP), 0.5-100 nm aralığında boyutlara sahiptir.

Nanokristal: Nanometre boyut aralığında tek bir kristal katı parçacıktır.

Nanoyapılı ya da nano boyutlu malzemeler: Bir nano boyutlu malzeme, nanometre boyut aralığında herhangi katı bir malzemedir; üç boyutlu olanlar (parçacıklar), iki boyutlu olanlar (ince filmler) ve tek boyutlu olanlar (ince teller) [91].

Geliştirilen yöntemlerle boyut ve şekillerinin kontrol edilebildiği farklı özelliklere sahip nanoyapılar sentezlenebilmektedir (Şekil 2.22). Üst sıradaki şekiller tek kristallerdir. İkinci sıradaki şekiller düzensiz dizilişteki parçacıklardır. Üçüncü sıradaki şekiller ise kabuk ve boru şeklindeki nanoyapılı malzemelerdir [92].



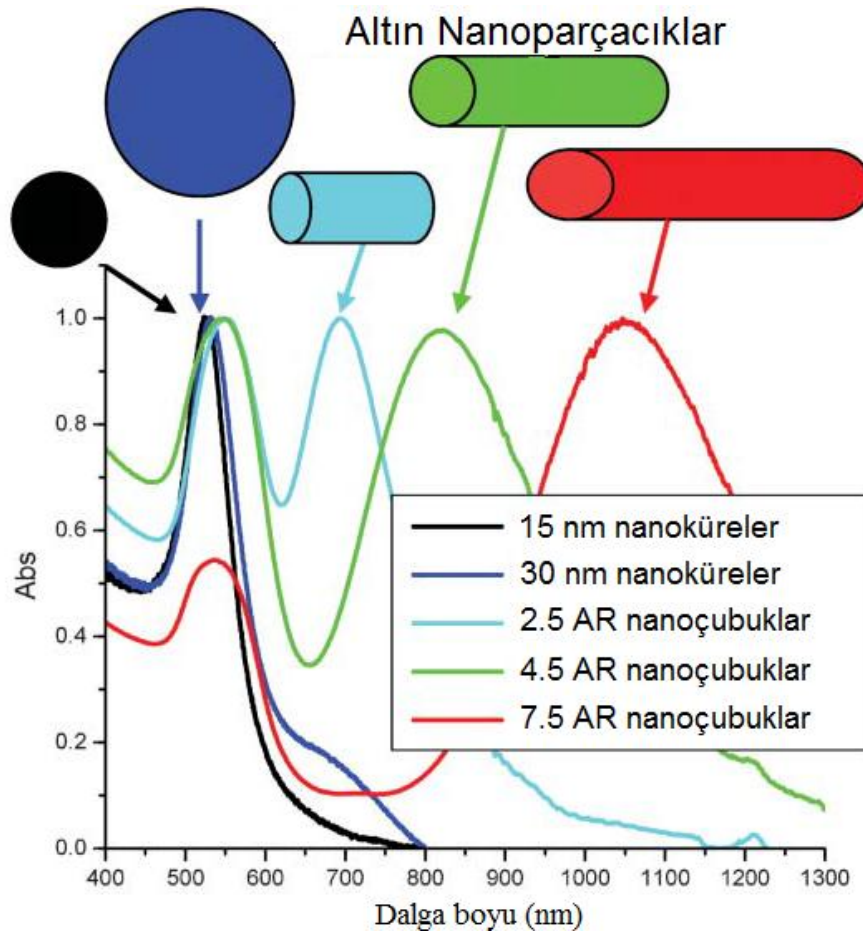
Şekil 2.22: Nanoyapı şekillerinin şematik olarak gösterimi.

2.3.2. Soy Metal Nanoparçacıklar

Boyutu 100 nanometrenin (nm) altında olan nanoparçacıklar, hacimsel yapı malzemelerden daha farklı ve üstün olarak kabul edilen özellikler sergilemektedirler. Nano yapı nanoparçacıklar gösterdikleri üstün özellikler sayesinde elektrik, elektronik, biyomedikal, otomotiv ve kimya sektörleri başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanıma sahiptirler. Sıkça belirtilen nanoparçacık özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapının boyuta bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır [93].

Soy metal nanoparçacıklar ve bunların yüzey plazmon rezonans absorpsiyonundan kaynaklanan parlak renkleri geniş bir araştırma alanı oluşturur. Nanoparçacığın rengi, nanoparçacığın boyutuna, şekline ve bunların etrafını çevreleyen ortamın dielektrik sabitine bağlıdır. Nanoparçacığın boyutu veya şekli değiştiğinde gözlenen renk değişir. Altın küreler karakteristik bir kırmızı rene sahipken gümüş küreler sarı renklidir. Son çalışmalar göstermiştir ki renk, yüzey plazmon titreşimi olarak bilinen iletim bandındaki elektronların kolektif osilasyonundan kaynaklanmaktadır [15]. Osilasyon frekansı, altın ve gümüş için genellikle güçlü yüzey plazmon rezonans

absorpsiyonuna neden olur. Şekil 2.23'te farklı şekil ve boyutlardaki altın nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumları gösterilmiştir. Metal nanoparçacıklar büyüdüğü zaman, Şekil 2.23'te altın nanokürelerin farklı örneklerinde görüldüğü üzere optik özellikler çok az değişir. Fakat nanoparçacığa anizotropi eklendiği zaman nanoçubukların büyümesinde olduğu gibi, nanoparçacıkların optik özellikleri çok kuvvetli bir şekilde değişir [15].



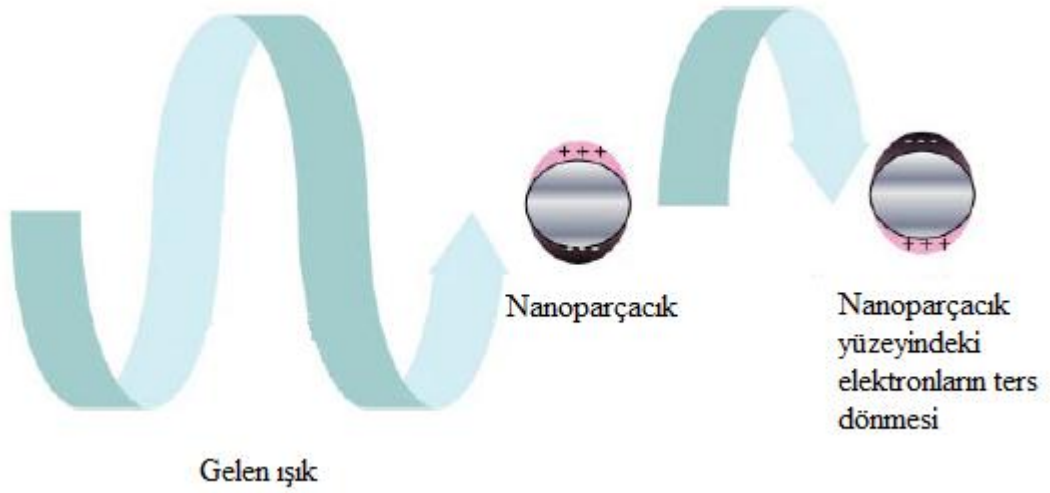
Şekil 2.23: Farklı şekil ve boyutlardaki altın nanoparçacıkların absorpsiyonu.

2.3.3. Soy Metal Nanoparçacıklarda Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

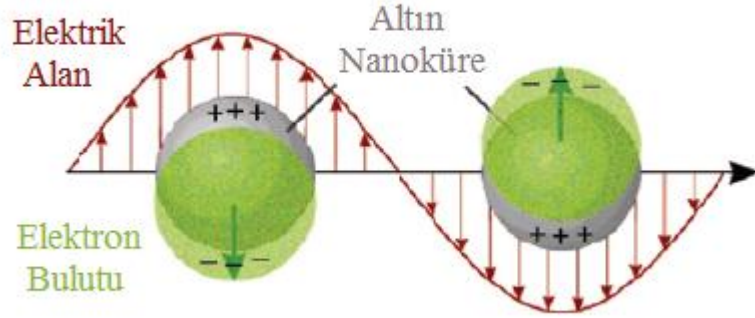
Plazmonik davranış, bir metaldeki (ya da katkılanmış yarı iletkendeki) iletim elektronlarının kolektif osilasyonu olarak tanımlanan fiziksel bir kavramdır [89]. Metallerin çoğu (alkali metaller, Mg, Al ve Au ve Ag gibi soy metaller), elektronik ve optik özellikleri sadece iletim elektronlarıyla belirlenen serbest elektron sistemleri

olarak görülebilir. Drude-Lorentz modelinde böyle bir metal, eşit sayıda pozitif iyon (sabit pozisyonunda) ve iletim elektronu (serbest halde ve oldukça hareketli) içerdiğinden plazma olarak ifade edilir. Elektromanyetik dalga ışıması altında serbest elektronlar, bir plazma frekansında tutarlı bir şekilde salınım yapmak üzere elektrik alan tarafından harekete geçirilirler. Kuantize plazma osilasyonları plazmon olarak adlandırılır. Metal yüzeyini etkileyen bir elektromanyetik dalga belli bir nüfuz etme derinliğine sahip olduğundan (Ag ve Au için 50 nm'nin altında), sadece yüzeydeki elektronlar önem teşkil eder. Bu elektronların kolektif osilasyonları yüzey plazmon polaritonları (SPPs) olarak isimlendirilir fakat çoğunlukla yüzey plazmonları (SPs) olarak ifade edilir [92].

Nanoparçacık boyutundan daha büyük bir dalgaboyunda ışıma geldiğinde rezonans olayı meydana gelir (Şekil 2.24) [15]. Yüzey plazmon osilasyonu ile birlikte rezonanstaki ışık metaldeki serbest elektronların osilasyonuna neden olur. Rezonans olayı, absorpsiyon ve saçılma spektroskopisiyle belirlenir ve şekil, boyut ve hem metal hem de etrafındaki malzemenin dielektrik sabitine bağlı olarak bulunur. Bu olay yüzeyde meydana geldiği için yüzey plazmon rezonansı olarak (SPR) ifade edilir [15]. Bu olayın bir örneği olan ışıkla altın nanoparçacığının elektronları arasında meydana gelen etkileşim Şekil 2.25'te gösterilmiştir. Meydana gelen bu olayda, parçacık gelen ışığın dalga boyundan çok daha küçük olmalıdır. Gelen ışığın elektrik alanı, delokalize elektronların metal nanoparçacıktan uzakta bir doğrultuda yer değiştirmesiyle metal nanoparçacıkta bir elektrik dipole neden olur ve böylece bir kenarda net negatif bir yük oluşur. Negatif yükün karşısındaki kenar net pozitif bir yüke sahiptir [92].



Şekil 2.24: İletim bandındaki elektronlar ile ışığın etkileşiminden kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı.



Şekil 2.25: Bir elektromanyetik alan etkisi altında altın nanoparçacığındaki serbest elektronların kolektif osilasyonunun şematik gösterimi.

Nanoparçacığın çevresindeki malzemenin dielektrik sabitinin değişmesi, nanoparçacıklardan yük yoğunluğunu sağlayarak yüzeyin değişebilmesi nedeniyle osilasyon frekansını etkileyecektir. Çözücünün değişmesi dielektrik sabitini değiştirecektir fakat kaplama malzemesi plazmon rezonansındaki kaymanın belirlenmesinde en önemli etkidir. Kimyasal olarak bağlı moleküller, yüzey plazmon absorpsiyon maksimumunda bir kaymaya neden olan yüzeydeki elektron yoğunluğunda meydana gelen değişimin gözlenmesiyle tayin edilebilir. Bu ise soy metal nanoparçacıkların hassas sensörler olarak kullanılmasında esastır [15].

2.3.3.1. Yüzey Plazmon Bandı

Drude modeli ve Mie teorisi yüzey plazmon bandının ve bu bandın pozisyonu, şiddeti ve genişliğini belirleyen faktörlerin tanımlanmasında kullanılır [94,95]. Işığın küresel metal parçacıklarla etkileşimleri Mie teorisiyle tanımlanabilir. Bu teori aynı zamanda kolloidal metal parçacıklar üzerine uygulanan ışığın bir kısmının absorbe edileceğini ve bir kısmının da saçılacağını öngörür. Absorpsiyon ve saçılmanın toplamı, yüzey plazmon bandı (SPB) veya plazmon absorbansı olarak bilinen ışığın absorpsiyonudur [95]. Yüzey plazmon absorbansının şiddeti, parçacık boyutuna bağlı band genişliğine ve bandın pozisyonuna bağlıdır.

2.3.3.2. Yüzey Plazmon Absorpsiyonuyla Tayin

Soy metal nanoparçacıklar, lokalize yüzeye duyarlı spektral cevap verebilmesi, ışık sinyalinin gözlemlenebilme kolaylığı ve güçlü ışık saçılması ve absorpsiyonundan kaynaklanan yüzey plazmon absorpsiyonları sayesinde kimyasal ve biyolojik tayinlerde birçok uygulama alanı bulmuştur [92]. Rezonans dalgaboyundaki ilgili kayma olarak tanımlanan spektral duyarlılık, yüzey plazmon absorpsiyonunun pozisyon ve genişliğine ayrıca metalin cinsine ve parçacıkların şekline bağlıdır. Gümüş, altına göre yüzeyin çevresine karşı daha duyarlıdır. Nanoçubuklar ise nanokürelerden plazmon absorpsiyon bandlarının daha kuvvetli ve keskin olması açısından daha iyidir [92,96].

Altın nanoparçacıklar, yüzey plazmon absorpsiyonları nedeniyle belirli hedef moleküllerin tayininde kolorimetrik sensör olarak kullanılmaktadır.

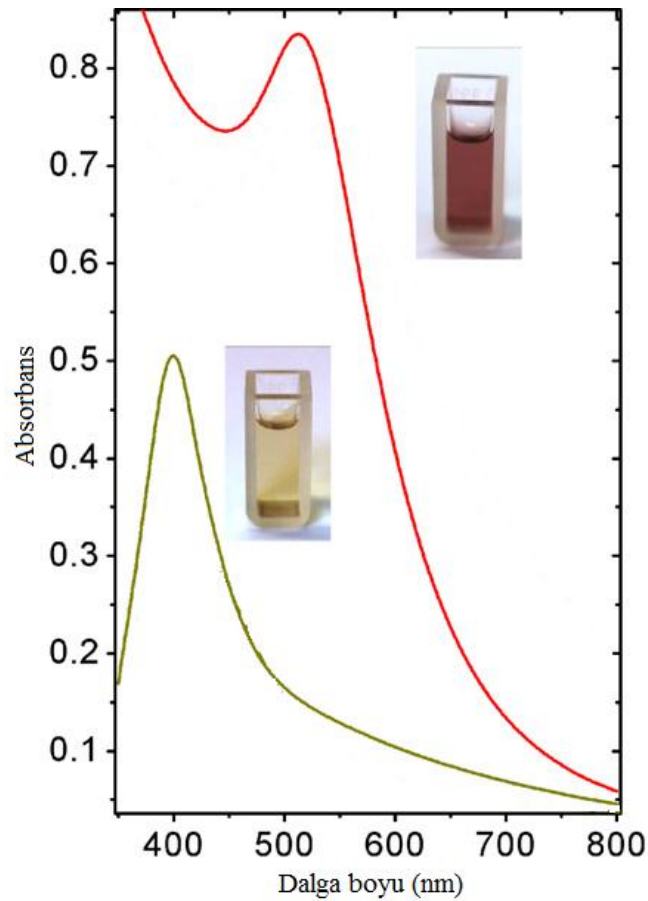
2.3.4. Gümüş ve Altın Nanoparçacıklar

2.3.4.1. Gümüş ve Altın Nanoparçacıkların Optik Özellikleri

Metal nanoparçacıkların lokalize yüzey plazmon rezonansı, iletim bandındaki elektronlar ile elektromanyetik ışıma arasındaki etkileşimle elektronların kolektif osilasyonuna neden olur ve bu şekilde nanoparçacıkların optik özelliklerindeki değişimden sorumludur [97,98].

Bir fiziksel parçacık olan elektronun belirli çerçevedeki uygulama/kullanım alanına elektronik denildiği gibi, yine elektromanyetik radyasyonun partiküler karakter sergilediği için bir parçacık olarak ele alınan kuantumu yani fotonunun belirli

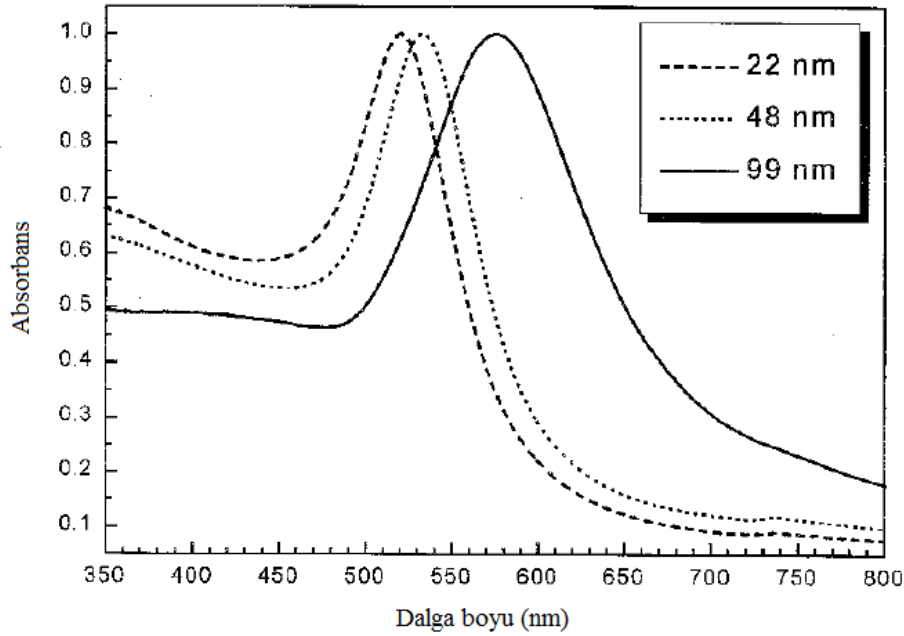
çerçevedeki kullanım/uygulama alanları fotonik olarak adlandırılabilir. Fotonik bilimi, ışığı oluşturan fotonların üretilmesi, yönlendirilmesi, madde ile olan etkileşimi, taşınması ve algılanması ile uğraşan bir bilim dalıdır. Fotoniklerin nanoteknolojiyle birleşmesi nanofotonikleri oluşturur. Nano boyutlu malzemeler, lineer ve lineer olmayan optik özellikler ve yüzey plazmon eksitasyonları gibi ışığı enerjinin diğer formlarına dönüştürebilen özelliklerinden dolayı fotoniklere yeni özellikler kazandırır. Bu nedenlerle altın ve gümüş nanoparçacıklar nanofotoniklerde anahtar rol oynayan malzemelerdir. Metalik doğasından dolayı altın ve gümüş nanoparçacıklar, kolaylıkla polarize olabilen çok sayıda elektrona sahiptir. Bu elektronlarla ışığın etkileşimi sonucu yüzey plazmon absorpsiyonu meydana gelir. Gümüş (sarı renkli) ve altın nanoparçacıkların (kırmızı renkli) yüzey plazmon absorpsiyonu sırasıyla 400 ve 520 nm dalgaboyu civarındadır (Şekil 2.26) [99].



Şekil 2.26: Gümüş ve altın nanoparçacıkların yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu.

Yüzey plazmon absorpsiyonunun şiddeti, nanoparçacıkların boyutuna, şekline, eş büyüklüklü dağılımına, nanoparçacığı çevreleyen ortamın bileşimine ve nanoparçacıklar ile stabilize edici ligandlar arasındaki etkileşime bağlıdır [100-102].

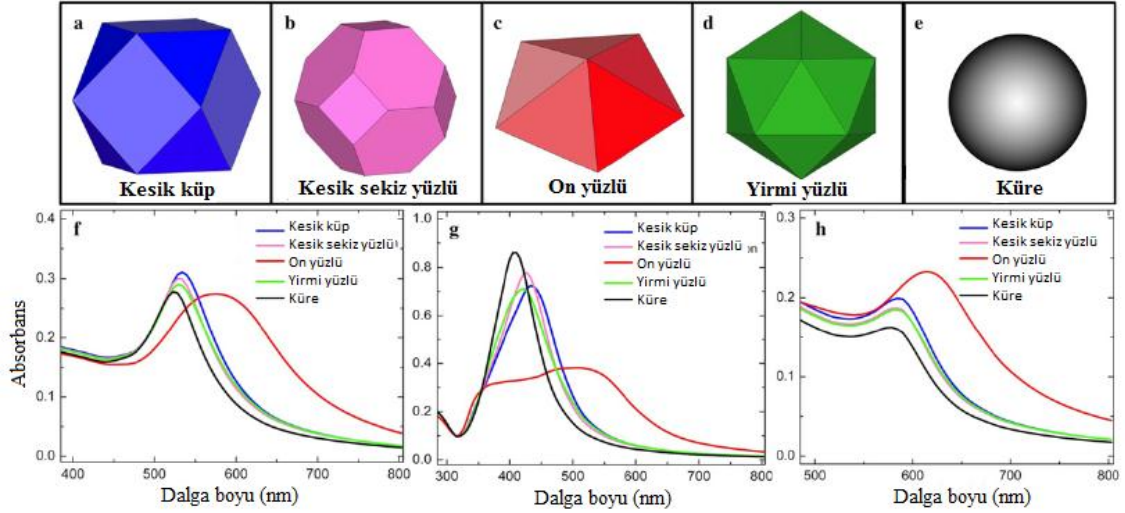
i-) *Parçacıkların boyutu:* Şekil 2.27’de farklı çaplarda küresel altın nanoparçacıkların yüzey plazmon bandları görülmektedir. Buna göre, parçacık boyutu arttığında plazmon band frekansı azalır veya daha uzun dalga boylarına kayar. 20 nm’den daha küçük çaplı altın nanoparçacıklar gibi küçük parçacıklar için ışığın şiddetindeki azalma daha çok absorpsiyondan kaynaklanır. Daha büyük parçacıklar ise daha güçlü saçılma meydana getirmeye eğilimlidir [103].



Şekil 2.27: 22, 48 ve 99 nm çaplarında küresel altın nanoparçacıkların yüzey plazmon bandları.

ii-) *Parçacıkların şekli:* Farklı şekillerdeki nanoparçacıklar farklı plazmon özelliklerine sahiptir [102]. Şekil 2.28’de kesik küp, kesik sekiz yüzlü, on yüzlü, yirmi yüzlü ve küre şeklindeki altın, gümüş ve bakır nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumları görülmektedir. Altın, gümüş ve bakır nanoparçacıkların kesik küp, kesik sekiz yüzlü ve yirmi yüzlü şeklindeki yapıları küresel yapılarıyla karşılaştırıldığında absorpsiyon spektrumlarında hafif kaymalar gözlemiştir. On yüzlü yapıdaki nanoparçacıklarda ise çok daha büyük bir kırmızıya kayma meydana gelmiştir. Şekil 2.28’de görüldüğü gibi

nanoparçacıkların şekilleri küresel yapıdan uzaklaştıkça (on yüzlü nanoparçacıkta olduğu gibi) plazmon pikinde kırmızıya doğru kayma olmaktadır [104].

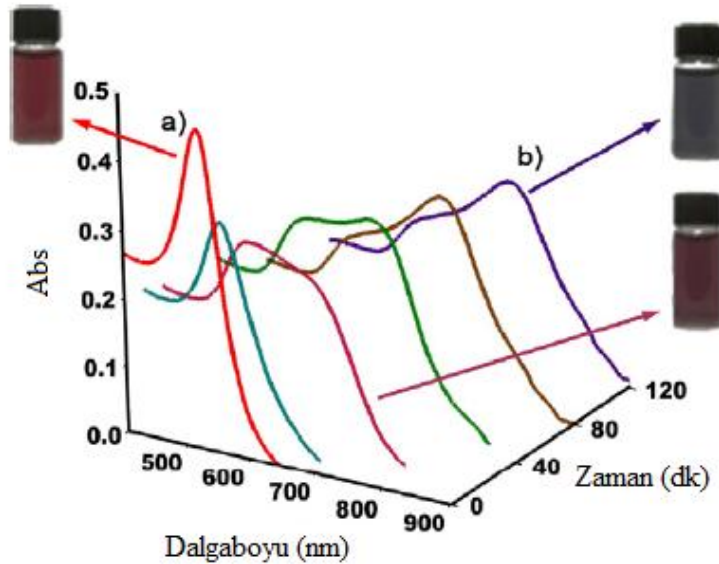


Şekil 2.28: (a) Kesik küp, (b) kesik sekiz yüzlü, (c) on yüzlü, (d) yirmi yüzlü, (e) küre şeklindeki (f) altın, (g) gümüş ve (h) bakır nanokristallerinin absorpsiyon spektrumları.

iii-) *Parçacıkların agregasyonu:* Metal nanoparçacıkların agregasyonu, daha düşük plazmon frekanslarına ve plazmon absorpsiyonunda daha uzun dalgalı boylarına kaymaya neden olur [105]. Örneğin suda hazırlanan gümüş nanoparçacıkların (10-14 nm) karakteristik plazmon absorbansı 400 nm'ye yakın bir dalga boyundadır. Gümüş nanoparçacıkların agregasyonu nedeniyle plazmon absorbansının şiddetinde bir azalmayla birlikte nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon yaptığı yeni dalga boyu 525 nm olarak belirlenmiştir [106].

Altın nanoparçacıkların agregasyonu, hedef moleküllerin tayininde kullanılabilen altın nanoparçacıkların optik özelliklerinde değişime neden olur (yüzey plazmonlarında kırmızıya kayma veya gözle görülebilecek kırmızı-mavi renk değişimi) [107]. Şekil 2.29 altın nanoparçacıkların yüzey plazmon bandını (SPB) yansıtır ve 520 nm civarında görünür bölgede geniş bir absorpsiyon bandı verir. SPB gelen ışığın elektromanyetik alanıyla ilişkili olarak nanoparçacıkların yüzeyindeki elektronların oluşturduğu titreşimden kaynaklanır. SPB çalışmaları hem bilimsel hem de teknolojik alanda cazip araştırma alanları oluşturmaktadır. Au-NP'lerin fonksiyonel organik moleküllerle yüzey

etkileşimi yüzey plazmon band frekansında (veya dalgaboyunda) kaymalara neden olmaktadır [107]. Altın nanoparçacıklara bağlanan moleküllerin analit molekülleriyle kısmen veya tamamen yer değiştirmesi sonucu yüzey potansiyeli düşer ve agregasyona sebep olur. Au-NP'lerin optik özelliklerindeki değişimden yararlanılarak kolorimetrik sensör uygulamaları gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.29'da Au-NP'lerin agregasyonundan kaynaklanan yüzey plazmon bandlarındaki spektral değişimler görülmektedir. Agregasyon intensitede (şiddette) bir azalmaya ve ~ 520 nm'de karakteristik SPB'de kırmızıya kaymaya neden olur. Ayrıca agregasyon devam ederse ~ 720 nm'de lokalize SPB gözlenir ve bu spektral değişimlerle çözeltideki renk değişimi kırmızıdan maviye doğru kayar [107].



Şekil 2.29: Renk değişimi, UV-vis absorpsiyon spektrumunda lokalize yüzey plazmon bandlarının görünümü [107].

iv-) Metal Nanoparçacıkları Çevreleyen Ortam: Metal nanoparçacıkların etrafını saran ortamın kırılma indisi yüzey plazmon bandlarının frekansını etkiler. Genellikle ortamın yüksek kırılma indisi düşük plazmon frekansı meydana getirir [100].

2.3.4.2. *Sentezi*

Metal nanoparçacıkların hazırlanmasında kimyasal ve fiziksel birçok teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler arasında bir indirgeyici ajan kullanarak kimyasal indirgeme, elektrokimyasal indirgeme, fotokimyasal indirgeme ve ısıtarak buharlaştırma gibi teknikler vardır. Nanoparçacıklar yüksek bir enerji kullanılarak bir metal yüzeyinden atomların buharlaştırılmasıyla oluşturulabilir [108].

Metal nanoparçacıkların sentezlenmesinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Nano boyutta malzemeler oluşturmak için iki genel strateji vardır: Aşağıdan yukarı (Bottom up) ve Yukarıdan aşağı (Top down) yöntemler [89]. Aşağıdan yukarı yönteminde iyonların indirgenmesiyle üretilen atomlar bir araya gelerek nano yapıları oluştururlar. Yukarıdan aşağı yönteminde ise hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır. Yaygın olarak kullanılan yukarıdan aşağı teknikleri fotolitografi ve elektron ışın litografisidir. Fotolitografi, var olan ışının dalgaboyuna bağlı olduğundan 60 nm civarında nanoyapıların oluşumuyla sınırlıdır. Bu yöntemde daha kısa dalgaboylu ışınların üretildiği yeni teknikler geliştirilerek daha küçük nanoparçacıklar oluşturulabilir. Elektron ışın litografisinde böyle bir sınırlama yoktur ve 10 nm'den daha küçük boyutlu nanoyapılar üretilebilmektedir. Fakat bu cihaz pahalıdır. Bu tekniklerle tek aşamada sadece 2 boyutlu yapılar hazırlanabilir.

Bir aşağıdan yukarı tekniği olan nanoküre litografisi, soy metal nanoparçacıklar oluşturmak için kullanılan ucuz, sentetik bir yöntemdir [109]. Nanoküre litografisi, tekrarlama kolaylığı ve yüksek eş büyüklüklü dağılımda nanoparçacıklar hazırlandığından oldukça büyük ilgi oluşturmuştur. Nanoküre litografisi, yüzey plazmon rezonansın absorpsiyon maksimumunun pozisyonuna bağlı sensörler oluşturulmasında kullanılmaktadır. Bu teknik düşük maliyet, üretiminin ve modifiye edilmesinin kolaylığı nedeniyle çok kullanışlıdır [15].

Diğer aşağıdan yukarı teknikleri, kimyasal, elektrokimyasal, termal ve fotokimyasal indirgeme tekniklerini içerir [15]. Aşağıdan yukarı sentez tekniklerinde nano boyuttaki parçacığın büyümesini durdurmak için genellikle bir ajan kullanılır [15]. Bu teknikte

metal nanoparçacıkların agregasyonunu ve çökmesini önlemek için yüzey aktif bir madde ya da polimer gibi kaplama malzemeleri kullanılır. İndirgeme tekniğinin seçimi, süre ve kullanılan kaplama malzemesi sentezlenen nanoparçacıkların boyut ve şeklini belirler. Çeşitli indirgeme teknikleri ve kaplama malzemeleri kullanılarak altın, gümüş ve platin nanoküreler, nanoçubuklar, nanoküpler, diskler, nanoteller, nanotüpler, üçgen prizmalar ve dört yüzü nanoparçacıklar hazırlanmıştır [15].

Altın (III) türevlerinin indirgenmesiyle altın nanoparçacıkların hazırlanmasında en çok bilinen ve kullanılan klasik sentez yöntemlerinden biri, 1951’de Turkevitch tarafından ortaya konan HAuCl_4 ’ün sudaki çözeltisinin sitrat ile indirgenmesiyle oluşan küresel altın nanoparçacık sentez yöntemidir [28]. Bu yöntemle 20 nm civarında altın nanoparçacıklar hazırlanır. Bu yöntemde kullanılan sitrat molekülleri, hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak rol oynar. 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 [29].

1994 yılında geliştirilen Brust-Schiffrin yöntemine göre; dar bir boyut dağılımında çok küçük nanoparçacıklar (1-5 nm) sentezlenmiştir [110]. Bu yöntemle altın nanoparçacıkların sentezinde, altın tuzu öncelikle uygun bir yüzey aktif madde kullanılarak organik faza alınır. Sonra sulu faza sodyum borhidrür ilave edilir. Esas olarak HAuCl_4 (AgNO_3) suda çözünür ve bir faz transfer ajanı olarak kullanılan tetraoktilamonyum bromürle toluen fazına alınır. Toluene çözeltisi karıştırılır ve tiyoalkanlar veya aminoalkanların varlığında sodyum borhidrürün sulu çözeltisiyle birlikte çalkalanır. Bu yöntemde parçacıklar bir altın–tiyol bağı ile stabilize edilir. İki faz yöntemiyle hazırlanan örnekler uzun bir süre kararludur ve kurutulup birçok organik çözücüde tekrar kolayca dağıtılabilir. Bu yöntemle altın nanoparçacıkların sentezinde, altın tuzu öncelikle uygun bir yüzey aktif madde kullanılarak organik faza alınır. Sonra sulu faza sodyum borhidrür ilave edilir. Sodyum borhidrür indirgeyici ajan olarak kullanılmaktadır. Altının yüzey aktif maddeye oranı ve reaksiyon sıcaklığı, parçacık boyutunu ve dağılımını kontrol eder [20].

Çekirdek büyütme yöntemi büyük, küresel ya da küresel olamayan nanoparçacıkların sentezlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte kimyasal bir indirgeme ajanı kullanılır. Öncelikle küçük ve küresel nanoparçacıklar oluşturulur ve sonrasında anizotropik büyüme sağlamak için metal iyonları ve yüzey aktif madde içeren bir büyütme çözeltisine ilave edilir. Çekirdekler sodyum borhidrür gibi kuvvetli bir indirgeme ajanıyla oluşturulur. Büyütme çözeltisinde daha zayıf bir indirgeme ajanı (genellikle askorbik asit) kullanılır. Böylece sadece nanoparçacık yüzeyinde katalizlenmiş indirgeme gerçekleşir [15].

2.3.4.3. Karakterizasyonu

Nanoparçacıklar genellikle boyutları, şekilleri, yüzey alanları ve dağılımlarına göre karakterize edilirler [111]. Bu özelliklerin homojenliği birçok uygulamada önem teşkil etmektedir. Nanoparçacıkların karakterize edilmesinde yaygın olarak kullanılan teknikler şunlardır: 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) [112-114].

UV-görünür bölge spektroskopisi yaygın olarak kullanılan tekniklerdendir [115]. 2-100 nm boyut aralığındaki çeşitli metal nanoparçacıkların karakterize edilmesi için genellikle 300-800 nm dalga boylarında ışık kullanılır [112]. Gümüş ve altın nanoparçacıkların karakterize edilmesinde sırasıyla, 400-450 nm [116] ve 500-550 nm [117] aralığındaki dalga boylarında spektrofotometrik absorpsiyon ölçümleri alınır. Dinamik ışık saçılımı (DLS), yüzey yükünün ve sıvı içinde dağılmış olan parçacıkların boyut dağılımının karakterize edilmesinde kullanılır [111].

Elektron mikroskopisi, yaygın olarak kullanılan bir diğer karakterizasyon yöntemidir [118]. Taramalı elektron mikroskopisi ve geçirimli elektron mikroskopisi, nanometre boyutundan mikrometre boyutuna kadar morfolojik karakterizasyonda kullanılır [119]. Geçirimli elektron mikroskopisi taramalı elektron mikroskopisiyle karşılaştırıldığında 1000 kat daha yüksek rezolüsyona sahiptir [120]. FTIR spektroskopisi yüzey kimyasının karakterizasyonunda yararlıdır [121]. Organik fonksiyonel gruplar (karbonil,

hidroksil gibi) nanoparçacıkların yüzeyine bağlanır ve diğer yüzey kimyasal kalıntıları FTIR kullanılarak belirlenir.

XRD, nanoparçacıkların kristal yapısının karakterizasyonunda kullanılır [122]. X-ışınları nanomalzemenin içine nüfuz eder ve elde edilen kırınım dokusu, yapısal bilgiyi belirlemek için standartlarla karşılaştırılır. Metal nanoparçacıkların elementel bileşimi genellikle enerji dağılımlı spektroskopi (EDS) kullanılarak belirlenir [123].

2.4. SENSÖRLER

Türkçede algılayıcı olarak geçen sensörler örnek içinde tayin edilmek istenen analitin konsantrasyonunu veya aktivitesini ölçmeye yarayan sistemlerdir. Kimyasal bilgi, analitten kaynaklanan kimyasal reaksiyondan ya da araştırılan sistemin fiziksel özelliklerinden elde edilir. Geçtiğimiz yirmi yıl boyunca sensörler alanındaki araştırma geliştirme çalışmaları finansal yatırımlar, bilimsel yayınlar ve aktif araştırmacı gibi bir çok açıdan genişleyerek artmaktadır [124].

2.4.1. Kimyasal Sensörler

Kimyasal sensörler; kimyasal reaksiyon yoluyla seçimli olarak bir dizi analite yanıt veren, nitel ve nicel olarak belirlenmesini sağlayan cihazlardır. Kimyasal sensörler hedef analite karşı duyarlılığı ve seçimliliği arttırmaktadır [125].

Kimyasal sensörler iki basit fonksiyonel birimden meydana gelmektedir. Bunlar alıcı ve dönüştürücü kısımlarıdır.

Kimyasal sensörlerin alıcı kısımları çeşitli prensiplere dayanmaktadır;

- **Fiziksel**; kimyasal reaksiyon olmayan yerlerdir. Tipik örnekleri absorpsiyon, kırılma indisi, iletkenlik, sıcaklık veya kütle değişimine dayanarak ölçülürler.
- **Kimyasal**; analitin girişiminin vermiş olduğu analitik sinyalin yükselmesi ile kimyasal reaksiyon vermesidir.
- **Biyokimyasal**; analitik sinyal kaynağının biyokimyasal işlemidir. Tipik örnekleri mikrobiyal potansiyometrik sensörler veya bağışıklık sensörleridir (immunosensörler). Kimyasallara bir alt grup olarak kabul edilebilirler. Bazı sensörler biyosensörler olarak adlandırılır [126].

Sensörler hakkındaki kimyasal bilgi alıcı kısımlarındaki bir dönüştürücü ile enerji değişiminin ölçülmesi ile verilir. Dönüştürücü kısmı, örnek için yararlı analitik sinyal hakkında enerjinin dönüştürülerek taşınmasını sağlar. Dönüştürücüler aslında seçicilik göstermezler [126].

Dönüştürücü tiplerine bağlı olarak kimyasal sensörleri 4 ana grupta sınıflandırılabilir;

- **Elektrokimyasal Sensörler;** potansiyometrik (iyon seçici elektrotlar ve iyon seçici alan etki transistör (ISFETs ve CHEMFETs)) ve katı elektrolit gaz sensörlerini içeren voltammetrik/amperometrik sensörlerden oluşur. Bunların yanında elektriksel iletkenliğin ölçümüne dayanan yarı iletken gaz sensör elektrokimyasal reaksiyon meydana gelmemesine rağmen elektrokimyasal kimyasal sensör grubuna dahil edilir [125].
- **Optik Sensörler;** optik sensörlerde kimyasal reaksiyonlara ilişkin spektroskopik ölçümler vardır. Optik sensörlerde optiksel liflerin kullanılması yaygın bir özelliğidir. Fiber optikler kliniksel analizler için uygun olduğundan 1997'den beri bu alanda yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Bazı biosensörlerde optiksel ölçümlerden yararlanılır. Absorbans, yansıma ve lüminesans ölçümleri optik farklı tip optik sensörlerde kullanılır [125].
- **Kütleye Duyarlı Sensörler;** piezoelektrik etkisinden yararlanılır ve salınım frekansın kayması olan salınım kristalinin yüzeyindeki kütle değişimine dayanır. Frekans kayma miktarı yüzeyde adsorblanan madde miktarına eşit olur [125].
- **Isıya Duyarlı Sensörler;** bu tip sensörler genellikle kalorimetrik sensörler olarak adlandırılır. Analitin var olduğu bir ortamda gerçekleşen kimyasal reaksiyonun sıcaklığı termistör veya platin termometre gibi transduser ile izlenir. Bu tip reaksiyonlarda yanıcı gaz kullanılır [127].

2.4.1.1. Optik Sensörler

Kimyasal analizler için optik tekniklerin kullanımı oldukça önemli bir yere sahiptir. Günümüzde sensör esasına dayandırılan bu teknikler çevresel görüntüleme, biyomedikal araştırmalar ve endüstriyel proses kontrolleri gibi alanlardaki uygulamalarından dolayı büyük ilgi çekmektedirler. Optik kimyasal sensörler düşük maliyeti, minyatürize edilebilirliği ve mükemmel esnekliği sayesinde yirmi yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Genellikle bu sensörler çeşitli reaktiflerin uygun membranlara

tutturulması ile oluşturulmaktadır. Günümüzde kullanılan mevcut optik kimyasal sensörlerde renk oluşumu immobilize ligand ile metal arasındaki reaksiyondan sağlanmaktadır [128].

Kolorimetrik optik sensörler genellikle, analit için seçici olan reaktif ile analitin reaksiyonu sonucunda meydana gelen belirgin renk değişimine bağlı olarak geliştirilmektedir. Reaktif uygun bir matriks üzerinde tutturulmuş durumda bulunmalıdır. Optik sensörlerde reaktifin tutturulmuş durumda bulunması için kovalent olarak bağlama, reçine ile elektrostatik etkileşme, PVC (polivinil klorür) membranlara dahil edilme ve nasyon filmler tarafından yakalama gibi yöntemler kullanılmaktadır [129].

Nanosensörler: Nanosensörler, nanoteknolojideki son gelişmelerle elde edilen nanoteller, nanotüpler ve nanoküreler gibi yapıların kullanımı esasına dayanan sensör teknolojisinde önemli bir gelişmedir.

Gümüş ve altın nanoparçacıklar yüksek absorpsiyon katsayıları nedeniyle önemli kolorimetrik sensörler olarak kullanılmaktadırlar. Yüzey plazmon piklerinin çevresel değişimlere olan hassasiyeti nedeniyle gümüş yüzeyinde bağlayıcı malzemenin optik olarak tayini sağlanır. Böyle bir optik sensörün hassasiyeti, nanoparçacıkların boyutuna, şekline, yapısına ve nanoparçacıkları çevreleyen ortama güçlü bir şekilde bağlıdır. Örneğin ortamın kırılma indisi değiştiğinde yüzey plazmon pikinin şiddeti ve pozisyonu değişir. Kırılma indisindeki artış çoğunlukla yüzey plazmon pikinin uzun dalgaboylarına kaymasına neden olur. [130,131]

Altın nanoparçacıklar belli hedef bileşiklerin tayininde kolorimetrik sensör olarak kullanılmaktadır [107].

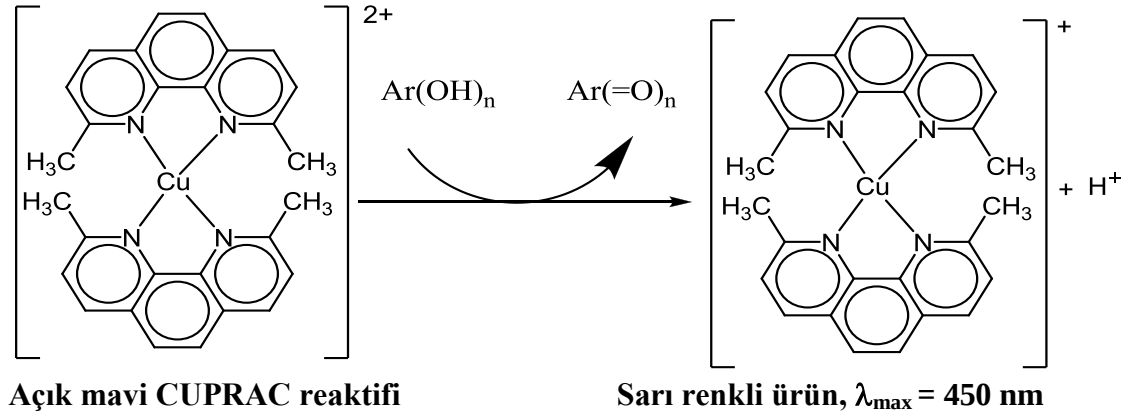
2.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE VE TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ

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

Çalışma grubumuz tarafından kromojenik oksidan olan Cu(II)-neokuproin reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenoller, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) adıyla kazandırılmıştır [132]. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) antioksidan bileşikler varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına (Şekil 2.30) indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidanların antioksidan kapasiteleri ölçülebilmektedir. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite yöntemi 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' kısaca CUPRAC yöntemi olarak adlandırılmıştır.

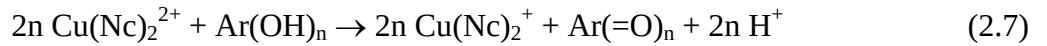
Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 2.30), 450 nm'de maksimum absorbans verir.

Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir.



Şekil 2.30: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)_n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.

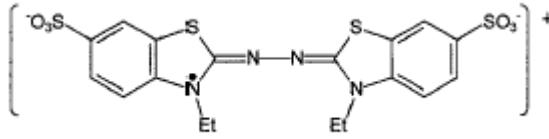
Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin için renk oluşumu hızlı olurken naringin, naringenin gibi yavaş reaksiyona giren antioksidanlar için 50 °C’de 20 dakika inkübasyon işlemi uygulanmaktadır. Flavonoid glikozidlerine % 50 metanol içeren son çözeltide 1.2 M HCl ile hidroliz işlemi uygulanarak, maksimum indirgeme güçlerini daha fazla gösterdikleri aglikonları haline dönüşmeleri sağlanarak yöntem uygulanmıştır. Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir. Troloks (vitamin E’nin suda çözülebilir analogu) antioksidan aktivite için yaygın olarak kabul edilen bir standart olduğundan CUPRAC yöntemi sonuçları troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır. Aşağıda verilen antioksidan bileşiklerin yükseltgenmesi reaksiyonunda antioksidan bileşikler aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler:



n adet reaktif fenolik –OH grubu içeren her flavonoid bu hidroksil gruplarının konumuna ve molekülün toplu konjugasyon derecesine göre yaklaşık 2n-e donör olarak davranır. Troloks, E- ve C- vitaminleri Cu(II)-Nc kelatına karşı 2-e donördür. Bazı polifenollerin troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) teorik olarak n olursa, polifenollerin ilgili molar absorptivite (7.5-8.5 x 10³).2n L mol⁻¹cm⁻¹ olacaktır.

2.5.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve diğ. [133] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorpsiyonunun hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir metoddur. Absorbanstaki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks (E vitamini analogu) cinsinden verilmektedir.



Şekil 2.31: ABTS⁺ katyonunun yapısı.

Orjinal yöntemde ABTS⁺ katyonu metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu sonucu meydana gelen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir. ABTS⁺ radikal katyonunun karakteristik uzun dalgaboylu absorpsiyon spektrumu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum vermektedir [133,134]. Re ve arkadaşları [135] tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde ise ABTS⁺ radikal katyonu ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Geliştirilen metodun orijinal metoddan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır. Ölçümlerde, sabit süredeki absorpsiyon azalması esas alınmaktadır.

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

İlk olarak Benzie ve Strain tarafından plazmanın demir (III)'ü indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan gücünü ölçmek için geliştirilen bu yöntemde, demir(III)tripridiltiazin (Fe(III)-TPTZ) kompleksi antioksidan (indirgen) vasıtasıyla düşük pH ortamında demir(II)tripridiltiazin (Fe(II)-TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi şiddetli mavidir ve 593 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir [136]. Bu yöntemin bir özelliği biyolojik bir örnekte bulunan antioksidanların hem Fe(III)-TPTZ kompleksini Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgemesi hem de Fe(II) iyonlarının ortamdaki H₂O₂ ile reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalleri ile etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesinin direkt olarak

ölçülememesidir. Diğer bir deyişle, FRAP metodu toplam antioksidan gücü tayin edebilen dolaylı bir yöntemdir [31]. pH=3.6'da uygulanan FRAP yöntemi fizyolojik pH'larda çalışmadığından bulunan sonuçların insan vücudundaki redoks reaksiyonlarına uyarlanması beklenmemelidir. Ayrıca bu yöntemin diğer bir eksikliği, plazma antioksidanlarını dolaylı olarak ölçerken '*in vivo*' koşullarda önemli bir tiyol (-SH) grubu antioksidanı olan glutatyon ile reaksiyon vermemesidir.

2.5.4. DPPH Yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorbsiyon verir. Etanol veya metanollü DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir [137]. Ancak doğaldır ki DPPH radikalini süpürme yeteneği, fizyolojik koşullarda etkin olan ROS ve RNS radikallerini süpürme yeteneği ile bire bir bağdaştırılamaz.

2.5.5. Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem Singleton ve arkadaşları [138] tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO₄ (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdrik-fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat reaktifini heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.

Bu denemede, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları, P(MoW₁₁O₄₀)⁴⁻ olması muhtemel mavi türlerin oluşumunu sağlar. Esasen, molibdenin kompleks içinde indirgenmesinin daha kolay olduğuna ve elektron-transfer reaksiyonunun indirgenler ve Mo(VI) arasında gerçekleştiğine inanılır.



Fenolik bileşikler FCR (Folin Ciocalteu reaktifi) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon

verirler. Fenolik protonun dissosiasyonu, reaktifi indirgeme yetenegi bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar.

2.5.6. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [139-141]; büyük oranda Glazer [142] tarafından yayınlanan çalışmayı esas alır. Peroksil radikalini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikalini oluşturmak için Cu(II) - H₂O₂ ve yükseltgenebilen protein substratı olarak fikoeritrin kullanılmaktadır. Oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrinin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve-AUC) teknigini kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [31]. Net AUC, antioksidan miktarıyla orantılıdır.

2.5.7. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve arkadaşları [143] tarafından geliştirilen bu yöntemde; plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitlenebilen maddelerden ve 2,2'-azobis (2-amido propan) dihidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH'ün ilavesinden sonra, yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu, reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesi ile belirlenir. Plazma içerisinde bulunan antioksidanlar oksidasyon reaksiyonunun yavaş gerçekleşmesine sebep olur. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek plazmadaki toplam antioksidan kapasitesi, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Wayner ve arkadaşları [144] peroksil radikalleri tarafından oksidasyon başlatılmadan önce, plazma örneğine linoleik asit ilavesi yaparak yöntemi modifiye etmişlerdir. Bu yöntemin dezavantajı, oksijen elektrodunun son noktasının tam olarak tespit edilememesi ve oksijen elektrodunun gereken zaman dilimi içinde kararlılığını koruyamamasıdır [145].

2.5.8. Luminol Yöntemi

İlk olarak Metsä-Ketelä ve diğ. tarafından 1991’de geliştirilen ve yayınlanan kemiluminesans bazlı TRAP yöntemi, daha sonra Alho ve Leinonen tarafından detaylı şekilde tanımlanmıştır [146]. AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikallerinin yükseltgenebilir substratı (luminol) oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşmaktadır. Oluşan ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülmektedir. Antioksidan özelliği olan bir madde, kemiluminesans ışımasının oluşumunu belli bir zaman (gecikme zamanı) için engeller. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Whitehead ve diğ. tarafından orijinal luminol yöntemine bazı ilaveler yapılmıştır [147]. Luminol maddesinin hidrojen peroksit veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanılır. Reaksiyonun daha hızlı gerçekleşebilmesi için katalizör olarak HRP (horse radish peroksidaz) kullanılmış ve ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekleşir. Reaksiyon ortamına *p*-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH’dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerini de indirgemesidir [147].

2.5.9. Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocin Bleaching Assay) Yöntemi

Tubaro ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde kinetik parametreler karşılaştırılarak plazma içindeki antioksidan kapasitesi ölçülmektedir. Bu yöntem; AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltgemesi (rengini gidermesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri ile yükseltgenme reaksiyonunda antioksidanların olmadığı durumdaki hızı (V_0) ve antioksidanların olduğu durumdaki hızı ise (V), 10 dakika içinde ölçülmektedir. Bu ölçülen hızların oranı (V_0 / V) x eksenini, antioksidan konsantrasyonunun $[A]$ krosin konsantrasyonuna $[C]$ oranı y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik oluşturulmaktadır. Oluşan bu lineer grafiğin eğimi k_a / k_c oranını yani peroksil radikalleri ile etkileşen bileşimin göreceli kapasitesini

belirtir. k_a ; antioksidanlar ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti, k_c ; krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabitidir. Bulunan k_a / k_c oranı, daha önceden troloks ile hesaplanan k_a / k_c oranına bölünerek sonuçlar troloks cinsinden hesaplanmaktadır. Bu yöntemde iki antioksidanın peroksil radikalleriyle etkileşimleri kıyaslanabilmektedir.

Gün içi denemelerin bağıl standart sapma değerlerinin % 8'den az olduğunu belirten Tubaro ve arkadaşları, bu kinetik yaklaşım sayesinde antioksidan koruma etkinliğinin kesin olarak değerlendirilebileceğine inanmaktadırlar [148]. Ancak bu metod bir antioksidanın diğer bir antioksidana karşı yarışma yeteneğini ölçmektedir. Ayrıca kullanılan krosinin konsantrasyonu sabittir (10 μ M) fakat analizlenecek olan bileşimin farklı konsantrasyonlarının kullanılması için farklı krosin konsantrasyonları gerekmektedir [31].

2.5.10. TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi

Winston ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu yöntemde, AAPH bileşiğinden oluşturulan peroksil radikalleri tarafından α -keto- γ metiolbutirik asitin (KMBA) etilene okside olmasına dayanır [149].

Kısmen antioksidanlar tarafından engellenen etilen oksidasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmektedir. Toplam kapasiteyi elde etmek için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$TOSC = 100 - (I_{SA} / I_{CA} \times 100) \quad (2.9)$$

SA: örnek reaksiyon eğrisi, CA: kontrol reaksiyon eğrisi

Antioksidan veya TOSC değerleri 0-100 arasında verilmiştir. Bu yöntemde kullanılan alan integralleri açık bir sistemdir, çünkü KMBA tarafından oluşan etilen üretimi antioksidanların tüketilmesiyle artar. Uygun değerlerde kullanılan KMBA sınırlayıcı bir faktör değildir. Bu yöntemin plazma antioksidanlarını değerlendiren bir uygulaması mevcut değildir [31].

2.5.11. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler

Ghiselli ve arkadaşları [150] tarafından 1994 yılında yayınlanan bu yöntemin bir kısmı daha önce Glazer [142] tarafından 1990 yılında ifade edilmiştir. Glazer, peroksil

radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikallerini oluşturmak için Cu(II)-askorbat, yükseltgenebilir substrat olarak B- veya R-PE kullanmıştır. B- veya R-PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. Bir numunedeki antioksidanların, peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı tam koruma süresi troloksun sağladığı tam koruma süresine oranlanarak troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir.

Yeni bir yöntem olarak yayınlanan Ghiselli' nin yönteminde Glazer' ın geliştirmiş olduğu yöntemle atıf yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada R-PE floresansındaki azalmanın floresansın %80 tamamlanana kadar zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma Cao ve diğ. tarafından tekrar yapıldığında aynı sonuçlar alınamamıştır [139,140].

2.5.12. Ellman Yöntemi

Bu yöntemde tiyol grupları Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)) ile kantitatif olarak türevlendirilirler ve reaksiyon sırasında eşdeğer miktarda 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit serbest kalır. Oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 412 nm de ölçülür. Hızlı ve çok yönlü bir yöntem olmasına karşılık yöntemin çeşitli kısıtlamaları vardır. DTNB reaktifi tiyol bileşiklerinden yalnızca -SH içerenlerle reaksiyon verebilir, reaksiyon hızı tiyol grubunun pK_a ve pH değerleri ile yakından ilişkilidir. Bunun anlamı reaksiyonun normal olarak en az pH 7 de olması demektir. Ancak bu pH değerinde tiyolat anyonu alkilasyon ya da oksidasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonlar verebilir [27]. Ellman yöntemi suda çözünabilir küçük tiyol grupları için oldukça iyi sonuç vermekle beraber protein sülfhidrilleri ile reaksiyon sıklıkla yüksek polarite ve Ellman reaktifinin eksi yükü nedeniyle engellenmektedir [151]. Bu nedenle Ellman yönteminin tiyol içerdiği bilinen protein örneklerine uygulanmasında yöntemde bir takım modifikasyonlar yapıldığı çeşitli literatürlerde görülmektedir. Örneğin Sava ve arkadaşları β -laktoglobulin tayininde yöntemi çeşitli şekillerde modifiye ederek kullanmışlardır [152].



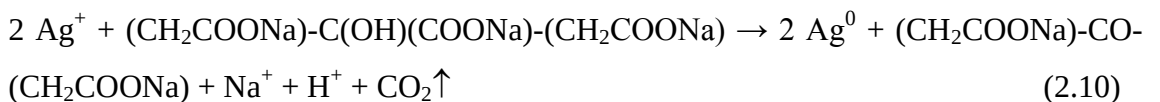
Şekil 2.32: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında 5-tiyo-2-nitrobenzoik aside dönüşümü.

2.5.13. Geliştirilen SNPAC (Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite) Yöntemi

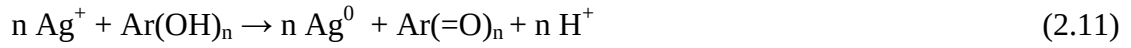
Polifenolik bileşiklerin, bu bileşiklerin sentetik karışımlarının ve gerçek örneklerin (meyve suları, bitki çayları gibi gıda örneklerinin) toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için gümüş nanoparçacık esaslı (SNP-esaslı) yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Polifenolik bileşiklerin Ag (I) iyonu indirgeyebilme yeteneği ölçülmesi sebebiyle yöntem araştırma grubumuz tarafından SNPAC yani “Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite” yöntemi olarak adlandırılmıştır [153].

Geliştirilen SNPAC yönteminde tek düze (uniform) dağılımlı, çekirdek halindeki gümüş nanoparçacıklar, Ag (I) iyonlarının trisodyum sitratla kimyasal olarak indirgenmesi sonucu hazırlanır. Bu prosesin ikinci aşamasında, ikincil indirgeyici ajan olarak kullanılan polifenoller Ag (I) iyonlarının gümüş çekirdeklerine (Ag^0) indirgenmesi ve çekirdek-kabuk halindeki SNP'lerin oluşumu için ortama ilave edilir. Polifenoller ve/veya antioksidan vitaminler ve Ag (I) iyonları, daha fazla Ag atomunun çekirdek yüzeyinden ayrılmasıyla sonuçlanan elektron transferine olanak sağlamak için çekirdek halindeki parçacıkların yüzeyine difüzlenir. Son olarak meydana gelen çekirdek-kabuk halindeki SNP'ler karakteristik SPR absorpsiyonu gösterir. Geliştirilen yöntemin bulguları, polifenol (veya vitamin) gibi antioksidan ortamındaki nanoparçacık oluşumunda optik özelliklerin ilgili bileşiklerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılı olduğunu gösterir.

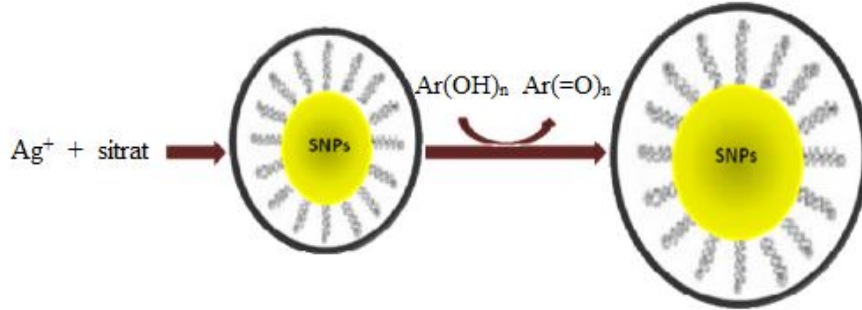
SNPAC yönteminin ilk aşamasında AgNO_3 trisodyum sitratla indirgenerek küçük boyutlu, küresel SNP'ler (ortalama $\text{çap} = 66 \text{ nm}$) sentezlenir.



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



Toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı SNPAC yönteminin esası, trisodyum sitratla sentezlenen gümüş nanoparçacıkların polifenolik bileşik ortamında büyümesine ve bu büyüyen nanoparçacıkların (çekirdek-kabuk oluşumu) plazmon absorbansının 423 nm dalgaboyunda ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.33). Bu şekilde polifenol ortamında büyümüş gümüş nanoparçacıkların optik özellikleri, ilgili fenolik asitlerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılıdır.



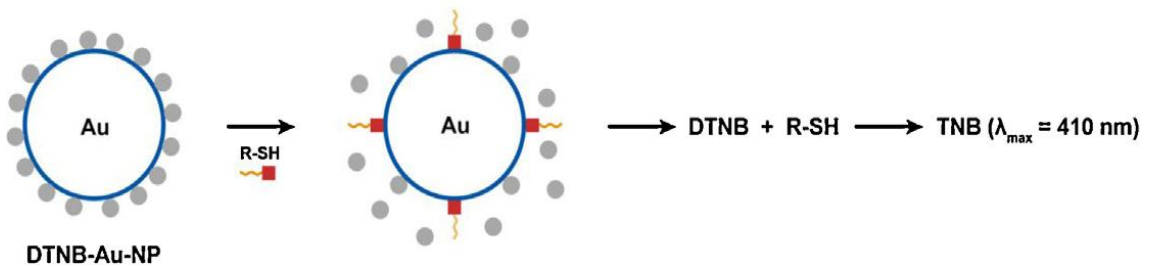
Şekil 2.33: Sentezlenen SNP'lerin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu SNP'lerin büyümesi.

2.5.14. Geliştirilen DTNB-Au-NP Yöntemi

Tez çalışmasının ikinci kısmında, üzerinde DTNB (5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asid) adsorplanmış Au-NP'lerin (DTNB-Au-NP'ler) oluşturduğu sol çözeltisi kullanarak yeni bir spektrofotometrik tiyol tayin yöntemi [154] geliştirilmiştir. Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB çözelti fazında serbest sülfhidril gruplarının kantitatif belirlenmesinde kullanılan suda çözünür bir bileşiktir. DTNB, bir disülfür karışımı ve pH 7.27'de sarı renkli dianyon formunda bulunan ve 412 nm dalgaboyunda $1.415 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

molar absorpsiyon katsayısına sahip 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB^{2-}) vermek üzere serbest bir sülfidril grubuyla reaksiyona girer. Bu nedenle nötral pH'da $-\text{SH}$ gruplarına karşı özgülüğü, yüksek molar absorpsiyon katsayısı ve reaksiyon süresinin kısıtlılığı açısından önemli bir tiyol tayin reaktifi [27] olan DTNB, Au-NP'lerin modifikasyon aracı olarak seçilmiştir. Nanoparçacık yüzeyindeki kimyasal etkileşimlerin (yani Au-NP'lerin yüzeyinde DTNB desorpsiyonu ile elele yürüyen tiyol adsorpsiyonu, yüzey elektrostatik çift-tabakası değişen NP'lerin agregasyonu ve desorbe olan DTNB ile adsorplanan tiyoller arasındaki TNB kromoforu oluşturma tepkimesi olaylarının bütünü) hem soğurma dalgaboyunu değiştirmesi (yani kırmızı ya da maviye kayma), hem de çözelti fazındaki TNB sönüm katsayısını çok daha arttırarak tayin duyarlılığını yükseltmesi beklenmiştir. Öncelikle altın nanoparçacıklar Turkevich ve Frens [28,29] yöntemlerine göre, indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat varlığında altın (III) bileşiklerinin altın atomlarına indirgenmesiyle sentezlenmiştir. Bu yöntem parçacık yüzeylerindeki sitratların gevşek kabuğundan dolayı istenen liganlarla kolayca yer değiştirebilmesinden dolayı sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [21]. İkinci aşamada toksik olmayan ve kararlı, tiyollere karşı yüksek bir afinite ve bağlanma kapasitesi gösteren DTNB [30] bağlı Au-NP'ler hazırlanmıştır. Geliştirilen yöntemde DTNB-Au-NP probunun duyarlılığı artırması ve tiyol değişim reaksiyonunun özgülüğü kullanılarak biyotiyollerin diğer antioksidanlar arasından seçimli olarak tayini mümkün kılınmıştır.

Geliştirilen altın nanoparçacık esaslı DTNB-Au-NP yönteminin [154] esası, trisodyum sitrat indirgemesiyle sentezlenen Au-NP'lere DTNB adsorbe edilerek hazırlanan DTNB-Au-NP'lerin tiyol antioksidanı varlığında tiyol-değişim reaksiyonuyla oluşan TNB absorbansının 410 nm dalgaboyunda ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.34).



Şekil 2.34: DTNB-Au-NP'nin tiyol bileşiği ile reaksiyonunun şematik gösterimi.

2.6. LİTERATÜRDE VAROLAN SOY METAL NANOPARÇACIKLAR İLE İLGİLİ ANTİOKSİDAN ÇALIŞMALARI

Li ve diğ. [155], altın nanoparçacıkların kendiliğinden biraraya gelmesi temelinde rezonans ışık saçılma (RLS) tekniğini kullanarak sisteinin seçimli olarak tayinini gerçekleştirmişlerdir. Sistein ve altın nanoparçacıklar arasındaki etkileşim incelenmiştir. Deneysel sonuçlar nanoparçacıkların kendiliğinden biraraya gelmesi araştırmalarında RLS tekniğinin hassas bir araç olduğunu göstermiştir. RLS yöntemi sisteinin yüksek duyarlılık ve basit bir işlemle seçimli olarak tayin edilmesine olanak sağlamıştır.

Nezhad ve diğ. [12], farmasötik örneklerdeki askorbik asidin tayini için anizotropik gümüş nanoparçacıkların oluşumu esasına dayalı, hassas kolorimetrik bir yöntem önermişlerdir. Trisodyum sitrat varlığında Ag^+ iyonlarının üçgen gümüş nanoparçacıklara indirgenmesiyle iki tane yüzey plazmon rezonans piki oluşur. Gümüş nanoparçacıkların plazmon absorbansı askorbik asidin spektrofotometrik olarak kantitatif tayinine imkan vermiştir.

Kumar ve diğ. [156], *Syzygium cumini* bitkisinin yaprak ve tohum ekstraktları ortamında gümüş nanoparçacıkların biyosentezini gerçekleştirmişler ve bu bitkinin polifenol içeriğini yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle belirlemişlerdir. Farklı fraksiyonların polifenol içeriği ve HPLC profili gümüş nanoparçacıkların sentezlenme hızı ve boyutlarıyla iyi bir korelasyon göstermiştir. Tohum ekstraktları, yaprak ekstraktlarından daha fazla polifenol ve biyokimyasal bileşik içermektedir. Bundan dolayı daha yüksek sentez hızına sahiptir ve daha büyük boyutlu gümüş nanoparçacıklar oluşturmuştur.

Ling ve diğ. [157], gümüş nanoparçacıkların agregasyonu ile meydana gelen renk değişimi esasına dayalı olarak önemli bir iltihap önleyici ilaç olan berberin tayini için kolorimetrik bir yöntem önermişlerdir. Sitrat kaplı gümüş nanoparçacıklar (parlak sarı renkli) negatif yüklü yüzeyle elektrostatik itmeden dolayı suda dağılmış halde bulunur. Pozitif yüklü berberinin varlığı sitrat kaplı gümüş nanoparçacıkların agregasyonuna neden olur ve berberin konsantrasyonuna bağlı olarak sarıdan yeşile hatta maviye renk değişimi meydana gelir.

Liu ve diğ. [158], kasımpatı ekstraktları ve çaylarının antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesi için altın nanoparçacık esaslı bir yöntem geliştirmişlerdir. Tetrakloroaurat asidi, setiltrimetil amonyum bromür, sodyum sitrat ve fosfat tamponundan oluşan altın nanoparçacık büyütme sistemine test örnekleri ilave edilerek altın iyonlarının sıfır değerlikli altına indirgenmesi esasına dayanarak altın nanoparçacıklar oluşturulmuştur. Elde edilen kırmızı renkli çözelti 545 nm’de karakteristik bir plazmon rezonans bandı göstermiştir. Oluşan altın nanoparçacıkların optik özellikleri test edilen örneklerin antioksidan aktiviteleriyle iyi bir korelasyon göstermiştir.

Nezhad ve diğ. [159], hidrokinon, kateşol ve pirogallolün tayini için dolaylı bir kolorimetrik yöntem önermişlerdir. Altın (III)’ün setiltrimetil amonyum klorür (CTAC) varlığında fenolik bileşiklerle altın nanoparçacıklara indirgenmesi, altın nanoparçacıklara ait çok şiddetli bir yüzey plazmon rezonans piki meydana getirir. Au-NP’lerin plazmon absorbansı fenolik bileşiklerin kolorimetrik olarak kantitatif tayinine olanak verir. 568 nm’deki absorbans değişimlerinden oluşturulan kalibrasyon eğrileri, hidrokinon, kateşol ve pirogallol için sırasıyla 7.0×10^{-7} - 1.0×10^{-4} M, 6.0×10^{-6} - 2.0×10^{-4} M ve 6.0×10^{-7} - 1.0×10^{-4} M konsantrasyon aralıklarında lineerdir.

Huang ve diğ. [160], aminotiyollerin tayini için yüzey destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş seçici prob olarak nil kırmızısı bağlı altın nanoparçacıkların (NRAu-NP’ler) kullanıldığı bir yöntem geliştirmişlerdir. Glutasyon, sistein ve homosistein gibi aminotiyollerin NRAu-NP’lerin yüzeyine bağlanması agregasyona ve dolayısıyla floresans ve renk değişimine neden olur. Yöntem, kırmızı renkli kan hücrelerinde GSH ve plazmada sistein analizi için uygulanmıştır.

Nezhad ve diğ. [161], sistein ve glutasyon için sitrat kaplı altın nanoparçacıkların agregasyonu esasına dayalı kolorimetrik bir yöntem önermişlerdir. İyonik kuvvet, pH ve konsantrasyona bağlı olarak etkilenebilen agregasyonun bir sonucu olarak 521 nm civarındaki plazmon bandı kırmızıya kaymış yeni bir plazmon bandının oluşumuyla birlikte giderek azalmıştır. Kalibrasyon eğrileri, sistein ve glutasyon için için sırasıyla

640 ve 650 nm'deki absorbanların orijinal dalgaboyu olan 521 nm'deki absorbanlara oranlanmasıyla elde edilen değerler kullanılarak oluşturulmuştur. LOD değerleri, sistein ve glutatyon için sırasıyla 2.1×10^{-6} ve 3.3×10^{-6} M olarak bulunmuştur.

Yang ve diğ. [162], askorbik asit tayini için sığır serum albumin korumalı-gümüş nanomalzemeler (BSA-NC'ler) ve Ag^+ karışımında gümüş nanoparçacık büyümesi esasına dayalı kolorimetrik bir yöntem önermişlerdir. BSA-NC'lerin katalizi sayesinde askorbik asit, oda sıcaklığında Ag^+ iyonunu gümüş nanoparçacıklara indirgeyebilir. Karışımın rengi, renksizden sarıya dönüşür ve 420 nm civarında güçlü bir absorpsiyon bandı oluşturur. Renk değişimleri 420 nm'de ölçülmüş ve askorbik asidin lineer olduğu konsantrasyon aralığı 2.0-50 μ M ve LOD değeri 0.16 μ M olarak belirlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG WAS220X marka analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karşılaştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde HI 221 Calibration Check Microprocessor pH-metre, altın nanoparçacık çözeltisinin hazırlanmasında Velp Scientifica manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, DTNB-Au-NP çözeltisinin santrifüj edilmesi için Mistral 2000 santrifüj cihazı, DTNB-Au-NP çözeltisinin kurutulmasında Telstar Cyrodos (İspanya) dondurarak kurutucu (freeze-dryer) cihazı, Varian Cary Bio 100 model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, HPLC analizleri için Waters BreezeTM 2 Model HPLC cihazı (Milford, MA, USA): 1525 model ikili pompa, termostatlı kolon fırını, 2998 model fotodiyot dizisi dedektör (PDA) (Chelmsford, MA, USA), Hamilton marka 25 µL-şırınga (Reno, NV, USA), ACE C18 analitik kolon (4.6 mm×250 mm, 5 µm) (Milford, MA, USA) kullanıldı. Waters HPLC sistemi data analizleri Empower PRO (Waters Associates, Milford, MA, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyonun yapılması için FEI Model Quanta 450 FEG marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; gümüş nitrat (AgNO_3), tetrakloroaurat asidi (HAuCl_4), trisodyum sitrat, tris(hidroksimetil aminometan) (TRIS), sodyum dihidrojen fosfat, disodyum hidrojen fosfat, sodyum asetat, asetik asit, amonyak, amonyum klorür, 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (Eldmann Reaktifi), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin), amonyum asetat, etil alkol (%96), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), gallik asit (GA), kafeik asit

(CFA), klorojenik asit (CHA), rosmarinik asit (RA), kuersetin (QR), fisetin (FIS), (-) epikateşin gallat (ECG), (-)epigallokateşin gallat (EGCG), (-)epigallokateşin (EGC), (-) epikateşin (EC), (+)kateşin (CT), L-askorbik asit (AA), luteolin (LT), rutin (RT), α - tokoferol (TP), apigenin, troloks (TR), N-asetil-L-sistein (NAC), sisteamin (CA), L-sistein (Cys), DL-homosistein (HCys), glutatyon (indirgenmiş, GSH), 1,4-ditiyoeritritol (DTE), dihidrolipoik asit (DHLLA), naringin (NG), ürik asit (UA), ferulik asit (FR), glisin, bilirubin (BIL), lösin, okzalit, tartarat, glukoz, malik asit, fumarik asit, fruktoz, galaktoz, serin, alanin, tartarik asit, 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (Eldann Reaktifi)'tir. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Elma, vişne, üzüm ve nar suyu, Tamek Gıda Konsantre San. Tic. A.Ş., şeftali suyu Tat Konserve San. A.Ş., zeytin yağı Ana Gıda İth. Mad. San. A.Ş., yeşil ve siyah çay Çaykur A.Ş.'den temin edilmiştir. Çalışılan doku homojenizatları İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden (Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı) temin edilmiştir. Brunac göz damlası Arz İlaçları San. Tic. Ltd. Şti., Mentopin efervesan tablet Genesis İlaç ve Sağlık Ürünleri A.Ş., Trom efervesan tablet Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler San. Tic. A.Ş., GNC Glutatyon tablet Bakara İlaç ve Tıbbi Malz. Paz. Dış. Tic. A.Ş. ve Primene amino asit solüsyonu Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri San. Tic. A.Ş.'dan temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Gümüş Nanoparçacık Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

i-) *SNPAC yöntemi*: AgNO_3 stok çözeltisi, 5×10^{-3} M olacak şekilde gümüş nitrattan 0.0424 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Trisodyum sitrat çözeltisi, % 1'lik (w/v) olacak şekilde trisodyum sitrat-2-hidrattan tartım alınıp destile suda hazırlandı.

ii-) *CUPRAC yöntemi*: Cu(II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde bakır(II) klorür dihidrat'tan ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M (pH=7.0) olacak şekilde NH_4Ac 'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.039 g tartım alınıp mutlak etil alkolle çözülüp 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

iii-) *Polifenolik bileşikler*: Tüm standart antioksidan bileşik çözeltileri istenilen çalışma konsantrasyonunda (1.0×10^{-3} M) etil alkolde günlük olarak hazırlandı. Askorbik asit çözeltisi 1.0×10^{-3} M konsantrasyonda olacak şekilde destile suda günlük olarak hazırlandı.

iv-) *Meyve suyu örneklerinin hazırlanması*: Meyve suyu örnekleri analiz öncesinde 0.45 μ m-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirildi ve istenilen oranda suyla seyreltilerek ilgili analizlerde kullanıldı.

v-) *Zeytin yağı örneğinin hazırlanması*: 2 g zeytin yağı bir santrifüj tüpüne tartıldı ve üzerine 1 mL *n*-hekzan ve 2 mL MeOH - H₂O (60:40, v/v) ilave edildi. Karışım 2 dakika boyunca vorteks cihazında karıştırıldı ve 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. MeOH fazı ayrıldı ve ekstraksiyon işlemi iki kez tekrar edildi. Ekstrakt freeze-dreyer cihazında vakum altında ve düşük sıcaklıkta kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Örnek MeOH - H₂O (1:1, v/v) karışımında çözeltiliye alındı [163].

vi-) *Bitki ekstratlarının hazırlanması*: Bitki örnekleri 0.1 g tartılıp üzerine 20 mL MeOH - H₂O (80:20, v/v) ilave edildi. Örnekler mikrodalga ekstraksiyon cihazında 5 dakika 80 °C'de ekstrakte edildi. Örnekler adi süzgeç kağıdından süzildükten sonra analiz öncesinde 0.45 μ m-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip istenilen oranda MeOH - H₂O (80:20, v/v) ile seyreltilti.

vii-) *Yeşil ve siyah çay infüzyonunun hazırlanması*: 2 g'lık yeşil ve siyah poşet çaylar 250 mL kaynamış suya ilk 2 dakika boyunca batırılıp çıkarıldı. Sonraki 3 dakika boyunca ise demlemeye bırakıldı (toplam demlenme süresi 5 dakika). Poşet çay demlenmeye bırakıldığı kaynamış sudan çıkarıldı ve çözeltiler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra analiz öncesinde 0.45 μ m-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip istenilen oranda suyla seyreltilti.

3.3.2. Altın Nanoparçacık Esaslı Tiyol Grubu Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

i-) *DTNB-Au-NP Yöntemi*: Tetrakloro aurat asidi çözeltisi (Au³⁺), % 0.01 olacak şekilde destile suyla seyreltilerek hazırlandı. Trisodyum sitrat çözeltisi, % 1'lik olacak şekilde trisodyum sitrat-2-hidrattan tartım alınıp destile suda hazırlandı. Elmann reaktifi

çözeltisi, DTNB 2 mg mL⁻¹ olacak şekilde pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlandı. pH 8 Tris-HCl tamponu, tris(hidroksimetil aminometan)dan konsantrasyonu 0.05 M olacak şekilde 0.6054 g tartım alınıp bir miktar suda çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH'ı 8'e ayarlandı ve 100 mL'ye destile su ile tamamlanarak hazırlandı.

ii-) *Klasik DTNB Yöntemi*: Elmann reaktifi çözeltisi, DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)) 4 mg mL⁻¹ olacak şekilde pH 7.0 fosfat tamponunda hazırlandı. 0.1 M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tampon çözeltisi (pH=8.0) destile su içerisinde hazırlandı.

iii-) *HPLC Yöntemi*: HPLC çalışmasında hareketli faz olarak kullanılmak üzere NaH₂PO₄ ve H₃PO₄'ün 10 mM'lık çözeltilerinden fosfat tamponu (pH 2.5) hazırlandı.

iv-) *Tiyol grubu antioksidan bileşikler*: Tüm tiyol bileşik çözeltileri istenilen çalışma konsantrasyonunda (1.0x10⁻³ M) destile suda günlük olarak hazırlandı. Dihidrolipoik asit 1.0x10⁻³ M konsantrasyonda olacak şekilde etil alkolde günlük olarak hazırlandı.

v-) *Karaciğer doku homojenizatının hazırlanması*: Hayvanlar (CD-1 mice) dekapitasyon yoluyla sakrifiye edildikten sonra hızlı bir şekilde karaciğer dokusu elde edilmiştir. Elde edilen doku örnekleri % 0.9 NaCl ile yıkanıp, tartılarak (% 10 w/v) soğuk % 1.15 KCl çözelti içerisinde cam homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenizatlar analiz edilinceye kadar - 80 °C de saklanmıştır. Doku homojenizatı analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) süzölmüş ve 1:6 oranında amonyum asetat tamponuyla seyreltilmiştir.

vi-) *Farmasötik ilaç örneklerinin hazırlanması*: Acetylcystein 600 Trom, Acetylcystein 600 Mentopin efervesan tabletler ve GNC L-Glutathione 50 tablet 100 mL destile suda hazırlandı. Brunac göz damlası ve Primene amino asit solüsyonu ise destile suyla uygun seyreltme oranlarında seyreltilerek hazırlandı. Tüm farmasötik ilaç örnekleri analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilip istenilen oranda suyla seyreltildi.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Gümüş Nanoparçacık Esaslı Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Yöntemler

3.4.1.1. SNP (Gümüş Nanoparçacık) Hazırlanması

Gümüş nanoparçacıklar, Ag^+ 'nın trisodyum sitrat ile kimyasal indirgeme olarak indirgenmesiyle hazırlandı [164]. 50 mL, 1.0×10^{-3} M gümüş nitrat çözeltisi kaynayana kadar (10 dakika boyunca) reflüks altında ısıtıldı. Kaynayan gümüş nitrat çözeltisine damla damla ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak 5 mL, % 1 trisodyum sitrat çözeltisi ilave edildi ve 5 dakika daha reflüks altında ısıtma işlemine devam edildi. Açık sarı renkli gümüş nanoparçacık (SNP) elde edildi.

3.4.1.2. Geliştirilen SNPAC Yöntemi

Geliştirilen SNPAC yönteminde [153], bir deney tüpü içerisine sırasıyla 2.0 mL SNP çözeltisi, x mL standart antioksidan çözeltisi veya gerçek örnek çözeltisi ve (0.8-x) mL H_2O ilave edilip iyice çalkalandı. Reaksiyon karışımları oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyonda bekletildi. Referans çözeltinin absorbansına göre (A_0), örnek çözeltisinde antioksidan varlığında antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak artış gözlenir. Absorbanstaki bu artış (ΔA), 30 dakika sonunda 423 nm dalga boyunda referans çözeltiye karşı okundu.

$$2 \text{ mL SNP çözeltisi} + x \text{ mL antioksidan çözeltisi} + (0.8 - x) \text{ mL } \text{H}_2\text{O} \quad (3.1)$$

$$V_t : 2.8 \text{ mL}$$

3.4.1.3. CUPRAC Yöntemi

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

$$1\text{mL Cu(II)} + 1\text{mL Nc} + 1\text{mL tampon} + x \text{ mL örnek çöz.} + (1.1-x) \text{ mL H}_2\text{O} \quad (3.2)$$

$$V_t : 4.1 \text{ mL}$$

3.4.1.4. *Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TAC Ölçümü*

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

$$\text{TAC}_{\text{Beklenen}} = \text{TEAC}_1 \cdot C_1 + \text{TEAC}_2 \cdot C_2 + \text{TEAC}_3 \cdot C_3 \quad (3.3)$$

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

$$\text{TAC}_{\text{Deneysel}} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{\text{TR}}} \times 10^3 \quad (3.4)$$

3.4.1.5. *Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi*

Sentezlenen gümüş nanoparçacıkların SEM görüntülerinin elde edilebilmesi için SNP'ler alüminyum tabaka üzerine yapıştırılan karbon bant üzerine yerleştirildi. Örnekler SHUR/Freeze Cryogen sprej püskürtülerek dondurulup vakum altında (6×10^{-2} mbar) kurutuldu. SNP'lerin ikincil elektron görüntüleri SEM modunda ve istenen büyütmeyle elde edildi.

3.4.2. Altın Nanoparçacık Esaslı Tiyoil Grubu Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Yöntemler

3.4.2.1. *Au-NP (Altın Nanoparçacık) Hazırlanması*

Altın nanoparçacıklar, Turkevich ve Frens yöntemlerine göre trisodyum sitrat varlığında indirgeme yapılarak hazırlandı [28,29]. 50 mL, % 0.002 tetrakloro aurat asidi çözeltisi (Au^{3+}) kaynayana kadar reflüks altında ısıtıldı. Kaynayan altın çözeltisine hızlı bir şekilde ve manyetik karıştırıcı altında 0.5 mL, % 1 trisodyum sitrat çözeltisi ilave edildi ve 5 dakika daha reflüks altında ısıtma işlemine devam edildi. Açık kırmızı renkli altın nanoparçacık çözeltisi (Au-NP) elde edildi.

3.4.2.2. DTNB-Au-NP (DTNB Bağlı Altın Nanoparçacık) Hazırlanması

Tiyol tayininde kullanılmak üzere sentezlenen altın nanoparçacıklara DTNB ilave edilerek DTNB-Au-NP'ler hazırlandı [154]. Buna göre hazırlanan Au-NP çözeltisinden (5 mL) santrifüj tüplerine konuldu ve üzerine 0.5 mL, 2 mg mL⁻¹ DTNB çözeltisi ilave edilerek 1 gün süresince +4 C°'de bekletildi. 1 gün süresince bekletilen çözeltiler, 12000 rpm ve 25 C°'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj edilen çözeltinin üst fazından 5 mL çekilerek uzaklaştırıldı ve kalan çözelti freeze dryerda kurutuldu. Elde edilen kalıntı (DTNB-Au-NP), tiyol antioksidan bileşiklerinin tayininde kullanılmak üzere 5.5 mL, % 1'lik trisodyum sitrat çözeltisiyle tekrar çözeltiye alındı.

3.4.2.3. Geliştirilen DTNB-Au-NP Esaslı Tiyol Tayin Yöntemi

Geliştirilen DTNB-Au-NP esaslı tiyol tayin yönteminde [154], tüplere hazırlanan DTNB-Au-NP çözeltisinden 1.1 mL konularak üzerine x mL tiyol grubu antioksidan çözeltisi ilave edildi ve pH 8 Tris-HCl tamponuyla son hacim 3 mL'ye tamamlanarak çözeltiler hazırlandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 5 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda suya karşı 410 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. Bu yöntemle tüm tiyol grubu içeren antioksidan bileşiklerin çalışma eğrileri çizildi. Bu maddelerin lineer olduğu aralık tespit edildi ve her bir bileşiğin molar absorblama katsayısı bulundu.

$$1.1 \text{ mL DTNB-Au-NP çözeltisi} + x \text{ mL örnek} + (1.9 - x) \text{ mL pH 8 Tris-HCl tamponu} \\ V_t : 3.0 \text{ mL} \quad (3.5)$$

3.4.2.4. Klasik DTNB Yöntemi

Orijinal Ellman yöntemine [30] göre bir tüpe sırasıyla son hacim 10 mL olacak şekilde örnek (3 mL), fosfat tamponu (2 mL, pH 8) ve su ilave edildi. Bu hazırlanan karışımın 3 mL'si üzerine pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış ve 4 mg mL⁻¹ konsatrasyonda, 0.02 mL DTNB ilave edildi. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 2 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

3 mL örnek + 2 mL pH 8 fosfat tamponu + 5 mL H₂O

↓

3 mL karışım çöz. + 0.02 mL DTNB

V_t : 3.02 mL (3.6)

3.4.2.5. HPLC Yöntemi

Tiyol grubu içeren antioksidan bileşiklerin analizi için kullanılan HPLC yönteminde; metanol (A) ve pH 2.5 fosfat tamponu (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulandı. Bunun için 215 nm’de pik dedeksiyonuyla ve 1 mL/dakika akış hızıyla; 5 dakika % 40 (A), eğim (1.0); 5-10 dakika % 60 (A), eğim (1.0) gradient elüsyon kullanıldı. Bu elüsyon yöntemi ile, tiyol bileşikleri için uygun konsantrasyon aralığında çalışarak kalibrasyon doğruları oluşturuldu. Eczaneden temin edilen ve etken maddesi NAC, GSH ve Cys olan ilaçlar bu yöntem ile analizlendi; kalitatif ve kantitatif değerlendirmeleri yapıldı.

3.4.2.6. Sentetik Tiyol Antioksidan Karışım Çözeltilerinin TTC Ölçümü

Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin her birinin sulu çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda üçlü sentetik karışımlar hazırlandı. Bu sentetik tiyol karışımlarının beklenen ve deneysel olarak ölçülen toplam tiyol içerikleri (TTC), DTNB-Au-NP esaslı yöntem uygulanarak mM sistein eşdeğeri cinsinden Eşitlik 3.7 ve 3.8’e göre hesaplandı.

$$TTC_{Beklenen} = CETC_1 \cdot C_1 + CETC_2 \cdot C_2 + CETC_3 \cdot C_3 \quad (3.7)$$

(CETC: sistein eşdeğeri tiyol içeriği; C: konsantrasyon)

$$TTC_{Deneysel} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{Cys}} \times 10^3 \quad (3.8)$$

3.4.2.7. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) Analizi

Sentezlenen altın nanoparçacıkların SEM görüntülerinin elde edilebilmesi için Au-NP’ler alüminyum tabaka üzerine yapıştırılan karbon bant üzerine yerleştirildi. Örnekler SHUR/Freeze Cryogen sprej püskürtülerek dondurulup vakum altında (6×10^{-2} mbar) kurutuldu. Au-NP’lerin ikincil elektron görüntüleri SEM modunda ve istenen büyütmeyle elde edildi.

4. BULGULAR

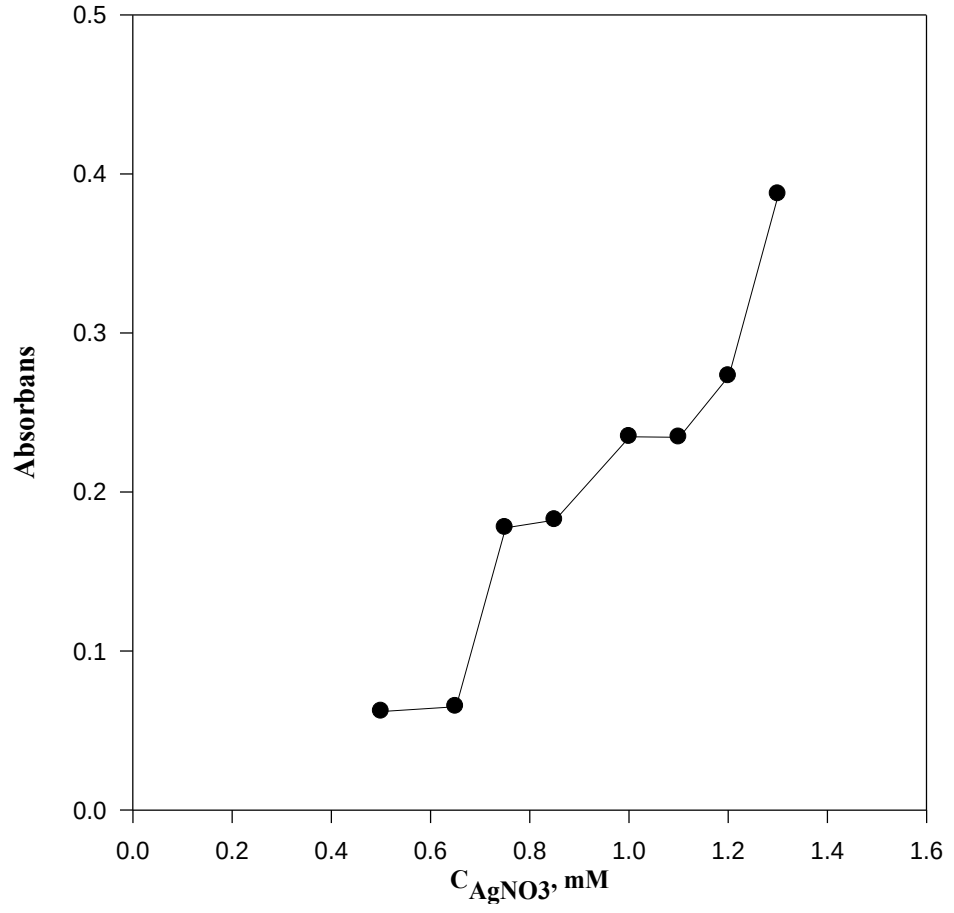
4.1. ANTİOKSİDANLARA DUYARLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI ANTİOKSİDAN KAPASİTE (SNPAC) YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

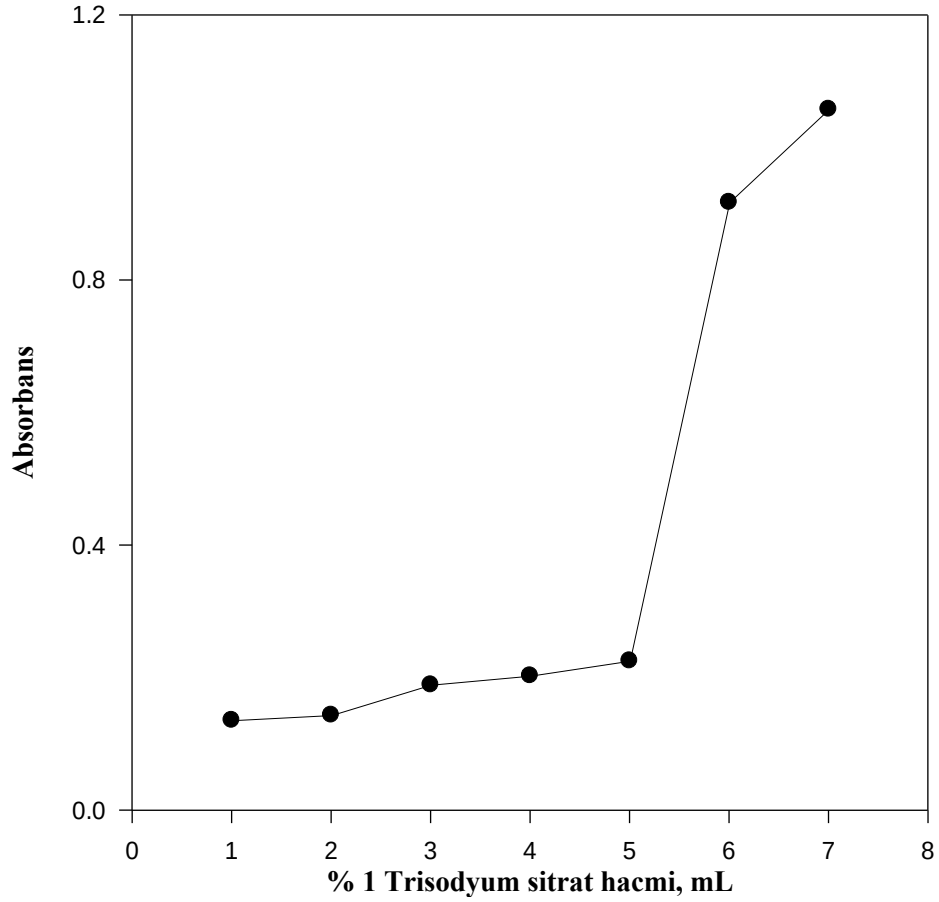
4.1.1.1. *Gümüş Nanoparçacık Sentezinde $AgNO_3$ ve Trisodyum Sitrat Konsantrasyonunun Etkisi*

Sentezlenen gümüş nanoparçacığın plazmon absorbanansı üzerindeki gümüş nitrat konsantrasyonunun etkisi incelendi (Şekil 4.1). 0.5×10^{-3} - 1.3×10^{-3} M $AgNO_3$ konsantrasyonu aralığında çalışıldı. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi $AgNO_3$ konsantrasyonu arttıkça oluşan SNP’lerin plazmon absorbanansı artmıştır. 1.2×10^{-3} M ve daha yüksek $AgNO_3$ konsantrasyonlarında oluşan SNP’lerin yığılması sebebiyle koyu sarı-yeşilimsi bir çözelti oluşmuştur. Bu nedenle, optimum $AgNO_3$ konsantrasyonu 1.0×10^{-3} M olarak belirlendi.

Gümüş nanoparçacık hazırlanmasında farklı trisodyum sitrat konsantrasyonunun etkisi incelendi (Şekil 4.2). Reflüks altında ısıtılan 1×10^{-3} $AgNO_3$ üzerine 1 - 7 mL aralığında % 1’lik trisodyum sitrat ilave edildi. 1-5 mL trisodyum sitrat ilavesinde oluşan SNP’lerin plazmon absorbanansında ufak artışlar meydana geldi. 6 ve 7 mL trisodyum sitrat ilavesinde ise oluşan SNP’lerin yığılması sebebiyle absorbansta hızlı bir artış meydana geldi. Bu nedenle, ilave edilen optimum trisodyum sitrat hacmi 5 mL olarak belirlendi.



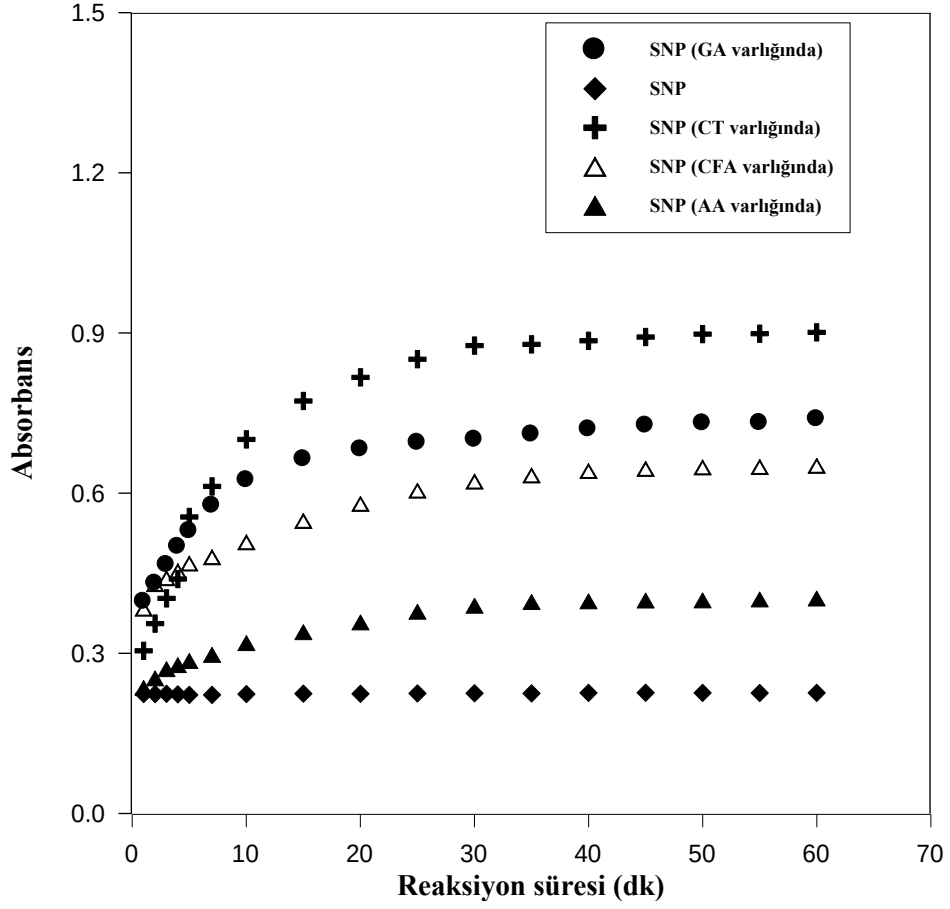
Şekil 4.1: Gümüş iyonu konsantrasyonunun SNP plazmon absorbanşı üzerine etkisi.



Şekil 4.2: Trisodyum sitrat konsantrasyonunun SNP plazmon absorbanı üzerine etkisi.

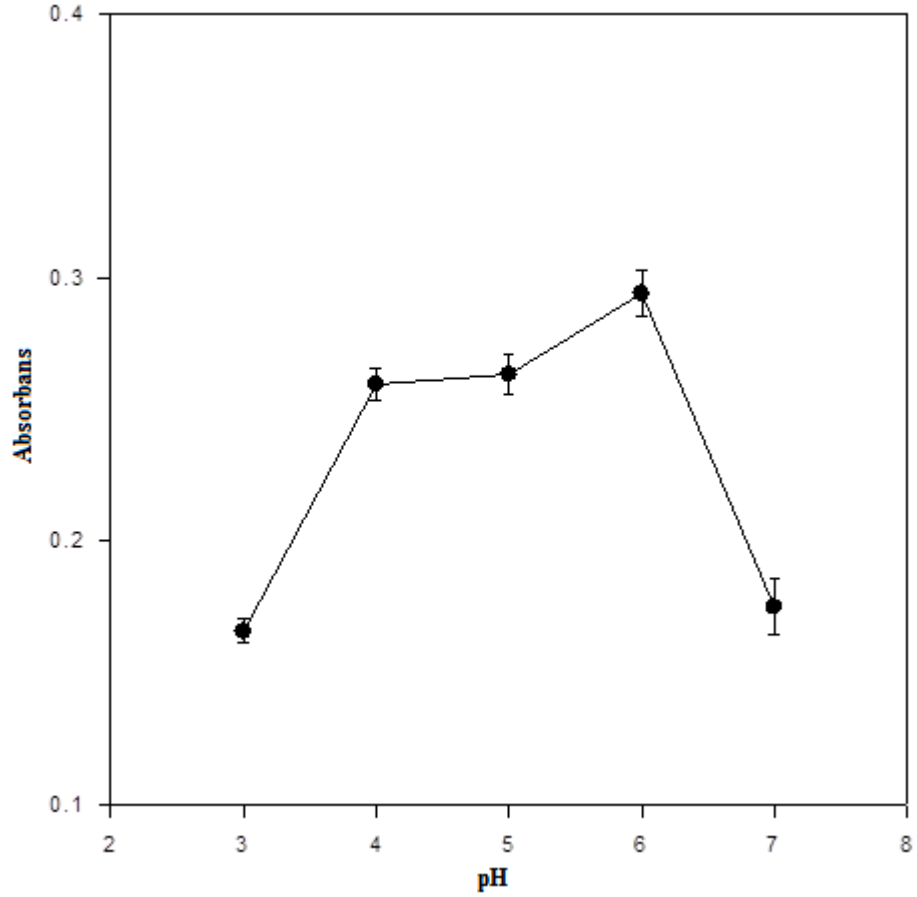
4.1.1.2. SNPAC Yönteminde İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi

SNPAC yönteminde; sentezlenen gümüş nanoparçacıklar ile antioksidan kapasite tayininin optimum deney koşulları belirlenmiştir. Bir tüpe 2.0 mL SNP çözeltisi, x mL antioksidan çözeltisi ve (0.8-x) mL destile su; bir diğer tüpe 2.0 mL SNP çözeltisi ve 0.8 mL destile su ilave edilip karıştırıldıktan sonra 60 dakika boyunca antioksidan varlığında ve yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıktaki zamana bağlı değişim 423 nm dalga boyunda absorbanı ölçümü yapılarak incelendi. Farklı antioksidanlar (GA, CT, CFA ve AA) ile çalışıldı ve optimum reaksiyon süresi 30 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: SNP (referans çözelti) ve GA, CT, CFA ve AA varlığında SNPAC reaksiyon kinetiği.

SNPAC yöntemine göre; aynı deneysel koşullar altında ve antioksidan yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıklara pH'ın etkisini incelemek için pH 3-7 aralığında çalışıldı. Farklı pH ortamlarında reaksiyonun değişimi incelendi. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi pH 3 ve 6 arasında oluşan SNP'lerin absorbansı artmıştır. En yüksek SNP absorbansı ise pH 6'da gözlenmiştir. Buna göre, optimum çalışma pH'ı 6 olarak belirlendi.



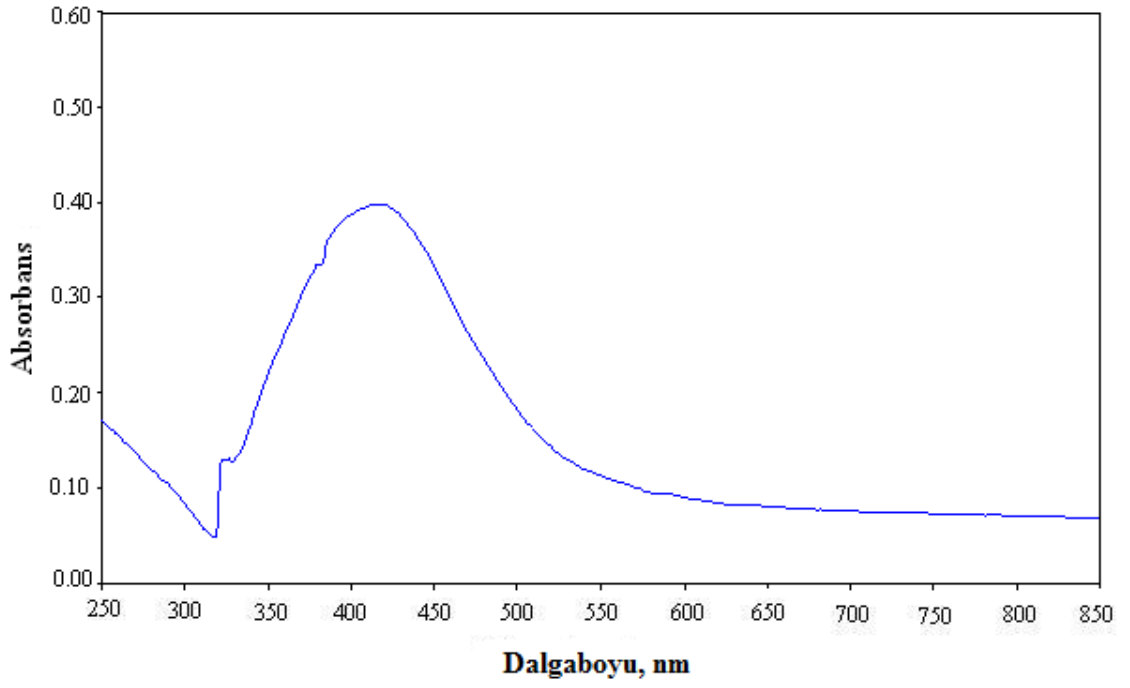
Şekil 4.4: Antioksidan yokluğunda oluşan SNP'lere pH'ın etkisi.

4.1.2. Sentezlenen Gümüş Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

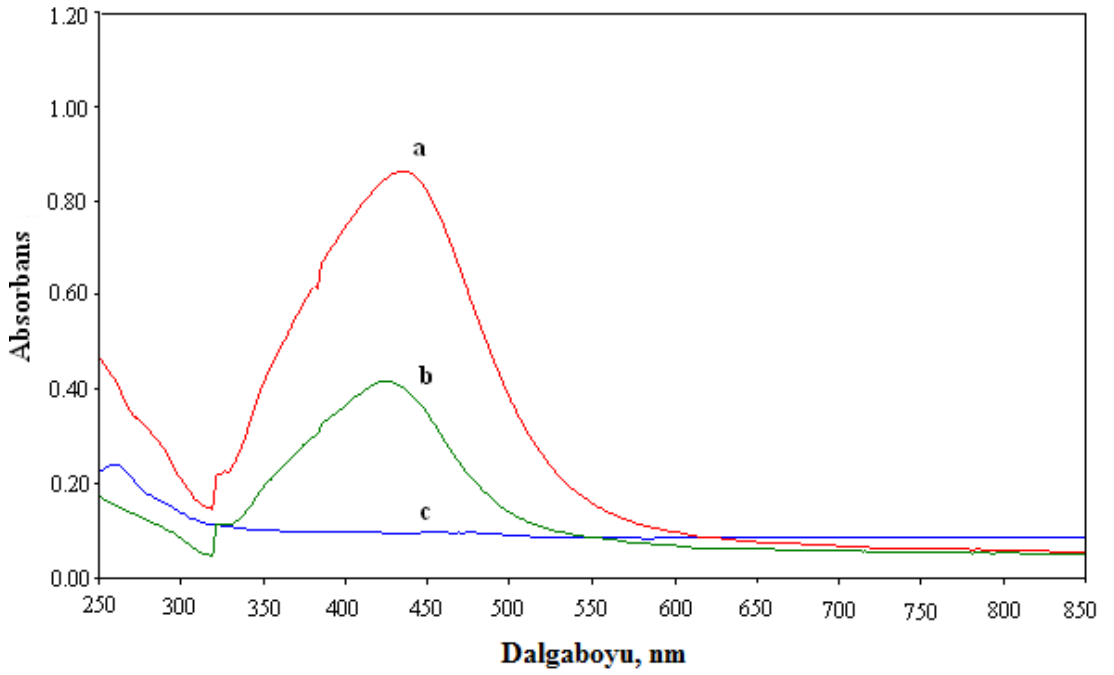
4.1.2.1. Spektrofotometrik Karakterizasyonu

1.0×10^{-3} M gümüş nitrat çözeltisi ve % 1'lik trisodyum sitrat ile reflüks altında sentezlenen gümüş nanoparçacığın görünür bölge spektrumu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5).

Gallik asit yokluğunda (b) ve varlığında (a) oluşan gümüş nanoparçacıkların (SNP'ler) ve gallik asidin (c) absorpsiyon spektrumlarını Şekil 4.6'da verilmiştir. Antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan gümüş nanoparçacığın absorbansında artış görülmektedir (b→a).



Şekil 4.5: Sentezlenen gümüş nanoparçacığın UV-görünür bölge spektrumu (λ_{max} : 417 nm).

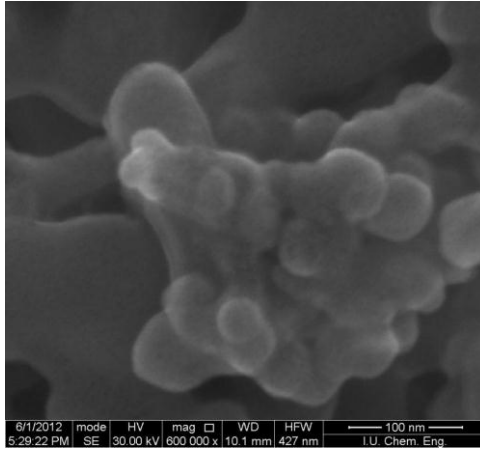


Şekil 4.6: (a) Gallik asit varlığında oluşan SNP, (b) gallik asit yokluğunda oluşan SNP'lerin ve (c) gallik asidin (1.43×10^{-5} M) UV-görünür bölge spektrumları.

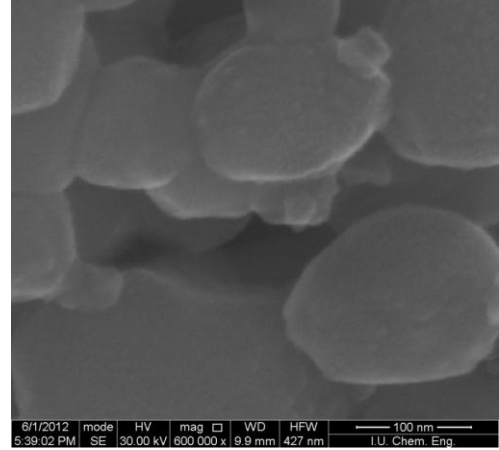
4.1.2.2. SEM Analizi ile Karakterizasyonu

Sentezlenen gümüş nanoparçacıkların SEM görüntüleri aşağıda (Şekil 4.7) verilmiştir. Trisodyum sitrat varlığında hazırlanan çekirdek halindeki SNP'lerin (polifenol yokluğunda) SEM görüntüsü Şekil 4.7'de (a) verilmiştir. Geliştirilen SNPAC yöntemine göre; çekirdek halindeki SNP'ye gallik asit (1.43×10^{-5} M) ilavesinde redoks reaksiyonu sonucu oluşan SNP'lerin SEM görüntüsü Şekil 4.7'de (b) verilmiştir. Buna göre redoks reaksiyonu sonucu oluşan gümüş nanoparçacıkların küre şeklinde, tek düze (uniform) dağılımlı ve uygun boyut dağılımında homojen parçacıklar olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Polifenolik bileşikler yokluğunda ve varlığında oluşan SNP'lerin ortalama boyutları, sırasıyla 66 ve 112 nm'dir.

a)



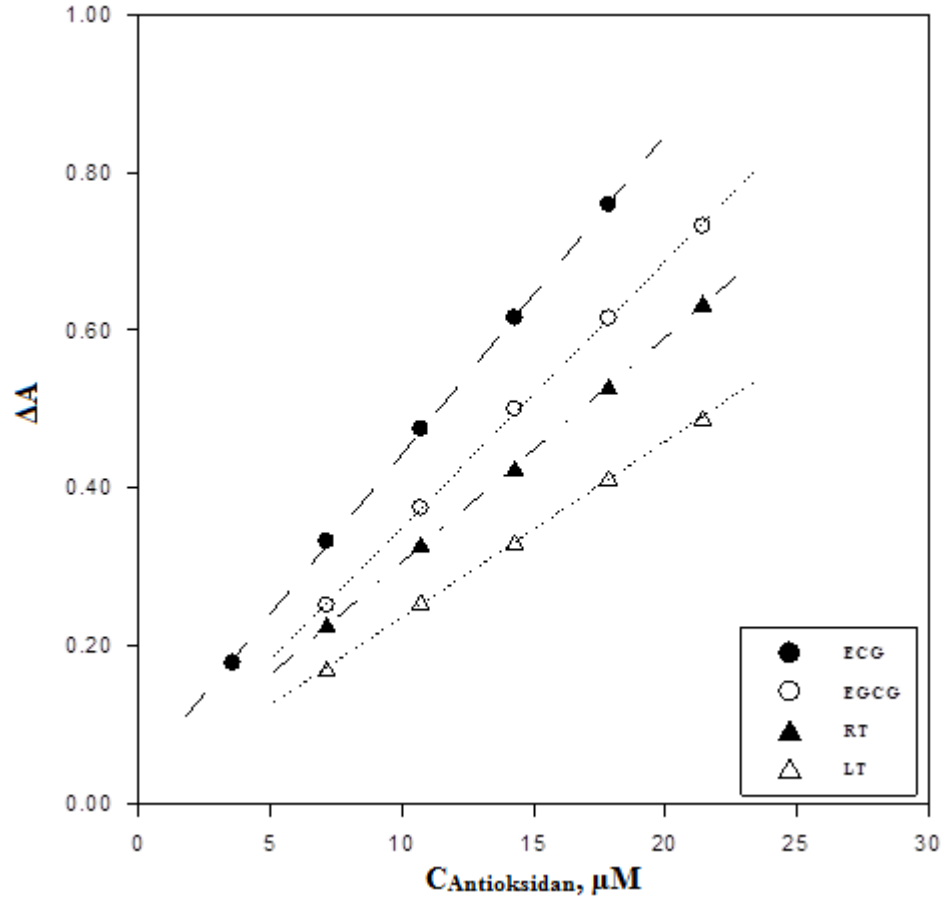
b)



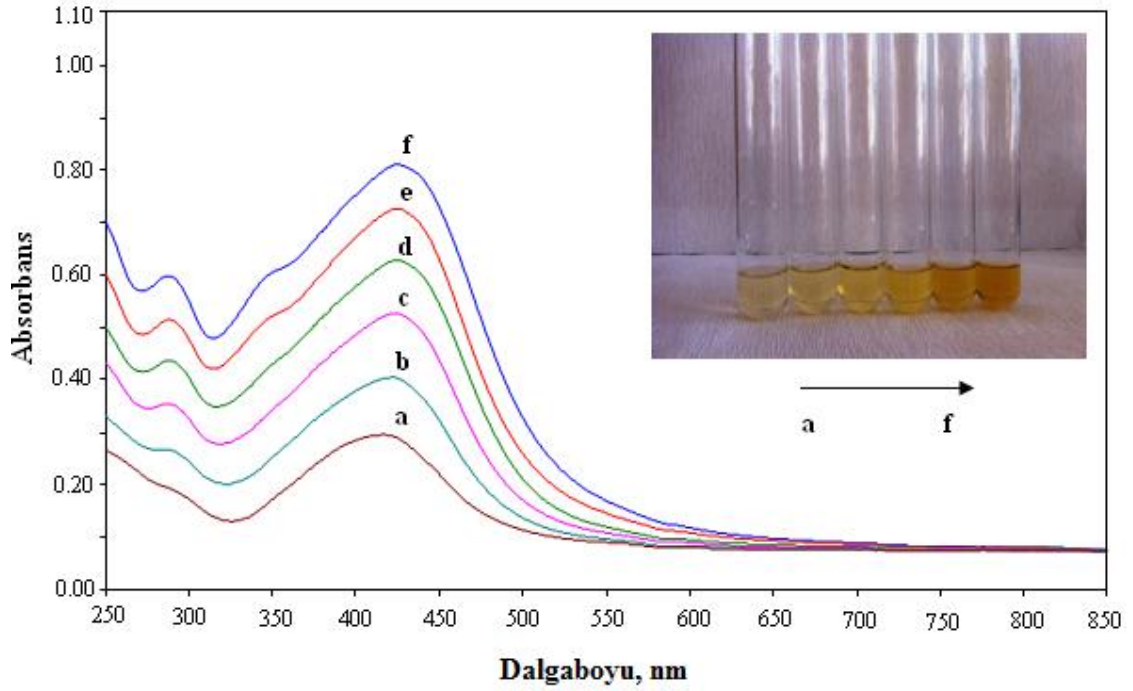
Şekil 4.7: (a) Trisodyum sitrat, (b) trisodyum sitrat + GA ile sentezlenen SNP'lerin SEM görüntüleri.

4.1.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi

SNPAC yöntemi uygulanan bazı polifenolik bileşiklerden epikateşin gallat, epigallokateşin gallat, rutin ve luteolinin SNPAC yöntemine göre kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.8) aşağıda verilmiştir. SNPAC yöntemine göre farklı kuersetin konsantrasyonlarında oluşan gümüş nanoparçacıkların görünür bölge spektrumları ve meydana gelen renk değişimi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8: Polifenolik bileşiklerden seçilen epikateşin gallat, epigallokateşin gallat, rutin ve luteolinin SNPAC yöntemine göre kalibrasyon grafikleri.



Şekil 4.9: Geliştirilen SNPAC yöntemine göre farklı QR konsantrasyonları varlığında oluşan SNP'lerin görünür bölge spektrumu: (a) 0, (b) 3.57, (c) 7.14, (d) 10.71, (e) 14.28, (f) 17.85 μM ve renk değişimi.

4.1.4. Antioksidan Bileşiklerin SNPAC Yöntemi ile Molar Absorblama Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi

Polifenolik bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) SNPAC yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.1). Lineer kalibrasyon doğrularındaki sembollerden c: molar konsantrasyon, A: absorbans ve r: korelasyon katsayısı karşılığıdır.

Tablo 4.1: Antioksidan bileşiklerin SNPAC yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları.

Antioksidanlar	Lineer denklem ve korelasyon katsayısı (r)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Lineer aralık (μM)
BASİT FENOLİK ASİTLER			
Gallik asit	$A = 2.27 \times 10^4 c + 0.01$ (r=0.9991)	2.27×10^4	1.67 – 52.30
HİDROKSİSİNAMİK ASİTLER			
Rosmarinik asit	$A = 3.90 \times 10^4 c + 0.01$ (r=0.9977)	3.90×10^4	1.02 – 30.51
Kafeik asit	$A = 1.93 \times 10^4 c + 0.02$ (r=0.9990)	1.93×10^4	1.55 – 61.14
Klorojenik asit	$A = 2.37 \times 10^4 c + 0.02$ (r=0.9981)	2.37×10^4	1.26 – 49.79
FLAVONOLLER			
Quercetin	$A = 2.99 \times 10^4 c + 0.01$ (r= 0.9995)	2.99×10^4	1.33 – 39.80
Fisetin	$A = 2.82 \times 10^4 c - 0.019$ (r= 0.9978)	2.82×10^4	2.44 – 43.20
FLAVAN-3-OLLER			
ECG	$A = 4.16 \times 10^4 c + 0.02$ (r=0.9993)	4.16×10^4	0.72 – 28.36
EGCG	$A = 3.31 \times 10^4 c + 0.02$ (r=0.9994)	3.31×10^4	0.91 – 35.65
EC	$A = 2.70 \times 10^4 c + 0.03$ (r=0.9988)	2.70×10^4	0.74 – 43.33
Kateşin	$A = 2.82 \times 10^4 c + 0.04$ (r=0.9941)	2.82×10^4	0.35 – 41.13
EGC	$A = 2.84 \times 10^4 c - 0.01$ (r=0.9994)	2.84×10^4	2.11 – 42.60
FLAVONLAR			
Luteolin	$A = 2.08 \times 10^4 c + 0.03$ (r=0.9952)	2.08×10^4	0.96 – 56.25
Rutin	$A = 2.84 \times 10^4 c + 0.03$ (r=0.9974)	2.84×10^4	0.70 – 41.20
DİĞERLERİ			
Askorbik asit	$A = 1.13 \times 10^4 c + 0.04$ (r=0.9995)	1.13×10^4	0.88 – 103.00
α-tokoferol	$A = 1.04 \times 10^4 c + 0.04$ (r=0.9963)	1.04×10^4	0.96 – 111.00
Troloks	$A = 7.80 \times 10^3 c + 0.004$ (r=0.9990)	7.80×10^3	0.12 – 112.00

4.1.5. Antioksidan Bileşiklerin TEAC Değerlerinin Belirlenmesi ve CUPRAC Yöntemiyle Karşılaştırılması

Antioksidan bileşiklerin SNPAC yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemine göre TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.2’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her iki yöntemle göre referans bileşik olarak kullanılan troloksun kalibrasyon doğru denklemleri ve molar absorptiviteyi aşağıda verilmiştir. Bu molar absorplama katsayıları kullanılarak antioksidan bileşiklerin TEAC katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

- SNPAC yöntemine göre;

$$A_{423} = 7.8 \times 10^3 C_{TR} + 0.004$$

$$r = 0.999$$

$$\epsilon_{TR} = 7.8 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$
- CUPRAC yöntemine göre;

$$A_{450} = 1.67 \times 10^4 C_{TR} - 3.72 \times 10^{-3}$$

$$r = 0.9997$$

$$\epsilon_{TR} = 1.67 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

SNPAC yöntemine göre gallik asidin TEAC katsayısı, gallik asidin molar absorptivitesi troloksun molar absorptivitesine oranlanarak bulunmaktadır.

$$\epsilon_{TR}: 7.8 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{GA}: 2.27 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{TEAC}_{GA} = \epsilon_{GA} / \epsilon_{TR} = 2.91$$

CUPRAC yöntemine göre gallik asidin TEAC katsayısı, gallik asidin molar absorptivitesi troloksun molar absorptivitesine oranlanarak bulunmaktadır.

$$\epsilon_{TR}: 1.67 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{GA}: 4.39 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{TEAC}_{GA} = \epsilon_{GA} / \epsilon_{TR} = 2.62$$

Tablo 4.2: Antioksidan bileşiklerin SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları^a.

Antioksidanlar	TEAC _{SNPAC}	TEAC _{CUPRAC} ^b
<i>BASİT FENOLİK ASİTLER</i>		
Gallik asit	2.91	2.62
<i>HİDROKSİSİNAMİK ASİTLER</i>		
Rosmarinik asit	5.02	5.30
Kafeik asit	2.47	2.80
Klorojenik asit	3.04	2.47
<i>FLAVONOLLER</i>		
Quercetin	3.83	4.38
Fisetin	3.62	3.90
<i>FLAVAN-3-OLLER</i>		
ECG	5.33	5.30
EGCG	4.24	4.88
EC	3.46	2.77
Kateşin	3.61	3.09
EGC	3.64	3.34
<i>FLAVONLAR</i>		
Luteolin	2.66	2.38
Rutin	3.64	2.56
<i>DİĞERLERİ</i>		
Askorbik asit	1.44	0.96
α -tokoferol	1.33	1.10
^a TEAC katsayıları; ($P = 0.05$, $F_{\text{exp}} = 1.487$, $F_{\text{crit (table)}} = 4.600$, $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit (table)}}$). ^b Veriler kaynak 2 ve 132'den alınmıştır. $TEAC_{\text{CUPRAC}} = 1.16 TEAC_{\text{SNPAC}} - 0.782$ ($r = 0.936$).		

4.1.6. Sentetik Antioksidan Karışım Çözeltilerinin SNPAC Yöntemine Göre TAC Ölçümü

Konsantrasyonları 0.1 mM olan antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda ikili, üçlü ve dördü karışımlar oluşturulup geliştirilen SNPAC yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve ölçülen antioksidan kapasiteleri 3.2 ve 3.3 denklemleri kullanılarak hesaplandı ve değerler birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.3). Sentetik antioksidan karışımlarının teorik olarak beklenen antioksidan kapasiteleri $\pm$ % 6.4'tür. Değerlerin uyumundan hareketle esas olarak Beer kanunundan kimyasal sapmalar yoktur ve antioksidan karışımları varlığında oluşan SNP'lerin plazmon absorbansları toplamsaldır.

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

Karışımın İçeriği	TAC _{bileşen} (mM TR-eşdeğeri)	TAC _{teorik} (mM TR-eşdeğeri)	TAC _{deneysel} (mM TR-eşdeğeri)
0.1 mL 0.1 mM GA 0.1 mL 0.1 mM CFA	1.38×10^{-2} 1.57×10^{-2}	2.95×10^{-2}	$(2.82 \pm 0.12) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM GA 0.1 mL 0.1 mM CT	1.38×10^{-2} 1.89×10^{-2}	3.27×10^{-2}	$(3.06 \pm 0.24) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM EGCG 0.1 mL 0.1 mM Ros A	1.61×10^{-2} 1.25×10^{-2}	2.86×10^{-2}	$(2.85 \pm 0.12) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM EGC 0.1 mL 0.1 mM Klo A	0.94×10^{-2} 0.84×10^{-2}	1.78×10^{-2}	$(1.78 \pm 0.15) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM GA 0.1 mL 0.1 mM CFA 0.1 mL 0.1 mM QR	1.38×10^{-2} 1.57×10^{-2} 1.92×10^{-2}	4.87×10^{-2}	$(4.56 \pm 0.22) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM Ros A 0.1 mL 0.1 mM Klo A 0.1 mL 0.1 mM EGCG	1.25×10^{-2} 0.84×10^{-2} 1.61×10^{-2}	3.70×10^{-2}	$(3.74 \pm 0.17) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM GA 0.1 mL 0.1 mM CFA 0.1 mL 0.1 mM CT 0.1 mL 0.1 mM LT	1.38×10^{-2} 1.57×10^{-2} 1.89×10^{-2} 1.38×10^{-2}	6.22×10^{-2}	$(6.20 \pm 0.06) \times 10^{-2}$
(P = 0.05, F _{deneysel} = 0.342, F _{kritik (tablo)} = 5.987, F _{deneysel} < F _{kritik (tablo)}).			

4.1.7. Yöntemin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımının Belirlenmesi

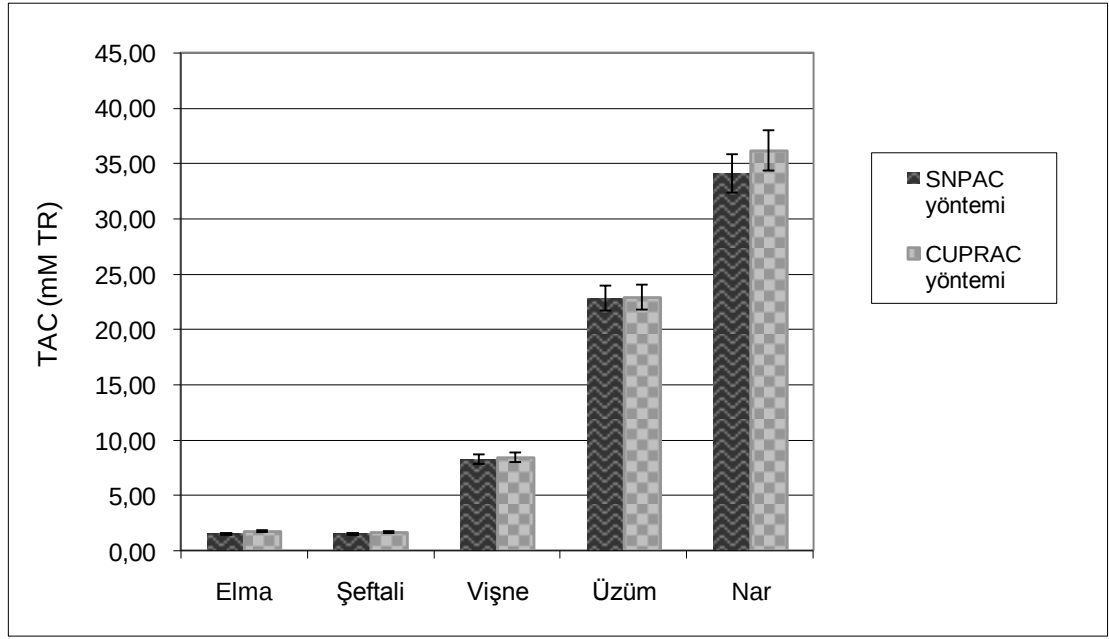
Geliştirilen SNPAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının belirlenebilmesi için yeşil çay ve zeytin yağı ekstraktlarına rutin, gallik asit ve kateşin standart çözeltilerinin katkısı yapıldı (Tablo 4.4). Bir tüpe 100 µL yeşil çay infüzyonu ve 150 µL, 0.1 mM RT, 100 µL, 0.1 mM GA veya 130 µL, 0.1 mM CT çözeltisi ilave edildi. Bir başka tüpe 100 µL zeytin yağı ekstraktı ve 130 µL, 0.1 mM CT çözeltisi ilave edildi. RT, GA ve CT katkısı yapılan çözeltilere ayrı ayrı SNPAC yöntemi uygulandı.

Tablo 4.4: Geliştirilen SNPAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı.

Eklenen kons. (µM)	Ortalama (µM)	Standart sapma, SD	Relatif standart sapma, RSD (%)	Geri kazanım (%) ^a
Yeşil Çaya RT Katkısı				
5.43	5.15 ± 0.09	0.04	0.78	94.8
10.86	10.42 ± 0.17	0.07	0.67	96.0
21.72	21.16 ± 0.20	0.08	0.38	97.4
Yeşil Çaya CT Katkısı				
3.66	3.48 ± 0.22	0.09	2.61	95.1
7.32	7.52 ± 0.19	0.08	1.06	102.7
14.64	14.82 ± 0.20	0.08	0.54	101.2
Yeşil Çaya GA Katkısı				
4.65	4.67 ± 0.22	0.09	1.93	100.2
9.30	9.14 ± 0.10	0.04	0.44	98.3
18.60	18.18 ± 0.17	0.07	0.36	97.7
Zeytin Yağına CT Katkısı				
3.66	3.38 ± 0.16	0.06	1.87	92.3
7.32	6.91 ± 0.12	0.05	0.72	94.4
14.64	14.07 ± 0.10	0.04	0.28	96.1
^a Geri kazanım (N = 3)				

4.1.8. SNPAC Yönteminin Bazı Meyve Sularına Uygulanması

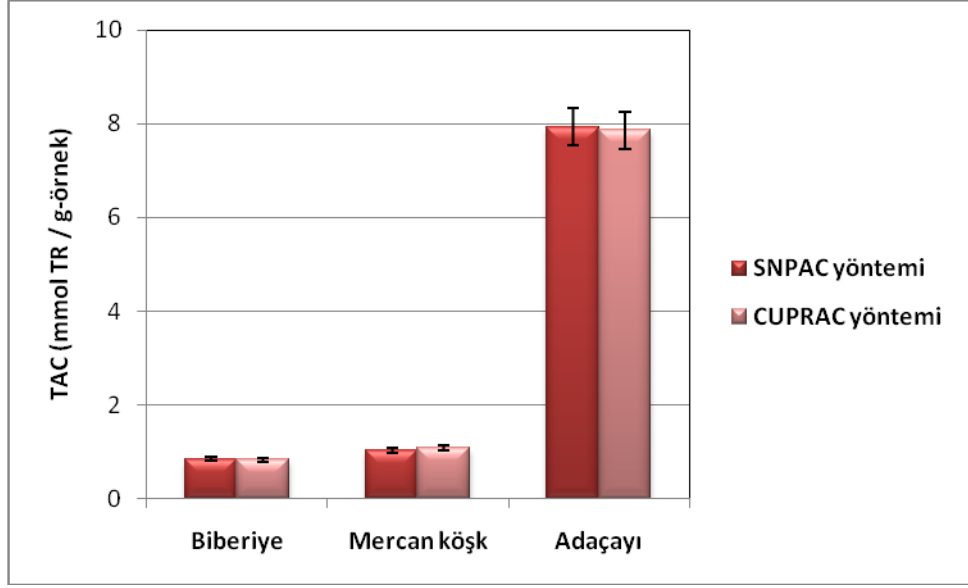
Geliştirilen yöntem elma, şeftali, vişne, üzüm ve nar suyuna uygulandı. Meyve sularının toplam antioksidan kapasiteleri geliştirilen SNPAC yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemi uygulanarak belirlendi. Şekil 4.10'da bu meyve sularının TAC_{SNPAC} ve TAC_{CUPRAC} değerleri Troloks eşdeğeri (mM TR) olarak verildi.



Şekil 4.10: Bazı meyve sularının SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mM-TR eşdeğeri). ($P = 0.05$, $F_{\text{deneysel}} = 0.775$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 7.709$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$.)

4.1.9. SNPAC Yöntemi ile Bazı Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Geliştirilen yöntem biberiye, mercan köşk ve adaçayı gibi bitki ekstrelerine uygulandı. Bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri geliştirilen SNPAC yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemi uygulanarak belirlendi. Şekil 4.11’de bu bitki ekstrelerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri Troloks eşdeğeri (mmol TR /g-örnek) olarak diyagram ile gösterildi. Ayrıca Tablo 4.5’te bu bitki ekstrelerinin TAC_{SNPAC} ve TAC_{CUPRAC} değerleri Troloks eşdeğeri (mmol TR /g-örnek) olarak verildi.



Şekil 4.11: Bazı bitki ekstrlerinin SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre ölçülen karşılaştırmalı TAC değerleri (mmol TR/g-örnek eşdeğeri).

Tablo 4.5: Bazı bitki ekstrlerinin SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasiteleri.

Bitki ekstrleri	SNPAC yöntemi (mmol TR / g-örnek)	CUPRAC yöntemi (mmol TR / g-örnek)
Biberiye	0.85 ± 0.011	0.83 ± 0.006
Mercanköşk	1.02 ± 0.004	1.09 ± 0.011
Adaçayı	7.93 ± 0.024	7.86 ± 0.110

4.1.10. İnterferans Çalışmaları

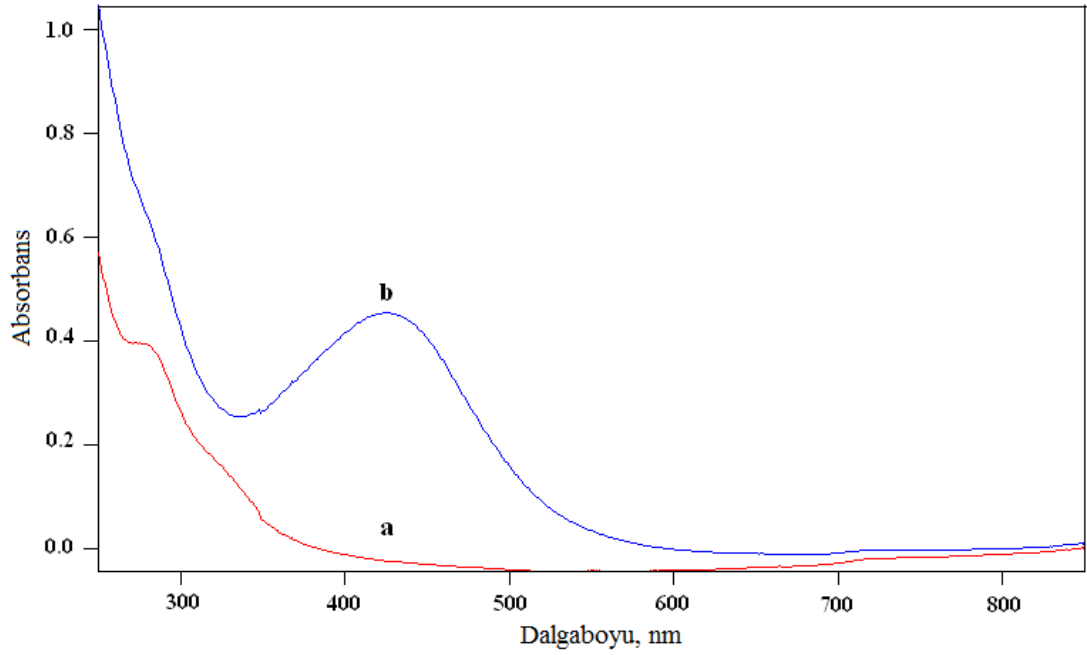
Meyve sularında yaygın olarak bulunan türlerin enterfere edici etkileri incelendi. SNPAC yöntemi uygulanarak 7.14 μ M antioksidan tayininde 1000 kat (mol/mol olarak) enterfere edici tür varlığında çalışıldı. Tablo 4.6’da 7.14 μ M antioksidan (etanollü çözeltisi) tayininde meyve sularında bulunması mümkün olabilen türlerin enterfere edici etkileri gösterilmiştir. Geliştirilen SNPAC yöntemi uygulanarak elma suyu ve siyah çay infüzyonunun TAC ölçümüne mümkün olan enterferans etkileri incelendi (Şekil 4.12 ve 4.13).

Tablo 4.6: SNPAC analizinde gıda örneklerinde bulunan çeşitli bileşenlerin etkileri^a.

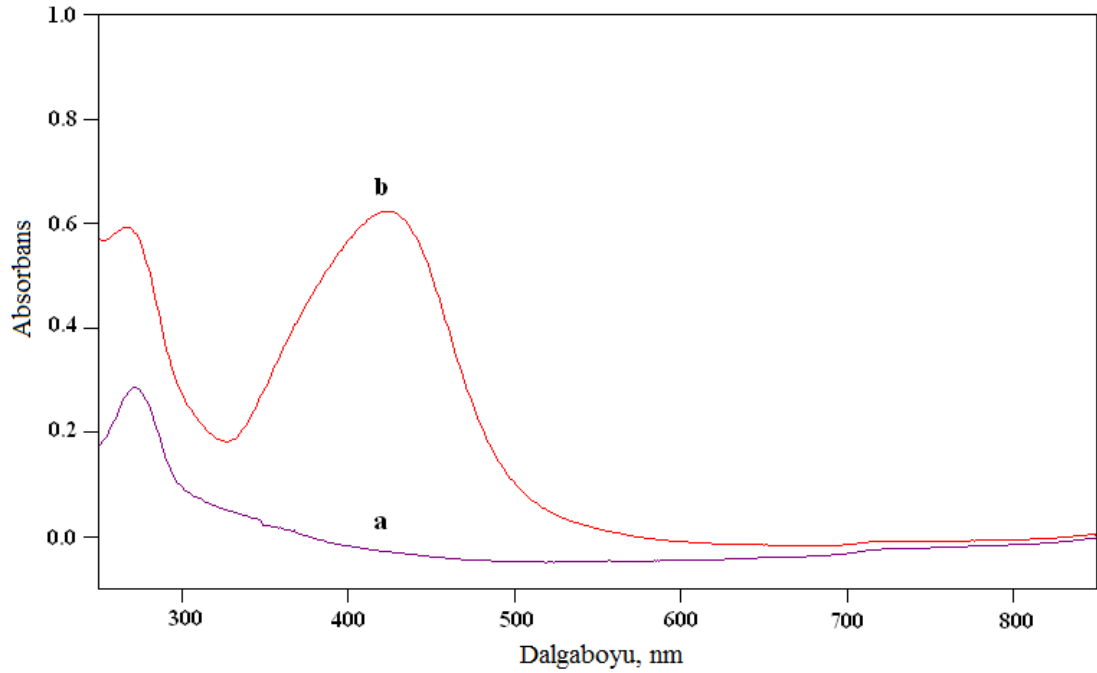
İnterferans	İnterferans/QR mol oranı	SNPAC analizinde enterferans varlığı (+) veya yokluğu (-)
Okzalat	1000	–
Tartarat	1000	–
Sitrat	1000	–
Glukoz	1000	–
Malik asit	1000	–
Fumarik asit	1000	–
Fruktoz	1000	–
Galaktoz	1000	–
Serin	1000	–
Glisin	1000	–
Alanin	1000	–
Tartarik asit ^b	1000	+

^aQR ve enterferans bileşiklerin son çözeltideki konsantrasyonları sırasıyla 7.14 μ M ve 7.14 mM.

^bTartarik asidin enterfere edici etkisi QR + tartarik asit karışımının pH'ı 6'ya ayarlanarak bertaraf edilmiştir.



Şekil 4.12: (a) Elma suyu, (b) Elma suyu + SNP'den oluşan olası karışımların UV-görünür bölge spektrumları.



Şekil 4.13: (a) Siyah çay, (b) Siyah çay + SNP'den oluşan olası karışımların UV-görünür bölge spektrumları.

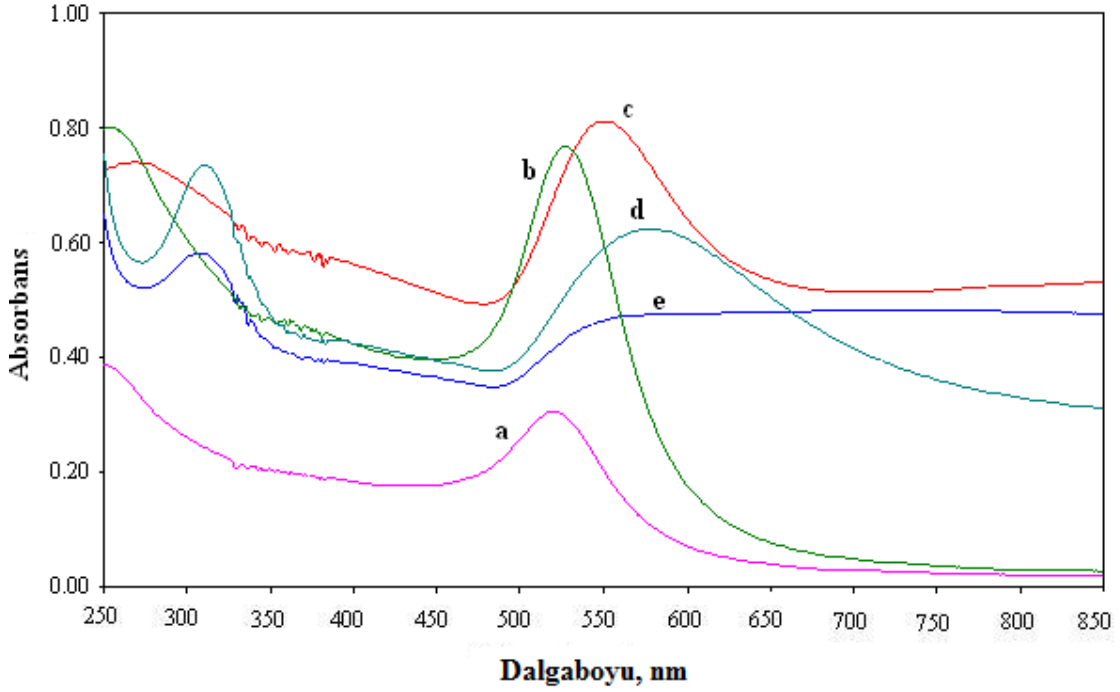
4.2. TİYOL GRUBU ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE DUYARLI DTNB-AU-NP ESASLI YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

4.2.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

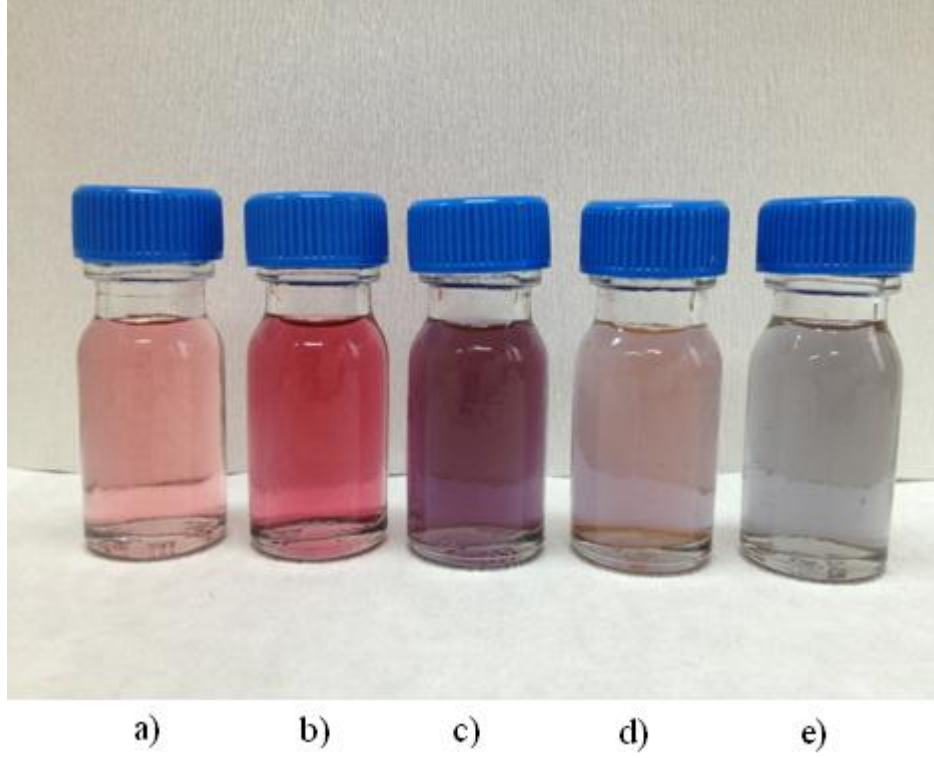
4.2.1.1. Altın Nanoparçacık Sentezinde HAuCl_4 ve Trisodyum Sitrat Konsantrasyonunun Etkisi

Sentezlenen altın nanoparçacığın plazmon absorbansı üzerinde tetrakloroaurat asidi konsantrasyonunun etkisi incelendi (Şekil 4.14). % 0.002 ve % 0.01 HAuCl_4 konsantrasyonu aralığında çalışıldı. Şekil 4.14'te % 0.002 - 0.01 konsantrasyon aralığındaki HAuCl_4 çözeltileri ile % 1 trisodyum sitrat varlığında hazırlanan altın nanoparçacıkların görünür bölge spektrumları verilmiştir. Şekil 4.15'te ise hazırlanan bu altın nanoparçacıkların görüntüleri verilmiştir. % 0.002 HAuCl_4 çözeltisi ile hazırlanan Au-NP'nin rengi açık kırmızı, % 0.004 HAuCl_4 çözeltisi ile hazırlanan Au-NP'nin rengi

koyu kırmızıdır. % 0.006 ve daha yüksek konsantrasyonlarda HAuCl_4 ile oluşan Au-NP'lerin yığılması sebebiyle çözeltide bulanıklaşma ve elde edilen spektrumlarında maksimum absorpsiyon yaptığı dalgalarda kayma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15). Buna göre, optimum HAuCl_4 konsantrasyonu % 0.002 olarak belirlendi.

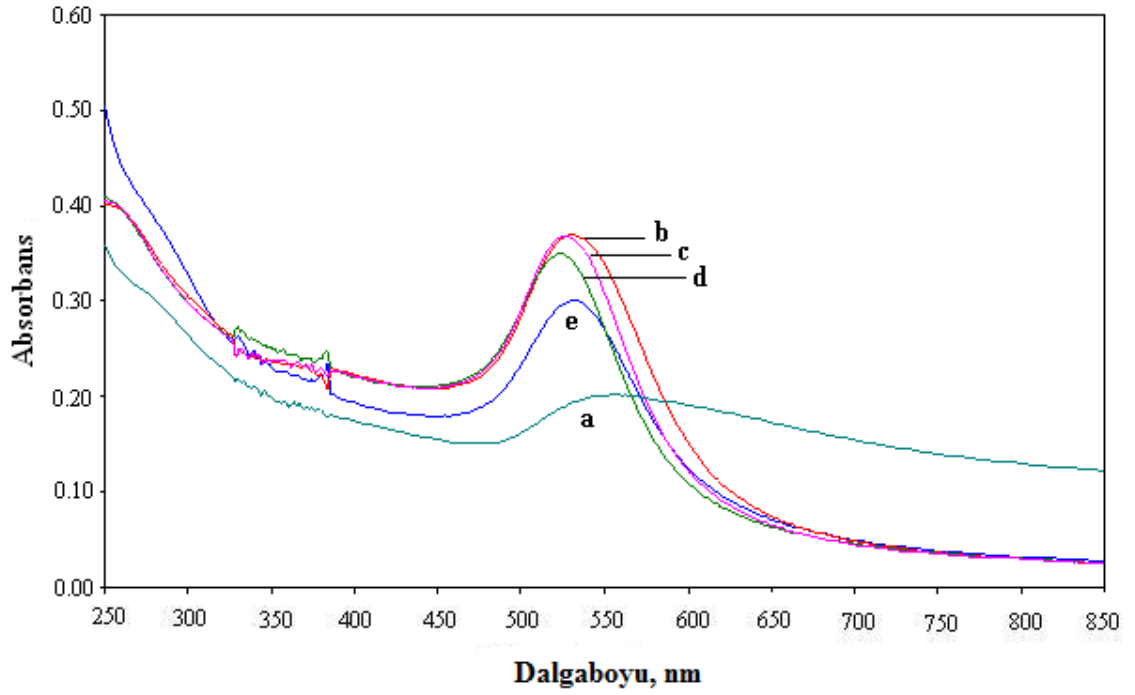


Şekil 4.14: Farklı HAuCl_4 konsantrasyonları ile hazırlanan Au-NP'lerin görünür bölge spektrumları: (a) % 0.002 , (b) % 0.004, (c) % 0.006, (d) % 0.008, (e) % 0.01 HAuCl_4 .

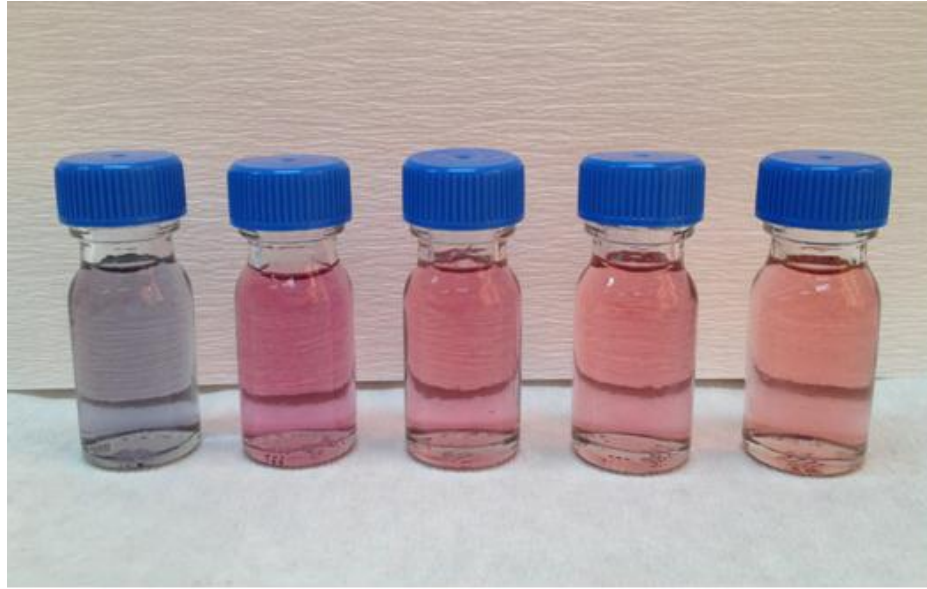


Şekil 4.15: Farklı HAuCl_4 konsantrasyonları ile hazırlanan Au-NP'lerin görüntüleri: (a) % 0.002 , (b) % 0.004, (c) % 0.006, (d) % 0.008, (e) % 0.01 HAuCl_4 .

Altın nanoparçacık hazırlanmasında farklı trisodyum sitrat konsantrasyonunun etkisi incelendi (Şekil 4.16 ve 4.17). Reflüks altında ısıtılan % 0.002 HAuCl_4 üzerine 0.1 – 0.5 mL aralığında % 1'lik trisodyum sitrat ilave edildi. 0.1 mL trisodyum sitrat ilavesinde gri renkli bir sol çözeltisi meydana geldi. 0.2 mL'den 0.5 mL'ye artan trisodyum sitrat ilavesinde ise oluşan Au-NP'lerin (açık kırmızı renkli) absorbandsında ufak bir azalma meydana geldi. Buna göre ilave edilen optimum trisodyum sitrat hacmi 0.5 mL olarak belirlendi.



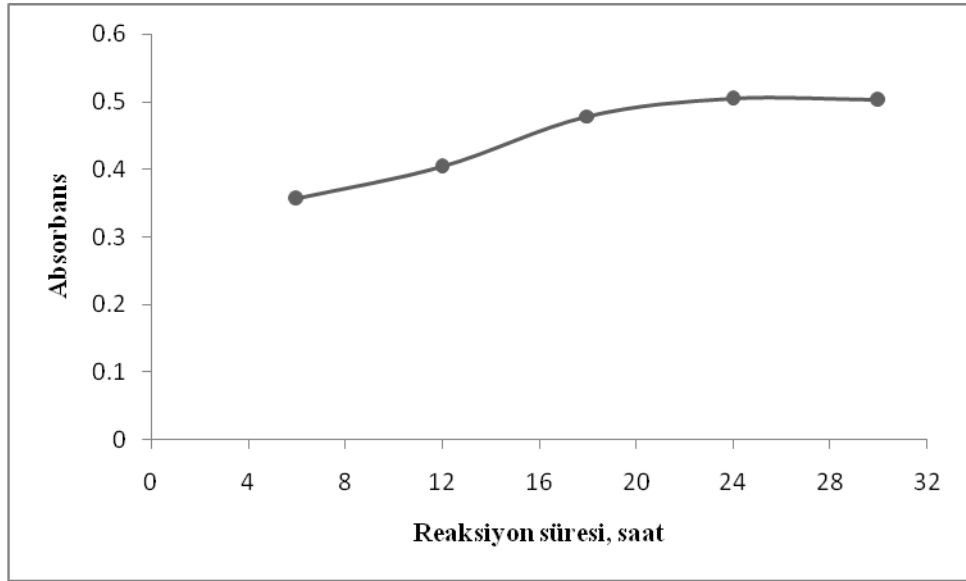
Şekil 4.16: Farklı hacimlerde % 1'lik trisodyum sitrat ile hazırlanan Au-NP'lerin görünür bölge spektrumları: (a) 0.1 , (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.4, (e) 0.5 mL trisodyum sitrat.



Şekil 4.17: % 1'lik trisodyum sitrat çözeltisinin farklı hacimleri ile hazırlanan Au-NP'lerin görüntüleri: (a) 0.1 , (b) 0.2, (c) 0.3, (d) 0.4, (e) 0.5 mL trisodyum sitrat.

4.2.1.2. DTNB-Au-NP Hazırlanmasında Reaksiyon Süresi ve İlave Edilen DTNB Konsantrasyonunun Belirlenmesi

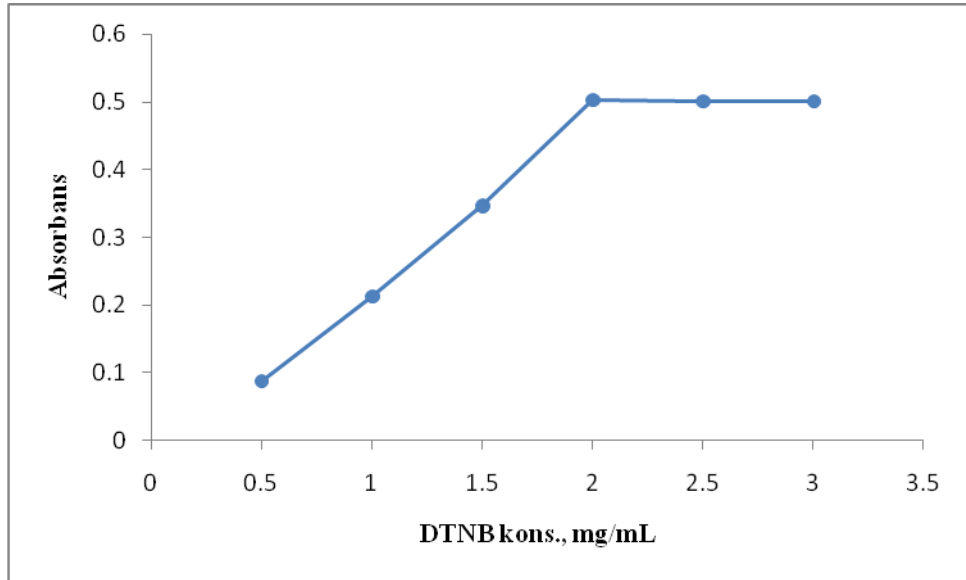
DTNB-Au-NP esaslı yöntemde kullanılan DTNB bağlı Au-NP'lerin hazırlanmasında; sentezlenen altın nanoparçacığa ilave edilen DTNB farklı sürelerde bekletilerek reaksiyon süresinin etkisi incelendi (Şekil 4.18). Sentezlenen altın nanoparçacık üzerine DTNB (2 mg/mL) ilave edilerek 6, 12, 18, 24 ve 30 saat bekletildi. Santrifüj ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra hazırlanan DTNB-Au-NP'ler kullanılarak DTNB-Au-NP esaslı yöntem uygulandı. Şekil 4.18'de farklı reaksiyon sürelerinde hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile 33.3 μ M sistein varlığında oluşan TNB absorbanslarının değişimi verilmiştir. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi 6 ve 24 saat arasında oluşan TNB'lerin absorbansı artmıştır. En yüksek TNB absorbansı, 24 saatlik bekletme süresinde hazırlanan DTNB-Au-NP'lerde gözlenmiştir. 30 saatlik reaksiyon süresinde ise TNB absorbansı sabit kalmıştır. Buna göre, DTNB-Au-NP hazırlanmasında optimum reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlendi.



Şekil 4.18: Farklı reaksiyon sürelerinde hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile sistein varlığında oluşan TNB'lerin absorbans değişimi.

DTNB-Au-NP esaslı yöntemde kullanılan DTNB bağlı Au-NP'ler, sentezlenen altın nanoparçacığa farklı konsantrasyonlarda DTNB ilave edilerek hazırlandı ve ilave edilen DTNB konsantrasyonunun DTNB-Au-NP esaslı yöntem üzerine etkisi incelendi (Şekil

4.19). Sentezlenen altın nanoparçacık üzerine 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 mg/mL DTNB ilave edilerek 24 saat bekletildi. Santrifüj ve dondurarak kurutma işlemlerinden sonra hazırlanan DTNB-Au-NP'ler kullanılarak DTNB-Au-NP esaslı yöntem uygulandı. Şekil 4.19'de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile 33.3 μ M sistein varlığında oluşan TNB absorbanslarının değişimi verilmiştir. Şekil 4.19'de görüldüğü gibi 0.5-2.0 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda DTNB varlığında oluşan TNB'lerin absorbansı artmıştır. En yüksek TNB absorbansı 2.0 mg/mL DTNB konsantrasyonunda gözlenmiştir. 2.5 mg/mL DTNB konsantrasyonunda ise TNB absorbansında ufak bir azalma ve sonrasında sabitlenme meydana gelmiştir. Buna göre, DTNB-Au-NP hazırlanmasında ilave edilen optimum DTNB konsantrasyonu 2.0 mg/mL DTNB olarak belirlendi.

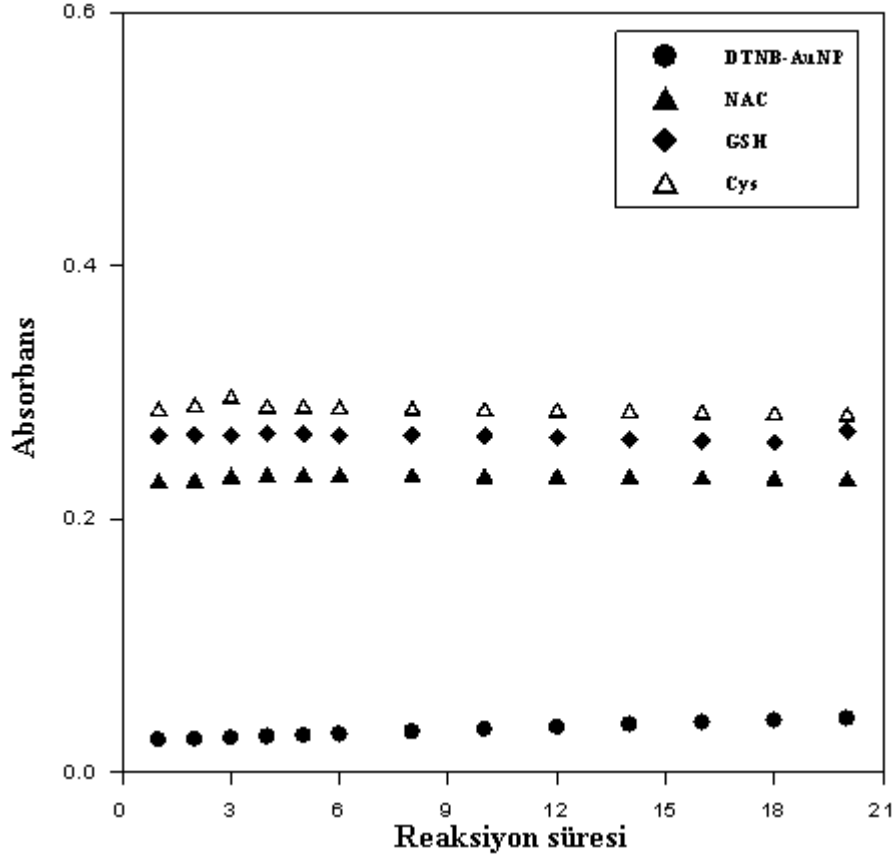


Şekil 4.19: Farklı DTNB konsantrasyonlarında hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile sistein varlığında oluşan TNB'lerin absorbans değişimi.

4.2.1.3. DTNB-Au-NP Esaslı Yöntemde İnkübasyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi

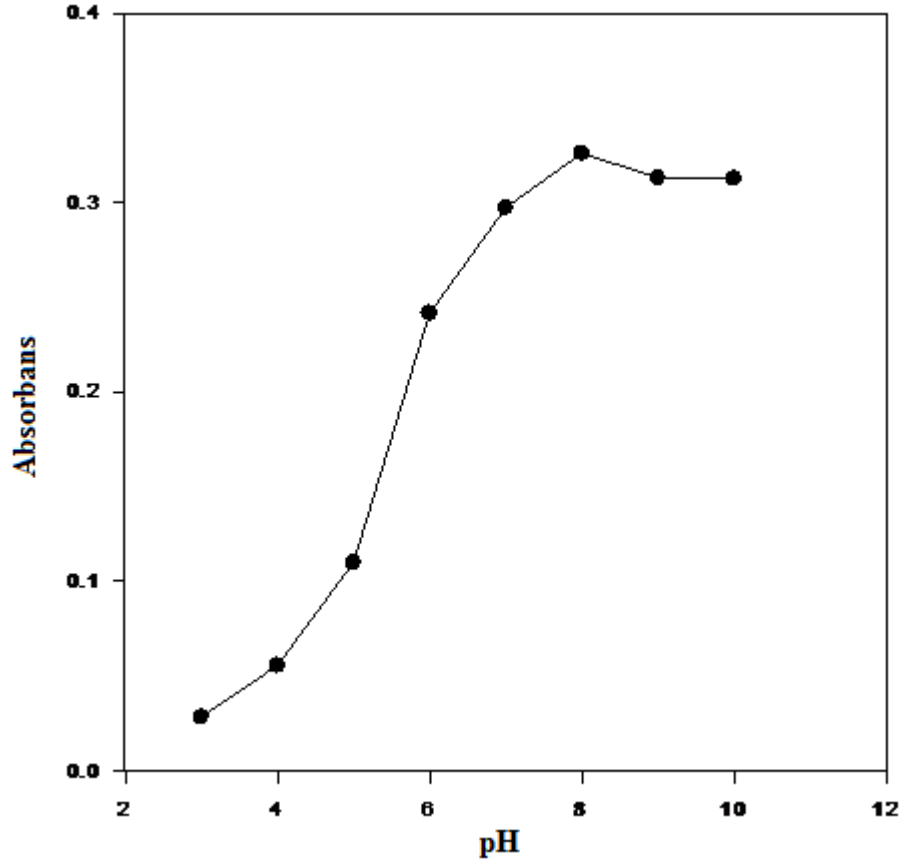
DTNB-Au-NP esaslı yöntemde; sentezlenen altın nanoparçacıklar ile hazırlanan DTNB bağlı Au-NP'ler ile tiyol tayininin optimum deney koşulları belirlenmiştir. Bir tüpe 1.1 mL DTNB-Au-NP çözeltisi, x mL tiyol çözeltisi ve (1.9-x) mL pH 8, Tris-HCl tamponu; bir diğer tüpe 1.1 mL DTNB-Au-NP çözeltisi ve 1.9 mL pH 8, Tris-HCl tamponu ilave edilip karıştırıldıktan sonra 20 dakika boyunca antioksidan varlığında ve

yokluğunda oluşan TNB'deki zamana bağlı değişim 410 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak incelendi. Farklı tiyol antioksidanları (NAC, GSH ve Cys) ile çalışıldı ve optimum reaksiyon süresi 5 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: DTNB-Au-NP (referans) ve NAC, GSH, Cys varlığında DTNB-Au-NP'nin bu tiyoller ile reaksiyonu sonucu oluşan TNB'nin reaksiyon süresine bağlı olarak değişimi.

DTNB-Au-NP esaslı yöntemle göre; aynı deneysel koşullar altında ve sistein varlığında oluşan TNB üzerine pH'ın etkisini incelemek için pH 3-10 aralığında çalışıldı. Farklı pH ortamlarında absorbansın değişimi incelendi. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi pH 3 ve 8 arasında sistein varlığında oluşan TNB'nin absorbansı artmıştır. pH 9 ve 10'da oluşan TNB'nin absorbansı azalmıştır. En yüksek TNB absorbansı pH 8'de gözlenmiştir. Buna göre, optimum çalışma pH'ı 8 olarak belirlendi.

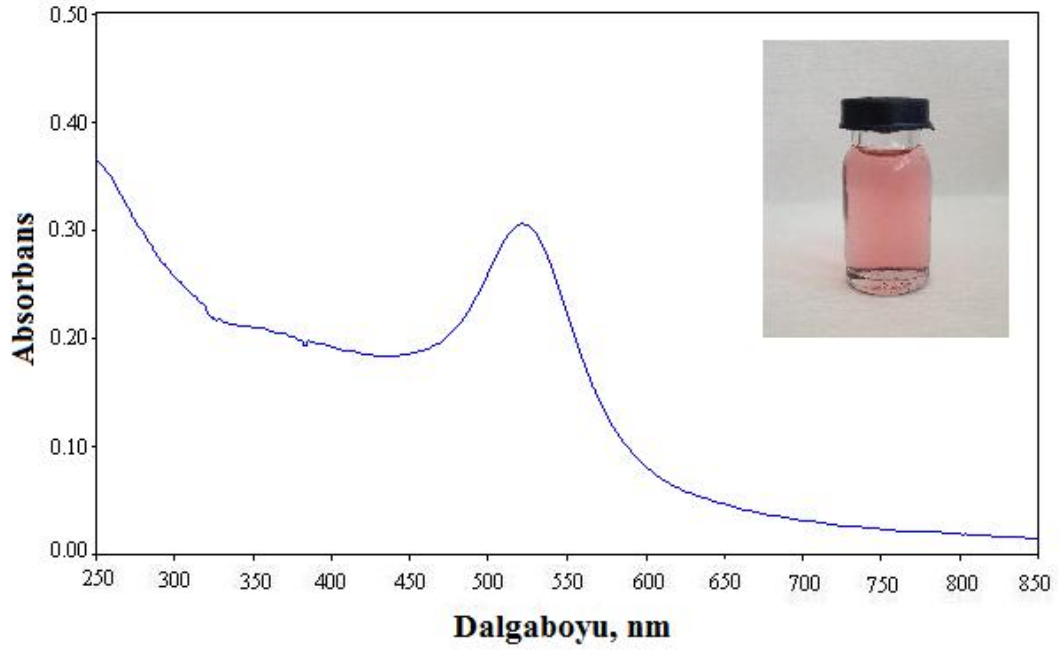


Şekil 4.21: Sistein varlığında oluşan TNB'ye pH'ın etkisi.

4.2.2. Sentezlenen Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

4.2.2.1. Spektrofotometrik Karakterizasyonu

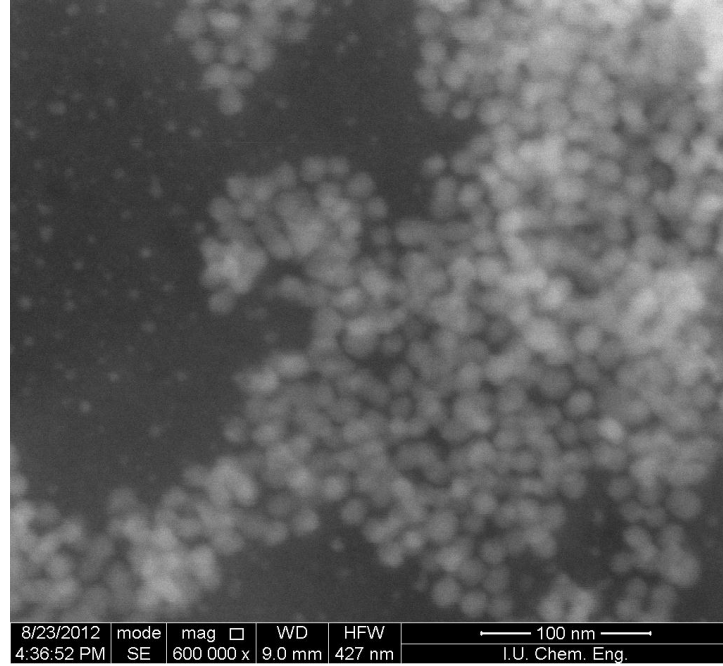
% 0.002 HAuCl_4 ve % 1'lik trisodyum sitrat ile reflüks altında sentezlenen altın nanoparçacığın görünür bölge spektrumu ve görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 4.22). Sentezlenen altın nanoparçacıkların UV-görünür bölge absorpsiyon ölçümleri için dalgaboyu, yüzey plazmon rezonansının (SPR) maksimum olduğu 520 nm olarak belirlenmiştir. Küresel kırmızı nanoparçacıklar karakteristik bir kırmızı renge sahiptir.



Şekil 4.22: Sentezlenen altın nanoparçacığının UV-görünür bölge spektrumu (λ_{max} : 520 nm) ve rengi.

4.2.2.2. SEM Analizi ile Karakterizasyonu

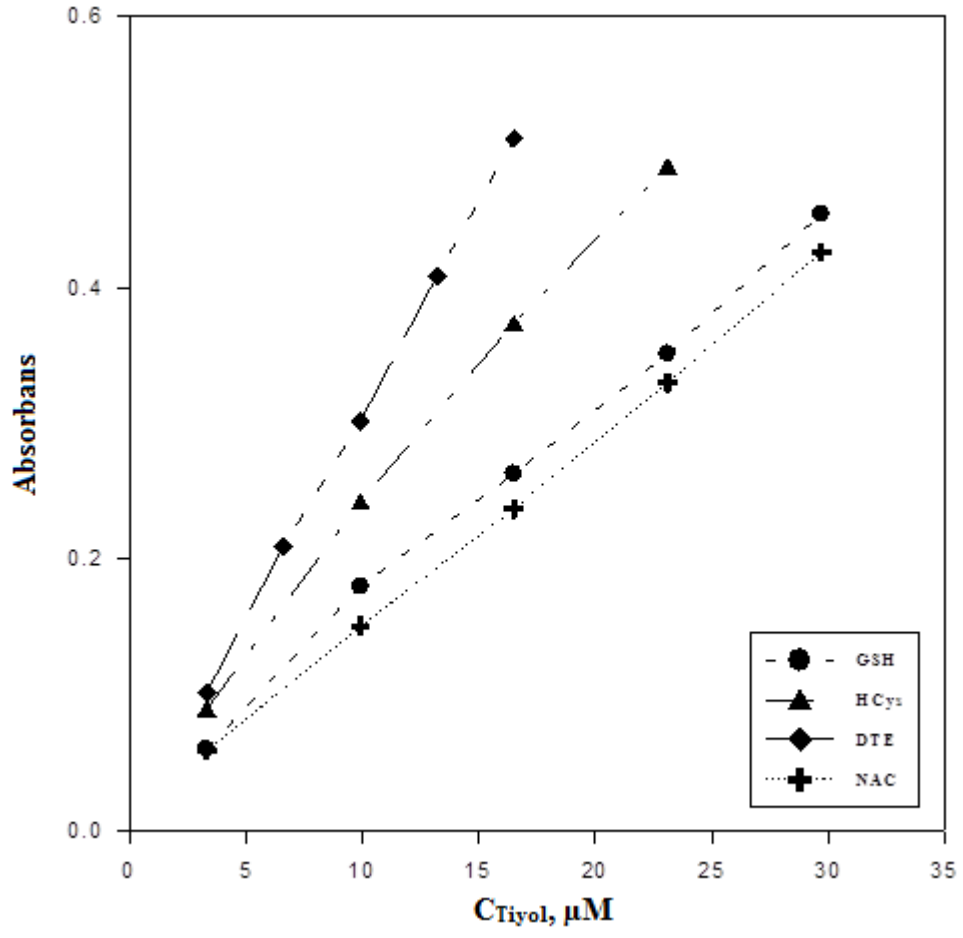
Sentezlenen altın nanoparçacıkların SEM görüntüsü aşağıda (Şekil 4.23) verilmiştir. Buna göre trisodyum sitrat varlığında Au (III)'ün Au (0)'a indirgenmesi sonucu oluşan altın nanoparçacıkların küre şeklinde, tek düze (uniform) dağılımlı ve uygun boyut dağılımında homojen parçacıklar olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Trisodyum sitrat varlığında sentezlenen Au-NP'lerin ortalama boyutu 16 nm'dir.



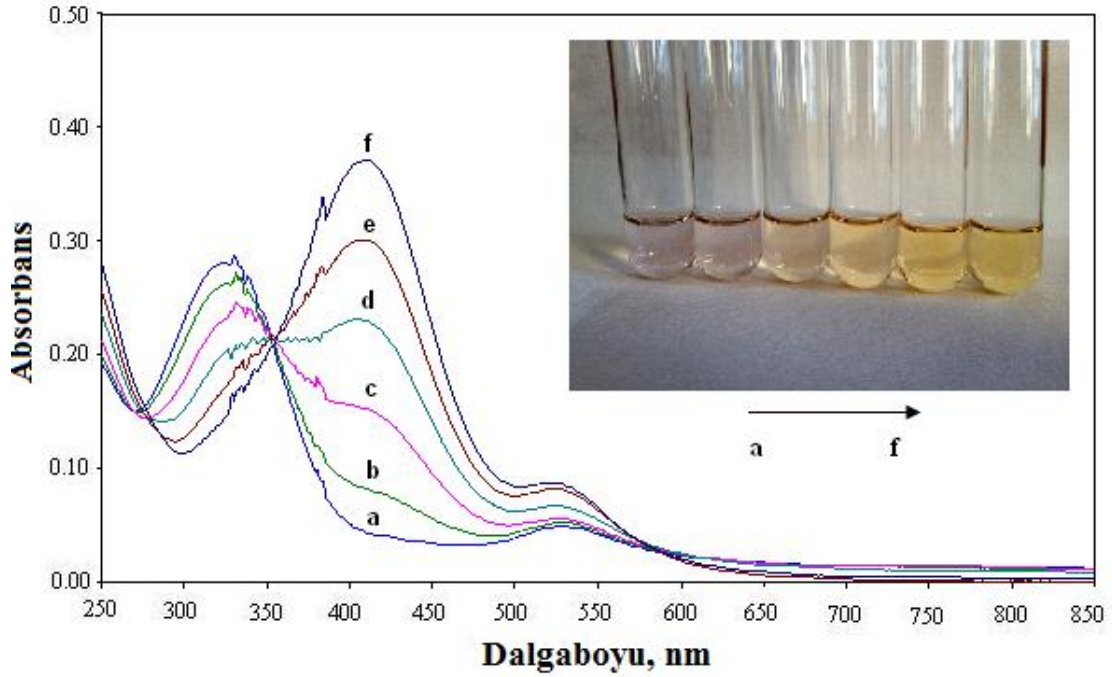
Şekil 4.23: Trisodyum sitrat ile sentezlenen Au-NP'lerin SEM görüntüsü.

4.2.3. Tiyol Grubu Antioksidan Bileşiklerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi

DTNB-Au-NP esaslı yöntem uygulanan bazı tiyol grubu bileşiklerden glutatyon, homosistein, 1,4-ditiyoeritritol ve N-asetil sisteinin DTNB-Au-NP esaslı yöntemle göre kalibrasyon grafikleri (Şekil 4.24) aşağıda verilmiştir. DTNB-Au-NP esaslı yöntemle göre, farklı sistein konsantrasyonlarında Au-NP'ye bağlı DTNB ile reaksiyonun bir sonucu olarak oluşan TNB'nin görünür bölge spektrumları ve meydana gelen renk değişimi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.24: TiyoI grubu antioksidan bileşiklerden seçilen glutatyon, homosistein, 1,4-ditiyoeritritol ve N-asetil sisteinin DTNB-Au-NP yöntemine göre kalibrasyon grafikleri.



Şekil 4.25: Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemine göre farklı Cys konsantrasyonları varlığında oluşan TNB'nin görünür bölge spektrumu: (a) 0, (b) 6.6, (c) 13.2, (d) 19.8, (e) 26.4, (f) 33.0 μ M ve renk değişimi.

4.2.4. TiyoL Grubu Antioksidan Bileşiklerin DTNB-Au-NP Esaslı Yöntem ile Molar Absorblama Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi

TiyoL grubu antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ) DTNB-Au-NP esaslı yöntemle göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.7). Lineer kalibrasyon doğrularındaki sembollerden c: molar konsantrasyon, A: absorbans ve r: korelasyon katsayısı karşılığıdır.

Tablo 4.7: Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları.

Tiyoller	Lineer denklem ve korelasyon katsayısı (r)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Lineer aralık (μM)
Glutatyon	$A = 1.45 \times 10^4 c + 0.022$ ($r = 0.9982$)	1.45×10^4	0.55 – 29.40
Sistein	$A = 1.49 \times 10^4 c + 0.019$ ($r = 0.9973$)	1.49×10^4	0.40 – 29.00
N-asetil sistein	$A = 1.43 \times 10^4 c + 0.008$ ($r = 0.9996$)	1.43×10^4	0.82 – 30.90
Homosistein	$A = 1.96 \times 10^4 c + 0.038$ ($r = 0.9979$)	1.96×10^4	0.61 – 20.96
Sisteamin	$A = 8.67 \times 10^3 c - 0.007$ ($r = 0.9999$)	8.67×10^3	0.58 – 52.69
1,4-Ditiyoeritritol	$A = 3.07 \times 10^4 c + 0.001$ ($r = 0.9995$)	3.07×10^4	0.02 – 14.60
Dihidrolipoik asit	$A = 2.06 \times 10^4 c + 0.015$ ($r = 0.9960$)	2.06×10^4	0.24 – 21.06

4.2.5. Tiyol Grubu Antioksidan Bileşiklerin CETC Değerlerinin Belirlenmesi ve Orjinal Ellman Yöntemiyle Karşılaştırılması

Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP esaslı yöntem ve referans yöntem olan orjinal Ellman yöntemine göre CETC (Sistein Eşdeğeri Tiyol İçeriği) katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.8’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her iki yönteme göre referans bileşik olarak kullanılan sisteinin kalibrasyon doğru denklemleri ve molar absorptivite aşağıda verilmiştir. Bu molar absorplama katsayıları kullanılarak tiyol grubu antioksidan bileşiklerin CETC katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.8’de verilmiştir.

- DTNB-Au-NP yöntemine göre;

$$A_{410} = 1.49 \times 10^4 C_{\text{Cys}} + 0.019$$

$$r = 0.9973$$

$$\epsilon_{\text{Cys}} = 1.49 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

- Orjinal Ellman yöntemine göre;

$$A_{412} = 1.42 \times 10^4 C_{\text{Cys}} + 0.004$$

$$r = 0.9999$$

$$\epsilon_{\text{Cys}} = 1.42 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

DTNB-Au-NP yöntemine göre glutatyonun CETC katsayısı, glutatyonun molar absorptivitesi sisteinin molar absorptivitesine oranlanarak bulunmaktadır.

$$\begin{aligned}\epsilon_{\text{Cys}} &: 1.49 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{\text{GSH}} &: 1.45 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \\ \text{CETC}_{\text{GSH}} &= \epsilon_{\text{GSH}} / \epsilon_{\text{Cys}} = 0.97\end{aligned}$$

Orijinal Ellman yöntemine göre glutatyonun CETC katsayısı, glutatyonun molar absorptivitesi sisteinin molar absorptivitesine oranlanarak bulunmaktadır.

$$\begin{aligned}\epsilon_{\text{Cys}} &: 1.42 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{\text{GSH}} &: 1.33 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \\ \text{CETC}_{\text{GSH}} &= \epsilon_{\text{GSH}} / \epsilon_{\text{Cys}} = 0.94\end{aligned}$$

Tablo 4.8: Tiyoil grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP ve orijinal Ellman yöntemlerine göre CETC katsayıları^a.

Tiyoller	CETC (DTNB-Au-NP)	CETC (Orjinal Ellman)
Glutatyon	0.97	0.94
Sistein	1.00	1.00
N-asetil sistein	0.96	0.88
Homosistein	1.32	1.08
Sisteamin	0.58	0.35
1,4-Ditiyoeritritol	2.06	2.05
Dihidrolipoik asit	1.38	1.44
^a CETC katsayıları; (P = 0.05, F _{exp} = 3.038, F _{crit (table)} = 5.987, F _{exp} < F _{crit (table)}). CETC _{DTNB-Au-NP} = 0.872 TEAC _{Ellman} + 0.22 (r = 0.979).		

4.2.6. Tiyol Grubu Antioksidan Bileşiklerin LOD Değerlerinin DTNB-Au-NP ve Orjinal Ellman Yöntemlerine Göre Karşılaştırılması

Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin geliştirilen DTNB-Au-NP esaslı yöntem ve referans yöntem olan orjinal Ellman yöntemine göre elde edilen LOD değerleri belirlenmiş ve Tablo 4.9’da karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Tablo 4.9: Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP ve orijinal Ellman yöntemlerine göre hesaplanan LOD değerleri.

Tiyoller	LOD (μM) (DTNB-Au-NP)	LOD (μM) (Orjinal Ellman)
Glutatyon	0.32	1.42
Sistein	0.31	0.80
N-asetil sistein	0.26	1.66
Homosistein	0.23	2.47
Sisteamin	0.36	2.65
1,4-Ditiyoeritritol	0.02	0.54
Dihidrolipoik asit	0.22	1.45

4.2.7. Sentetik Tiyol Grubu Antioksidan Karışım Çözeltilerinin DTNB-Au-NP Yöntemine Göre TTC Ölçümü

Konsantrasyonları 0.1 mM olan tiyol grubu antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar oluşturulup geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve ölçülen toplam tiyol içerikleri (TTC) 3.7 ve 3.8 denklemleri kullanılarak hesaplandı ve değerler birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.10). Değerlerin uyumundan hareketle esas olarak Beer kanunundan kimyasal sapmalar yoktur ve tiyol grubu antioksidan karışımları varlığında oluşan TNB’nin absorbansları toplamsaldır.

Tablo 4.10: Sentetik tiyol grubu antioksidan karışım çözeltilerinin DTNB-Au-NP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TTC değerlerinin karşılaştırılması.

Karışımın İçeriği	TTC _{bileşen} (mM Cys-eşdeğeri)	TTC _{teorik} (mM Cys-eşdeğeri)	TTC _{deneysel} (mM Cys-eşdeğeri)
0.3 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM DTE 0.1 mL 0.1 mM HCys	1.05×10^{-2} 0.75×10^{-2} 0.55×10^{-2}	2.35×10^{-2}	$(2.35 \pm 0.05) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM DTE 0.1 mL 0.1 mM GSH 0.1 mL 0.1 mM NAC	0.75×10^{-2} 0.45×10^{-2} 0.58×10^{-2}	1.78×10^{-2}	$(1.84 \pm 0.03) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM DTE 0.1 mL 0.1 mM HCys 0.1 mL 0.1 mM NAC	0.75×10^{-2} 0.55×10^{-2} 0.58×10^{-2}	1.88×10^{-2}	$(1.85 \pm 0.02) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM DTE 0.1 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM GSH	0.75×10^{-2} 0.35×10^{-2} 0.45×10^{-2}	1.55×10^{-2}	$(1.62 \pm 0.04) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM DTE 0.1 mL 0.1 mM HCys 0.1 mL 0.1 mM GSH	0.75×10^{-2} 0.55×10^{-2} 0.45×10^{-2}	1.75×10^{-2}	$(1.85 \pm 0.07) \times 10^{-2}$
0.1 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM NAC 0.1 mL 0.1 mM GSH	0.35×10^{-2} 0.58×10^{-2} 0.45×10^{-2}	1.38×10^{-2}	$(1.36 \pm 0.01) \times 10^{-2}$
(P = 0.05, F _{deneysel} = 1.875, F _{kritik (tablo)} = 6.608, F _{deneysel} < F _{kritik (tablo)}).			

4.2.8. Yöntemin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımının Belirlenmesi

Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının belirlenebilmesi için doku homojenatlarına glutatyon, N-asetil sistein ve sisteamin standart çözeltilerinin katkısı yapıldı (Tablo 4.11). Bir tüpe 0.1 mL karaciğer homojenatı ve 0.1 mM GSH çözeltisinin 0.3 mL'si, 0.1 mM NAC çözeltisinin 0.3 mL'si veya 1 mM CA çözeltisinin 0.5 mL'si ilave edildi. GSH, NAC ve CA katkısı yapılan çözeltilere ayrı ayrı DTNB-Au-NP yöntemi uygulandı.

Tablo 4.11: Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı.

Doku homojenatlarına tiyol katkısı	Eklenen kons. (μM)	Ortalama (μM)	S.D. ^a	R.S.D. ^b (%)	REC ^c (%)
Karaciğer homojenatına GSH katkısı	10.00	9.74 $\pm$ 0.22	0.09	0.98	97.4
Karaciğer homojenatına NAC katkısı	10.00	9.69 $\pm$ 0.15	0.06	0.62	96.9
Karaciğer homojenatına CA katkısı	16.70	15.70 $\pm$ 0.37	0.15	0.95	94.0
^a Standart sapma; ^b Relatif standart sapma; ^c Geri kazanım (N= 3).					

4.2.9. DTNB-Au-NP Yönteminin Farmasötik İlaçlara Uygulanması

Geliştirilen yöntem Brunac göz damlası, Trom ve Mentopin efervesan tabletler, Glutasyon tablet ve Primene aminoasit solüsyonuna başarılı bir şekilde uygulandı. Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi, orjinal Ellman yöntemi ve HPLC yöntemine göre bu farmasötik ilaçların tiyol içerikleri ve bu yöntemlerle elde edilen geri kazanımlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.12: DTNB-Au-NP, orjinal Ellman ve HPLC yöntemlerine göre bazı farmasötik örneklerin tiyol içerikleri ve elde edilen geri kazanımlar.

İlaç örnekleri	DTNB-AuNP yöntemi		Orjinal Ellman yöntemi		HPLC yöntemi	
	Ortalama (mg)	REC (%)	Ortalama (mg)	REC (%)	Ortalama (mg)	REC (%)
GSH Tablet (50 mg)	47.8 $\pm$ 0.38	95.6	43.8 $\pm$ 0.38	87.6	49.5 $\pm$ 0.53	98
Mentopin efervesan tablet (600 mg)	633 $\pm$ 3.77	105.5	654 $\pm$ 3.80	109	584 $\pm$ 2.74	97.3
Primene aminoasit solüsyonu (189 mg)	185 $\pm$ 1.90	97.8	178 $\pm$ 1.87	94.2	200 $\pm$ 1.74	105.8
Trom efervesan tablet (600 mg)	640 $\pm$ 3.79	106.6	-	-	610 $\pm$ 2.50	101.6
Brunac göz damlası (250 mg)	257 $\pm$ 2.87	102.8	-	-	271 $\pm$ 1.27	108.4

4.2.10. İnterferans Çalışmaları

Biyolojik ve farmasötik örneklerde yaygın olarak bulunan türlerin enterfere edici etkileri incelendi. Tablo 4.13'te geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi için 16.7 μ M sistein (sulu çözeltisi) tayininde biyolojik ve farmasötik örneklerde bulunması mümkün olabilen türlerin enterfere edici etkileri gösterilmiştir.

Tablo 4.13: DTNB-Au-NP yöntemiyle 0.1 mM Cys tayininde çeşitli bileşiklerin etkileri.

No	Karışımın bileşimi	Eklenen Cys (mM)	Bulunan (mM)	Relatif hata, (%)
1	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM CT	1.67×10^{-2}	1.63×10^{-2}	-2.40
2	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM GA	1.67×10^{-2}	1.75×10^{-2}	4.79
3	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM FR	1.67×10^{-2}	1.62×10^{-2}	-3.00
4	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM QR	1.67×10^{-2}	1.67×10^{-2}	0
5	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM Glisin	1.67×10^{-2}	1.59×10^{-2}	-4.79
6	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM Lösin	1.67×10^{-2}	1.63×10^{-2}	-2.40
7	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM AA	1.67×10^{-2}	1.68×10^{-2}	0.59
8	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM TP	1.67×10^{-2}	1.61×10^{-2}	-3.59
9	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM NG	1.67×10^{-2}	1.63×10^{-2}	-2.40
10	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 5 mg/mL BSA	1.67×10^{-2}	1.66×10^{-2}	-0.59
11	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.1 mM UA	1.67×10^{-2}	1.70×10^{-2}	1.80
12	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.01 mM BIL	1.67×10^{-2}	1.61×10^{-2}	-3.59
13	0.5 mL 0.1 mM Cys 0.1 mL 0.01 mM BIL 0.1 mL 5 mg/mL BSA 0.1 mL 0.1 mM Glisin 0.1 mL 0.1 mM AA 0.1 mL 0.1 mM UA	1.67×10^{-2}	1.63×10^{-2}	-2.40

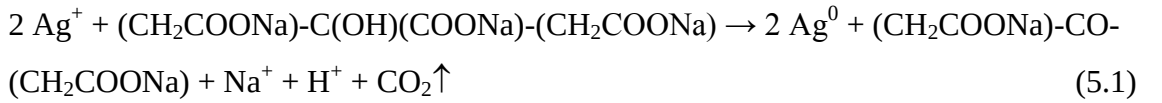
5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. ANTIÖKSİDANLARA DUYARLI GÜMÜŞ NANOPARÇACIK ESASLI ANTIÖKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ

Bu tez çalışmasında polifenolik bileşiklerin, bu bileşiklerin sentetik antioksidan karışımlarının ve gerçek örneklerin (meyve suları, bitki çayları gibi gıda örneklerinin) toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için gümüş nanoparçacık esaslı (SNP-esaslı) yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Polifenolik bileşiklerin Ag (I) iyonu indirgeyebilme yeteneği ölçülmesi sebebiyle yöntem araştırma grubumuz tarafından SNPAC yöntemi [153] yani “Gümüş Nano Parçacık Antioksidan Kapasite” yöntemi olarak adlandırılmıştır. Günümüzde altın nanoparçacık esaslı antioksidan analizleri başarılı bir şekilde uygulanmasına rağmen [165], SNP oluşumuna dayalı, çok yönlü bir toplam antioksidan kapasite analizi geliştirilmemiştir. Gümüş nanoparçacık esaslı bir yöntemin altın nanoparçacık esaslı bir yöntemden daha duyarlı ve seçici olması beklenir. Çünkü Mie rezonansı yığınsal bandlar arası geçişlerden farklı enerjilerde meydana gelir ve bu da gümüş nanoparçacığın altın nanoparçacıktan daha güçlü ve keskin plazmon rezonansına sahip olmasına neden olur [16]. Ayrıca Ag (I)’in indirgenme potansiyeli Au (III)’nun indirgenme potansiyelinden daha düşüktür. Nanoparçacıklar kullanılarak yeni bir antioksidan analiz yöntemi geliştirilmesinde izlenecek optik özelliklerin nanoparçacık oluşum yöntemine ve dolayısıyla indirgenme prosesine bağlı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır [166]. Bu yaklaşımla geliştirilen SNPAC yönteminde tek düze (uniform) dağılımlı, çekirdek halindeki gümüş nanoparçacıklar, Ag (I) iyonlarının trisodyum sitratla kimyasal olarak indirgenmesi sonucu hazırlanmıştır. Bu işlemin ikinci aşamasında, ikincil indirgeyici ajan olarak kullanılan polifenoller Ag (I) iyonlarının gümüş çekirdeklerine (Ag^0) indirgenmesi ve çekirdek-kabuk halindeki SNP’lerin oluşumu için ortama ilave edilir. Polifenoller ve/veya antioksidan vitaminler ve Ag (I) iyonları, daha fazla Ag atomunun çekirdek yüzeyinden ayrılmasıyla sonuçlanan elektron transferine olanak sağlamak için çekirdek

halindeki parçacıkların yüzeyine difüzenir. Son olarak meydana gelen çekirdek-kabuk halindeki SNP'ler karakteristik SPR absorpsiyonu gösterir. Geliştirilen yöntemin bulguları, polifenol (veya vitamin) gibi antioksidan ortamındaki nanoparçacık oluşumunda optik özelliklerin ilgili bileşiklerin antioksidan (indirgeyici) kapasitesiyle doğru orantılı olduğunu gösterir. Öte yandan, iki kademeli yöntem izlenmezse (bitki tohumu veya yapraklarının içerdiği antioksidanlarla Ag (I) iyonunun doğrudan reaksiyonuyla SNP oluşumu gibi tek kademeli bir yöntem izlenirse) [156], hem reaksiyonun yavaşlığı hem de heterojen parçacıkların oluşumundan kaynaklanan SPR absorpsiyon maksimumundaki kaymalar, geliştirilen yöntemi kararlı bir yöntem kılmayabilir.

SNPAC yönteminin ilk aşaması AgNO₃'ün trisodyum sitratla indirgenerek küçük boyutlu, küresel SNP'lerin (ortalama çap = 66 nm) sentezlenmesini gerektirir. Bu aşamada dikarboksiaseton oluşumu gerçekleşir [167].



İkinci aşamada, Ag (I) iyonları 423 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon gösteren kuvvetli renkli SNP'lere (çekirdek-kabuk oluşumu) indirgenirken, polifenollerin reaktif Ar-OH grupları ilgili bileşiğin kinonlarına yükseltgenir (Standart potansiyel, E[°], fizyolojik açıdan önemli antioksidanlar için: 0.2-0.6 V, E[°]_{Ag(I)/Ag} = 0.8 V).



Geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı SNPAC yönteminin esası, trisodyum sitratla sentezlenen gümüş nanoparçacıkların polifenol ortamında büyümesine ve bu büyüyen nanoparçacıkların (çekirdek-kabuk oluşumu) plazmon absorbansının 423 nm dalgaboyunda ölçümüne dayalıdır. Öncelikli olarak SNPAC yönteminde kullanılmak üzere sentezlenen gümüş nanoparçacığın plazmon absorbansı üzerinde gümüş nitrat konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla Ag (I) iyonu konsantrasyon çalışması yapıldı ve 1.0 mM'dan yüksek AgNO₃ konsantrasyonlarında SNP'lerin yığılması

sebebiyle koyu sarı-yeşilimsi bir çözelti meydana gelmesi nedeniyle optimum AgNO_3 konsantrasyonu 1.0 mM olarak belirlendi (Şekil 4.1). SNPAC yönteminde kullanılan gümüş nanoparçacıkların sentezlenmesi sırasında reflüks altında kaynatılan AgNO_3 çözeltisine ilave edilen % 1'lik trisodyum sitrat konsantrasyonunun etkisi incelendi ve 6 ve 7 mL trisodyum sitrat ilavesinde sentezlenen SNP'lerin yığılması nedeniyle koyu sarı yeşilimsi bir çözelti meydana geldi. Bu nedenle ilave edilen optimum % 1'lik trisodyum sitrat hacmi 5 mL olarak belirlendi (Şekil 4.2). Bulgular, SNP oluşumu/büyümesi ile ilgili tüm bileşenlerin polifenol ortamında meydana gelen nanoparçacık büyümesi için gerekli olduğunu ve en uygun nanoparçacık spektral değişimlerinin 1 mM AgNO_3 ve % 1 trisodyum sitrat konsantrasyonlarında olduğunu ortaya koyar.

Geliştirilen SNPAC yönteminin optimum deney koşullarından biri olan reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 60 dakika boyunca antioksidan varlığında (GA, CT, CFA ve AA) ve yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıktaki zamana bağlı değişim 423 nm dalgaboyunda absorbans ölçümü yapılarak incelendi. GA, CT, CFA ve AA gibi farklı antioksidanlar varlığında SNP'lerin başlangıç absorbasında bir artış ve sonrasında zamanla bir stabilizasyon sağlanması nedeniyle optimum reaksiyon süresi 30 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.3). SNPAC yönteminin optimum koşullarının belirlenmesi için farklı pH ortamlarında reaksiyonun değişimi incelendi. Aynı deneysel koşullar altında ve antioksidan yokluğunda oluşan gümüş nanoparçacıklara pH'ın etkisini incelemek için pH 3-7 aralığında çalışıldı ve gümüş nanoparçacık plazmon absorbansının en yüksek olduğu pH 6 optimum çalışma pH'ı olarak belirlendi (Şekil 4.4).

Sentezlenen açık sarı renkli gümüş nanoparçacıklar spektrofotometrik olarak incelenmiş ve bu SNP'lerin 417 nm dalgaboyunda maksimum plazmon absorbansı gösterdiği UV-görünür bölge spektrumu gösterilmiştir (Şekil 4.5). Şekil 4.6'da gallik asit yokluğunda (b) ve varlığında (a) oluşan gümüş nanoparçacıkların (SNP'ler) ve gallik asidin (c) absorpsiyon spektrumları verilmiştir. 0.1 mM GA başlangıç konsantrasyonu için 423 nm dalgaboyunda küçük bir GA başlangıç absorbansı vardır. SNP çözeltisine GA ilave edilmesi, 423 nm dalgaboyunda karakteristik keskin bir plazmon absorpsiyon bandı gösteren Ag (0) nanoparçacıklarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu band SNP'lerin yüzey plazmon rezonansından kaynaklanır ve yüzeyde elektron yoğunluğundaki periyodik bir

değişimle parçacıklardaki elektronların kolektif osilasyonuna bağlanabilir. Polifenol ortamında SNP'lerin oluşumu, önceden hazırlanmış SNP çekirdeklerine (b), polifenolik bileşiklerin (GA gibi) ilave edilerek Ag (I)'in Ag (0)'a indirgenmesiyle sağlanır. Böylece antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan gümüş nanoparçacığın absorbandsında artış görülmektedir (b→a).

Çekirdek halinde sentezlenen gümüş nanoparçacıkların ve SNPAC yönteminin uygulanmasıyla antioksidan varlığında büyüyen gümüş nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu yapılmıştır. Trisodyum sitrat varlığında hazırlanan çekirdek halindeki SNP'lerin (polifenol yokluğunda) SEM görüntüsü (Şekil 4.7) (a), geliştirilen SNPAC yöntemine göre; çekirdek halindeki SNP'ye gallik asit ilavesinde redoks reaksiyonu sonucu oluşan SNP'lerin SEM görüntüsü Şekil 4.7'de (b) verilmiştir. Buna göre redoks reaksiyonu sonucu oluşan gümüş nanoparçacıkların küre şeklinde, tek dağılımlı ve uygun boyut dağılımında homojen parçacıklar olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Polifenolik bileşikler yokluğunda ve varlığında oluşan SNP'lerin ortalama boyutları, sırasıyla 66 ve 112 nm'dir. Çekirdek halindeki SNP'lere antioksidan ilave edilerek SNPAC yöntemi uygulandığında Ag (I)'in Ag (0)'a indirgenmesiyle plazmon absorbandsında gözlenen artış, bu şekilde SEM analizi (nanoparçacık boyutundaki büyüme; 66 nm'den 112 nm'ye) ile de desteklenmektedir.

SNP'lerin absorbands sinyalleri polifenolik bileşiklerin konsantrasyonlarına bağlı olarak lineer şekilde artar. Şekil 4.9 SNPAC yöntemine göre farklı kuersetin konsantrasyonlarında oluşan gümüş nanoparçacıkların görünür bölge spektrumlarını ve meydana gelen renk değişimini göstermektedir. Buna göre QR konsantrasyonu arttıkça SNP'lerin plazmon rezonansı ile ilişkili olarak absorbands artmıştır. QR varlığında oluşan SNP'lerin plazmon absorbandsları 1.33 – 39.8 μM (çözeltideki son konsantrasyon) konsantrasyon aralığında lineerdir ve yöntem kusursuza yakın lineerlik ($r = 0.999$) göstermiştir.

Antioksidanlara duyarlı gümüş nanoparçacık esaslı SNPAC yönteminde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun 10^{-3} M standart çözeltisi

hazırlandı ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak yöntem uygulandı. 423 nm dalgaboyunda Troloksun kalibrasyon doğrusu oluşturularak doğru denklemi elde edildi. Troloksun lineer denklemi; $A_{423} = 7.8 \times 10^3 C_{TR} + 0.004$ 'tür. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısını (ϵ) vermektedir. Troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı $7.8 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. TR bileşiğinin geliştirilen SNPAC yöntemi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.23 ve 0.77 μM 'dır.

$$\text{LOD} = 3s_{bl}/m \quad (5.3)$$

$$\text{LOQ} = 10 s_{bl}/m \quad (5.4)$$

LOD ve LOQ değerleri denklem (5.3) ve (5.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Denklemlerde bulunan terimler; s_{bl} : blank'in standart sapması, m : kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Kalibrasyon doğrusunun elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) yaklaşık % 5.2 olarak bulunmuştur. Troloks için lineer çalışma aralığı $1.28 \times 10^{-7} - 1.12 \times 10^{-4} \text{ M}$ olup yöntem kusursuza yakın bir lineerliğe sahiptir ($r=0.999$).

Geliştirilen SNPAC yöntemi kullanılarak 15 antioksidan bileşiğin (askorbik asit, α -tokoferol veya polifenolik antioksidan) molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4.1'de standart antioksidan bileşiklerin doğru denklemleri ($A = mc + n$), korelasyon katsayıları (r), molar absorptivite ve lineer oldukları konsantrasyon aralıkları özetlenmiştir. Antioksidan bileşiklerin SNPAC yöntemi ve referans yöntem olan CUPRAC yöntemine göre TEAC katsayıları Tablo 4.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü gibi tüm antioksidan bileşikler geliştirilen SNPAC yöntemiyle analizlenebilmiştir ($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 1.487$, $F_{kritik (tablo)} = 4.600$, $F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)}$). SNPAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları, CUPRAC yöntemine göre elde edilen değerlerle çok iyi bir korelasyon sergilemiştir ($\text{TEAC}_{\text{CUPRAC}} = 1.16 \text{ TEAC}_{\text{SNPAC}} - 0.782$, $r = 0.936$). Tablo 4.2'de listelenen polifenolik antioksidan bileşikler SNPAC yöntemine göre en yüksek kapasiteyi, büyükten küçüğe doğru ECG, RA, EGCG, QR, EGC, CT ve EC sıralamasıyla göstermiştir. Bu teorik olarak olması gereken bir beklentidir. Çünkü

toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde tüm molekülün konjugasyon düzeyinin olduğu kadar moleküldeki hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonu da önemlidir [44]. Benzer konjugasyon düzeyindeki flavonoidlerin antioksidan gücü toplam –OH grubu sayısı ile kabaca orantılıdır ve B halkasındaki o-dihidroksi kısmının varlığıyla pozitif olarak etkilenir [168]. SNPAC yöntemine göre standart antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasiteleri azalan kapasiteye göre şu şekilde sıralanmaktadır: ECG [7 OH; 5.33], EGCG [8 OH; 4.24], QR (5 OH; 3.83), EGC [6 OH; 3.64], CT [5 OH; 3.61], EC [5OH; 3.46], ve GA [3 OH; 2.91] (Parantez içinde verilen değerler sırasıyla, moleküldeki hidroksil grubu sayısını ve bu bileşiklerin TEAC_{SNPAC} katsayılarını göstermektedir.). ‘Çay antioksidanları’ olarak bilinen kateşin grubu, moleküldeki tüm konjugasyon düzeyiyle birlikte hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre bir kapasite sırası sergilemiştir [169]. Geliştirilen yöntemle ECG ve EGCG’nin TAC sıralamasındaki farklılık (ECG [7 OH; 5.33], EGCG [8 OH; 4.24]), EGCG’nin elektron transferinin meydana geldiği çekirdek halindeki gümüş nanoparçacıkların yüzeyine difüzyonu sırasında EGCG’deki galloil gruplarının neden olduğu sterik engellemeye bağlanabilir. Flavonollerin A ve C halkalarındaki 5-hidroksi-4-keto grubu, ikili halka sistemini bağlayan 2,3-çifte bağı ve B halkasının 3',4'-dihidroksi süstitüsüyonu antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde rol oynayan önemli yapısal özelliklerdir [35] ve bu üç önemli özelliğin hepsi kuersetinde bulunmaktadır. Dolayısıyla kuersetin SNPAC yöntemine göre flavonoller arasında en yüksek TEAC katsayısına sahiptir. Rutinin antioksidan kapasitesiyle ilgili genel olarak şöyle bir beklenti vardır; rutinindeki şeker bağı kırıldığında rutin antioksidan kapasitesi, ilgili aglikonu olan kuersetinin antioksidan kapasitesine yaklaşmalıdır. Rutinin başlangıçta CUPRAC yöntemine göre TEAC_{CUPRAC} katsayısı 2.56 iken, rutin glikozidi aglikonuna (QR) hidrolizlendiğinde TEAC_{CUPRAC} değeri 4.22; yani QR’nin TEAC değerine yakın bulunmuştur [132]. Fakat SNPAC yöntemine göre, hidroliz gibi hiçbir ön işleme gerek olmadan kuersetin ve rutin TEAC katsayıları birbirine yakın (sırasıyla, 3.83 ve 3.64) bulunmuştur. Benzer şekilde, Folin yöntemiyle de QR ve RT’nin TEAC değerleri önemli bir farklılık göstermemiştir.

Turunçgillerde ve bazı diğer meyvelerde çok miktarda bulunan fenolik bileşiklerden olan hidroksisinnamik asitler arasında SNPAC yöntemine göre elde edilen TEAC

katsayıları şu şekilde sıralanmaktadır: RA 5.02 (5.30), CHA 3.04 (2.47) ve CFA 2.47 (2.80) (Parantez içindeki değerler CUPRAC yöntemine göre elde edilen değerlerdir.) (Tablo 4.2). En yüksek konjugasyon düzeyine sahip rosmarinik asit her iki yöntemle de en yüksek TEAC katsayısını göstermiştir. İki ya da daha fazla elektron verici gruplara sahip fenolik bileşikler, monosubstitüye fenollerden daha düşük yükseltgenme pik potansiyeline ve dolayısıyla daha yüksek antioksidan gücüne sahiptir. Genel olarak, antioksidan aktiviteler ve yükseltgenme potansiyelleri arasında bir ilişki vardır. Yapılan bir çalışmada düşük yükseltgenme pik potansiyeline sahip fenolik bileşikler (Ag/AgCl (E_{pa}) (<0.45 V)), lipid peroksidasyonunu inhibe etmiş ve yüksek antioksidan aktivite göstermiştir [170]. Ayrıca aromatik halkadaki hidroksil gruplarının sayısının artmasıyla antioksidan aktivitede artış ve E_{pa} değerinde azalma gözlenmiştir. Bu çalışmada hidroksisinnamik asitlerin yükseltgenmesi için gerekli elektron sayısı (n) ile E_{pa} değerleri arasında Hotta ve diğerlerinin yaptığı çalışmadaki veri kullanılarak bir korelasyon çalışması yapılmış ve çalışılan hidroksisinnamik asitler için E_{pa} değeri n_{DPPH} 'ın ($r = 0.930$) tersiyle orantılı bulunmuştur ($1/n_{\text{DPPH}} = 6.05 E_{\text{pa}} - 1.24$). Psotova ve diğerlerinin yaptığı çalışmadaki E_{pa} verisi ve hidroksisinnamik asitlerin SNPAC yöntemiyle elde edilen TEAC değerleri ($\text{TEAC}_{\text{SNPAC}}$) kullanılarak elde edilen denklemin ($1/\text{TEAC}_{\text{SNPAC}} = 6.75 E_{\text{pa}} - 1.075$) korelasyon katsayısı $r = 0.999$ 'dur. Bir başka deyişle, hidroksisinnamik asitlerin redoks potansiyeli azaldığında gümüş (I) indirgeme kapasitesi artmıştır.

Apigeninin pH 7.2'de siklik voltametri yöntemiyle ölçülen birinci anodik pik potansiyeli 0.721 V'tur [171]. CUPRAC reaktifi olan bakır (II) neokuproin kelatı 0.6 V'luk bir redoks potansiyeline sahiptir [172]. Böylece apigeninin bakır neokuproin oksidasyonu, yüksek oksidasyon potansiyeline sahip olmasından dolayı CUPRAC yönteminin [132] 30 dakikalık reaksiyon süresi içinde tamamlanamaz ve apigenin CUPRAC yöntemine göre düşük molar absorptivite gösterir. Buna karşılık apigenin, daha yüksek redoks potansiyeli sebebiyle geliştirilen SNPAC yöntemine göre kolaylıkla analiz edilebilmiştir. Apigeninin SNPAC ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları, sırasıyla 2.47 ve 0.12'dir.

Standart antioksidan bileşiklerin ikili ve üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımlar hazırlanmış ve etil alkol çözeltisi ile seyreltme işleminin ardından antioksidan kapasiteleri, SNPAC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.3). Sentetik karışımlar için teorik olarak bulunan beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite (mM TR) değerlerinin birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve sapmanın yalnızca $\pm$ % 6.4 olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ışığında Beer kanunundan kimyasal sapsmaların olmadığı, antioksidan karışımları varlığında oluşan SNP'lerin plazmon absorbanlarının toplamsal olduğu ve antioksidan karışımının içerdiği antioksidanların bireysel kapasitelerinin toplamının karışımın toplam antioksidan kapasitesini belirlediği anlaşılmaktadır.

Polifenolik bileşikler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) (SNPAC yöntemine göre sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TAC değerleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir) ve artıkların (residuals) karelerinin-ortalamalarını (mean-squares) içeren *F*-testinin uygulandığı iki-yönlü varyans analizi (ANalysis Of VAriance (ANOVA)) karşılaştırması sonucunda işlemler (gruplar) arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir [173]. Diğer taraftan, SNPAC yöntemine göre deneysel olarak bulunan kapasite sonuçları ile beklenen kapasite sonuçları %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 0.342$, $F_{kritik (tablo)} = 5.987$, $F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)}$). Sonuçta, geliştirilen yöntem valide edilmiştir.

Yeşil çay ve zeytin yağı ekstralelerine yapılan standart antioksidan bileşik katkıları (rutin, gallik asit ve kateşin) ve bu çözeltilerin geliştirilen SNPAC yöntemi ile yapılan tayinleri sonuçları ışığında yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemenin yapıldığı konsantrasyon aralığında absorban ölçümlerinin bağıl standart sapma (% RSD) değeri yöntemin tekrarlanabilirliğini temsil etmektedir ve SNPAC yöntemi için en yüksek olarak % 2.61 bulunmuştur (Tablo 4.4). Her bir antioksidan bileşiğin geri kazanım değerleri SNPAC yöntemi ile oluşturulan bireysel kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.4 incelendiğinde geri kazanım değerlerinin % 92.3 ile 102.7 arasında olduğu görülmektedir.

Meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri, SNPAC ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mM TR) cinsinden denklem (5.5) kullanılarak belirlenmiştir. Denklemde; A ölçülen absorbans değerini, ϵ_{TR} troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı, V_f toplam hacmi, V_s analiz için alınan örnek hacmini ve r seyrelme faktörünü gösterir. Geliştirilen yöntem elma, şeftali, vişne, üzüm ve nar suyuna başarılı bir şekilde uygulandı. Meyve suyu örnekleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Şekil 4.10'da diyagram şeklinde gösterilmiştir. Geliştirilen SNPAC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine oldukça uyumlu bulunmuştur. Meyve sularının SNPAC yöntemine göre TAC değerleri şu şekilde sıralanmaktadır: Şeftali < elma < vişne < üzüm < nar suyu.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mM TR)} = (A / \epsilon_{TR}) \cdot (V_f / V_s) \cdot r \quad (5.5)$$

Bitki ekstralarının toplam antioksidan kapasiteleri, SNPAC ve CUPRAC yöntemleri uygulanarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mmol TR /g-örnek) cinsinden denklem (5.6) kullanılarak belirlenmiştir. Denklemde; A ölçülen absorbans değerini, ϵ_{TR} troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı, V_f toplam hacmi, V_s analiz için alınan örnek hacmini, ekstraksiyon için alınan solvent hacmi, m alınan örnek miktarı ve r seyrelme faktörünü gösterir. Geliştirilen yöntem biberiye, mercanköşk ve adaçayı ekstralarına başarılı bir şekilde uygulandı. Bu bitki ekstraları için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Şekil 4.11'de diyagram şeklinde gösterilmiştir. Ayrıca bitki ekstraları için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.5'te özetlenmiştir. Geliştirilen SNPAC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine oldukça uyumlu bulunmuştur. Bitki ekstralarının SNPAC yöntemine göre TAC değerleri şu şekilde sıralanmaktadır: Adaçayı > mercanköşk > biberiye.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mmol TR/g-örnek)} = (A / \epsilon_{TR}) \cdot (V_f / V_s) \cdot (V_i / m) \cdot r \quad (5.6)$$

Tablo 4.6'da SNPAC yöntemi ile antioksidan tayininde gıda örneklerinde bulunması mümkün olabilen türlerin enterfere edici etkileri gösterilmiştir. Buna göre meyve suları

ve bitki ekstraktlarında yaygın olarak bulunan basit aminoasitler (glisin, alanin gibi) ve şekerlerin (glukoz, fruktoz gibi) 1000 kat varlığı, antioksidanlar varlığındaki SNP'lerin oluşumuna enterfere etmemiştir. Tartarik asidin enterfere edici etkisi ise QR + tartarik asit karışımının pH'ı 6'ya (geliştirilen yöntemin optimum pH'ı) ayarlanarak bertaraf edilmiştir. Elma suyu ve siyah çay infüzyonun UV-görünür bölge spektrumlarından görüldüğü üzere, bu gerçek örnekler geliştirilen yönteme enterfere etmemiştir (Şekil 4.12 ve 4.13).

Bu tez çalışmasında; ilk olarak farklı hidrofilik ve lipofilik bileşikler kapsayan antioksidan bileşikler, C ve E vitaminleri için antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde gümüş nanoparçacık (SNP)-esaslı ve antioksidan ortamında SNP'lerin büyümesi temeline dayalı yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntemin kararlı, çok yönlü ve tekrarlanabilir bir yöntem olabilmesi için tüm SNP oluşum/büyüme parametreleri hassas bir şekilde optimize edilmiştir. Sentetik antioksidan karışım çözeltileri ve gerçek örneklerin analiz sonuçları, meydana gelen spektral değişimler ve plazmon absorbansının antioksidan bileşiklerin indirgeme kapasiteleriyle çok iyi bir uyum içinde olduğunu ve sitrat kaplı SNP'lerin büyümesinin konsantrasyona bağlı olarak lineer bir sinyal verdiğini açık bir şekilde gösterir. Geliştirilen SNPAC yöntemine göre, 15 antioksidan bileşiğin TEAC katsayıları ve lineer oldukları konsantrasyon aralıkları bulunmuştur. Geliştirilen SNPAC protokolü, farklı bitki çayları ve meyve suyu örneklerinin ve bireysel olarak polifenolik bileşikler, C ve E vitaminlerinin toplam antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesinde gümüş nanoparçacık esaslı ilk yöntemdir. Ayrıca önceden hazırlanmış Ag çekirdekleri üzerinde SNP oluşumu, optimize edilmiş koşullar altında Ag (I) iyonlarının antioksidan tarafından indirgenmesiyle devam eder. Geliştirilen SNPAC yöntemiyle elde edilen sonuçlar bir diğer indirgeme esaslı TAC yöntemi olan CUPRAC yöntemiyle oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında geliştirilen gümüş nanoparçacık esaslı antioksidan kapasite tayin yönteminin, düşük maliyet, yüksek duyarlılık ve seçicilik gibi bazı üstünlükleri sayesinde literatürde kullanılan klasik spektroskopik yöntemlere alternatif olması beklenmektedir. Geliştirilen SNPAC yönteminin kullanımı ile özellikle gıda ve

biyokimya alanlarındaki araştırmacıların, günlük diyetle alınan çeşitli gıda ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini nispeten az donanımlı laboratuvarlarda bile izleyebilmeleri oksidatif stres kökenli hastalıklarla mücadele etmeyi kolaylaştıracaktır. Tez çalışması sonucunda yapılacak olan bilimsel yayınlar, gıda, analitik kimya ve nanoteknoloji uygulamalarında yararlı bilgi sağlayacaktır.

5.2. TİYOL GRUBU ANTİOKSİDANLARA DUYARLI DTNB-AU-NP (DTNB BAĞLI ALTIN NANOPARÇACIK) ESASLI TAYİN YÖNTEMİ

DTNB tiyollerin seçimli olarak tayininde yaygın olarak kullanılan kolorimetrik birçok reaktiften biri olmasına rağmen DTNB bağlı Au-NP'lerin kullanımı esasına dayalı bir yöntem geliştirilmemiştir. Altın probunun yüzey modifikasyon alanı, analitlerin yüzey-bağ moleküllerine ulaşabilmesi ve yüzey-bağ moleküllerinin analitleri kabul edebilmesi optik değişiklikleri etkileyen en önemli üç faktördür. Bu faktörlerin anlaşılması, fonksiyonelize edilen (işlevselleştirilen) altın nanoparçacık problemlerin duyarlılığının kontrol edilmesinde temeldir. Bu tez çalışmasında, nötral pH'ta oldukça seçici bir tiyol tayin reaktifi olan DTNB [27] Au-NP'lerin modifikasyon aracı olarak seçilmiştir. Nanoparçacık yüzeyindeki kimyasal etkileşimlerin (yani Au-NP'ların yüzeyinde DTNB desorpsiyonu ile elele yürüyen tiyol adsorpsiyonu, yüzey elektrostatik çift-tabakası değişen NP'ların agregasyonu ve desorbe olan DTNB ile adsorplanan tiyoller arasındaki TNB kromoforu oluşturma tepkimesi olaylarının bütününe) hem soğurma dalgaboyunu değiştirmesi (yani kırmızı ya da maviye kayma), hem de çözelti fazındaki TNB ekstinksiyon (sönüm) katsayısını daha arttırarak tayin duyarlılığını yükseltmesi beklenmiştir.

Au-NP'ler hem kimyasal hem de fiziksel indirgeme yöntemleriyle hazırlanabilir. Normalde altın türevleri (tetrakloroaurik asit gibi) kimyasal olarak indirgenir ve parçacıkların nanometre boyutunda büyütülmesi kimyasal olarak kontrol edilir. Kimyasal nanoparçacık sentez metodolojileri redoks sentetik yöntemi, elektrokimyasal yöntem, fotokimyasal yöntem, çekirdek büyütme yöntemi, kalıp (template) sentezi, mikro-emülsiyon kalıp (template) sentezi ve mikrodalga sentezi gibi yöntemleri kapsar [21]. Bu tez çalışmasında altın nanoparçacıklar altın (III) iyonlarının trisodyum sitratla

indirgenmesiyle hazırlanmıştır. Sitrat indirgemesiyle Au-NP'lerin hazırlanmasında sitrat hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak rol oynar. Tüm nanoparçacık sentezleri stabilize edici ajan kullanımını gerektirir. Çünkü parçacık yüzeyiyle birleşen stabilize edici ajan kullanımı, yüzeyin yüklenmesini ve nanoparçacıkların süspende halde tutulmasını sağlayarak nanoparçacıkların agregasyonuna engel olur [22].

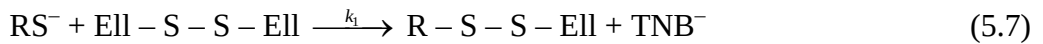
Geliştirilen altın nanoparçacık esaslı DTNB-Au-NP yönteminin [154] esası, trisodyum sitrat indirgemesiyle sentezlenen Au-NP'lere DTNB adsorbe edilerek hazırlanan DTNB-Au-NP'lerin tiyol antioksidanı varlığında tiyol-değişim reaksiyonuyla oluşan TNB absorbansının 410 nm dalgaboyunda ölçümüne dayalıdır. Öncelikli olarak DTNB-Au-NP yönteminde kullanılmak üzere sentezlenen altın nanoparçacığın plazmon absorbansı üzerinde tetrakloroaurat asidi konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla % 0.002 ve % 0.01 HAuCl₄ konsantrasyonu aralığında çalışıldı. % 0.002 ve % 0.004 HAuCl₄ ile çalışıldığında Au-NP'lerin karakteristik kırmızı rengi gözlemlendi. % 0.006 ve daha yüksek konsantrasyonlarda HAuCl₄ ile oluşan Au-NP'lerin renginde ise bulanıklaşma ve elde edilen spektrumlarında maksimum absorpsiyon yaptığı dalgaboylarında kayma olması nedeniyle optimum HAuCl₄ konsantrasyonu % 0.002 olarak belirlendi (Şekil 4.14 ve 4.15). DTNB-Au-NP yönteminde kullanılan altın nanoparçacıkların sentezlenmesi sırasında reflüks altında kaynatılan HAuCl₄ çözeltisine ilave edilen % 1'lik trisodyum sitrat konsantrasyonunun etkisi incelendi ve 0.1 mL trisodyum sitrat ilavesinde gri renkli bir çözelti ile yayvan bir absorpsiyon spektrumu elde edildi. 0.2 mL'den 0.5 mL'ye artan trisodyum sitrat ilavesinde ise oluşan Au-NP'lerin absorbansında ufak bir azalma olduğu ve bu hacim aralığında sentezlenen Au-NP'lerin keskin absorpsiyon spektrumlarına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.16 ve 4.17).

DTNB-Au-NP esaslı yöntemde kullanılan DTNB bağlı Au-NP'lerin (DTNB-Au-NP) hazırlanmasında; sentezlenen altın nanoparçacığa ilave edilen DTNB farklı sürelerde bekletilerek DTNB ve Au-NP'ler arasındaki reaksiyon süresinin yöntem üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4.18). Şekil 4.18'de farklı reaksiyon sürelerinde hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ile sistein varlığında oluşan TNB absorbanslarının değişimi verilmiştir. Buna göre, DTNB-Au-NP hazırlanmasında optimum reaksiyon süresi 24

saat olarak belirlendi. DTNB-Au-NP esaslı yöntemde kullanılan DTNB-Au-NP'lerin hazırlanmasında; sentezlenen altın nanoparçacığa farklı konsantrasyonlarda DTNB ilave edilerek DTNB konsantrasyonunun DTNB-Au-NP esaslı yöntem üzerindeki etkisi incelendi (Şekil 4.19). Şekil 4.19'de 0.5-3.0 mg/mL aralığındaki DTNB ilavesinde hazırlanan DTNB-Au-NP'ler ve tiyol varlığında oluşan TNB'lerin absorbans değişimi verilmiştir. Buna göre, en yüksek TNB absorbansı 2.0 mg/mL DTNB konsantrasyonunda gözlenmiş ve DTNB-Au-NP hazırlanmasında ilave edilen optimum DTNB konsantrasyonu 2.0 mg/mL DTNB olarak belirlenmiştir.

Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin optimum deney koşullarından biri olan reaksiyon süresinin belirlenmesi amacıyla 20 dakika boyunca tiyoller varlığında (NAC, GSH ve Cys) ve yokluğunda oluşan TNB'deki zamana bağlı değişim 410 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak incelendi. NAC, GSH ve Cys gibi tiyol antioksidanları DTNB-Au-NP'ye ilave edilir edilmez ölçülen TNB absorbasında ilk dakikada bir artış gözlemlendi ve sonrasında TNB absorbansının stabil kalması nedeniyle optimum reaksiyon süresi 5 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.20). DTNB ve tiyol antioksidanların -SH grupları arasındaki reaksiyon ikinci mertebe kinetiği göstermektedir [174]. DTNB aşırısının olduğu koşullar altında ise yalancı birinci mertebe reaksiyon kinetiği gösterir. Klasik Ellman yönteminin 1-2 dakika içinde tamamlanan tiyol değişim reaksiyonuyla hızlı kinetik gösterdiği bilinmektedir [175,176]. Geliştirilen yöntemde DTNB reaktifi, tiyol analitleriyle hızlıca reaksiyona girerek sarı renkli TNB^{2-} anyonu vermek üzere öncelikle türevlendirilmiş Au-NP'lerden desorbe olmalıdır. Doğal olarak bu tepkime, tiyol ve disülfürler arasındaki büyük adsorptivite farkından dolayı öncelikli olarak tiyollerle Au-S bağlarını oluşturabilen türevlendirilmiş Au-NP'lerin yüzeyinden DTNB reaktifinin desorpsiyonuyla mümkündür [177].

Tiyol anyonunun (RS^-) Ellman reaktifiyle ($Ell - S - S - Ell$) tiyol-değişim reaksiyonu için birinci dereceden hız sabiti (k_1):



Çoğu tiyol pK_a değerlerine yakın pH'ta Ellman tiyol-değişim reaksiyonunun kinetik basitliğinden dolayı $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ düzeyinde çok yüksek hız sabitleri göstermiştir [178].

DTNB-Au-NP yönteminin optimum koşullarının belirlenmesi için farklı pH ortamlarında reaksiyonun değişimi incelendi. Aynı deneysel koşullar altında ve sistein varlığında oluşan TNB üzerine pH'ın etkisini incelemek için pH 3-10 aralığında çalışıldı ve TNB absorbansının en yüksek olduğu pH 8 optimum çalışma pH'ı olarak belirlendi (Şekil 4.21). Klasik Ellman optimum pH'ı 8'e ayarlanmıştır [179] ve açığa çıkan 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB^{2-}) 410-420 nm aralığında bir dalgaboyunda kuvvetli ışık absorpsiyonu gösterir. Klasik yöntemin başlıca sınırlaması, TNB^{2-} ışık absorpsiyon yoğunluğunun sadece ortamın pH'ı 7.3'ün üzerindeyse pH'tan bağımsız olmasıdır. Böylece bu yöntem sadece bu pH değerinin üzerinde ve ayrıca tiyollerin daha alkali pH değerlerinde oksidatif bozunmasından [180] dolayı pH 8.0-8.5 aralığında [181] optimum bir pH değerinde kullanılmalıdır. Reaksiyon hem alkali pH'a (OH^- , R-S^- ile yarışır) hem de asidik pH'a (disülfür bağı kırılması gibi) duyarlıdır [182].

Şekil 4.22'de Au (III)'nun trisodyum sitrat varlığında küresel altın nanoparçacıklara indirgenmesi sonucu sentezlenen Au-NP'lerin yüzey plazmon rezonans (SPR) absorpsiyon spektrumu (520 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyona sahip) ve renk görüntüsü verilmiştir. Bu nanoparçacıklar karakteristik bir kırmızı renge sahiptir. Bu karakteristik renk yüzey plazmon osilasyonu olarak bilinen iletim bandındaki elektronların toplu osilasyonundan kaynaklanmaktadır [15].

Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminde kullanılmak üzere sentezlenen altın nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu yapıldı. Trisodyum sitrat varlığında Au (III)'ün Au (0)'a indirgenmesi sonucu oluşan altın nanoparçacıkların SEM görüntüsü Şekil 4.23'te verilmiştir. Buna göre indirgeyici/stabilize edici ajanların (trisodyum sitrat), altın (III) bileşiklerine (tetrakloroaurik asit, HAuCl_4) oranının ayarlanmasıyla hazırlanan altın nanoparçacıkların küre şeklinde, tek düze (uniform) dağılımlı ve uygun boyut

dağılımında homojen parçacıklar olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Sentezlenen Au-NP'lerin ortalama boyutu yaklaşık olarak 16 nm'dir.

Şekil 4.25 DTNB bağlı Au-NP'lerin farklı konsantrasyonlarda sisteinle tiyol-değişim reaksiyonunun sonucu olarak oluşan sarı renkli TNB ürünün görünür bölge spektrumlarını ve meydana gelen renk değişimini göstermektedir. DTNB-Au-NP çözeltisine artan konsantrasyonlarda sistein ilave edilmesi, sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB^{2-}) oluşumuna bağlı olarak 410 nm'deki absorbans artışı ile sonuçlanmıştır. 410 nm dalgaboyundaki bu absorbans artışının beraberinde DTNB tüketiminin bir sonucu olarak 325 nm dalga boyunda altın nanoparçacıklar üzerinde adsorplanmış DTNB absorbansında azalma meydana gelmiştir. Bain ve diğerleri [177], tiyol ve disülfür içeren karışım çözeltilerinde tek tabaka oluşursa, Au-NP'ler üzerindeki tiyol adsorpsiyonunun çok güçlü bir şekilde öncelikli olduğunu ($\approx 75:1$) kanıtlamışlardır. Bu tez çalışmasında; tiyol analitleri büyük olasılıkla yüzeyden serbest kalan DTNB ile reaksiyona girer, nötral ve alkali pH'ta suda TNB^{2-} dianyonuna iyonlaşan (sarı renkli ürün) 2-nitro-5-tiyobenzoat (TNB^-) vermek üzere disülfür bağı kırılır.

Tiyol grubu antioksidanlara duyarlı altın nanoparçacık esaslı DTNB-Au-NP yönteminde sonuçlar sistein bileşiği referans alınarak inceleneceğinden sisteinin 10^{-3} M standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak yöntem uygulandı. 410 nm dalgaboyunda sisteinin kalibrasyon doğrusu oluşturularak doğru denklemi elde edildi. Sisteinin lineer denklemi; $A_{410} = 1.49 \times 10^4 C_{\text{Cys}} + 0.019$ 'dur. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri sistein bileşiğinin molar absorplama katsayısını (ϵ) vermektedir. Sisteinin molar absorplama katsayısı $1.49 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Sisteinin geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.31 ve 1.02 μM 'dir. LOD ve LOQ değerleri denklem (5.3) ve (5.4) kullanılarak hesaplanmıştır. Denklemlerde bulunan terimler; s_{bl} : blank'in standart sapması, m : kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Kalibrasyon doğrusunun elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) yaklaşık % 2.6 olarak bulunmuştur. Cys varlığında oluşan TNB absorbansları

0.4 – 29.0 μM (çözeltideki son konsantrasyon) konsantrasyon aralığında lineerdir ve yöntem kusursuza yakın lineerlik ($r = 0.998$) göstermiştir.

Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi kullanılarak 7 tiyol grubu antioksidan bileşiğin (glutatyon, sistein gibi) molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4.7’de standart tiyol grubu antioksidan bileşiklerin doğru denklemleri ($A = mc + n$), korelasyon katsayıları (r), molar absorptivite ve lineer oldukları konsantrasyon aralıkları özetlenmiştir. Bu tiyol bileşiklerin DTNB-Au-NP yöntemi ve referans yöntem olan orjinal Ellman yöntemine göre CETC katsayıları Tablo 4.8’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tablo 4.8’de görüldüğü gibi tüm tiyol grubu antioksidan bileşikler geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemiyle analizlenebilmiştir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 3.038$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 5.987$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). DTNB-Au-NP yöntemine göre elde edilen CETC katsayıları, orjinal Ellman yöntemine göre elde edilen değerlerle çok iyi bir korelasyon sergilemiştir ($\text{CETC}_{\text{DTNB-Au-NP}} = 0.872 \text{ TEAC}_{\text{Ellman}} + 0.22$, $r = 0.979$). Çalışılan tiyol bileşikleri arasında DTE en yüksek tiyol içeriği göstermiştir ve parantez içinde verilen $\text{CETC}_{\text{DTNB-Au-NP}}$ katsayıları şu azalan sırayı takip etmektedir: DTE (2.06) > DHLA (1.38) > HCys (1.32) > Cys (1.00) > GSH (0.97) > NAC (0.96) > CA (0.58). Yapısında iki tane $-\text{SH}$ grubu bulunan DTE en yüksek CETC katsayısını göstermiştir. Bu ise bileşiğin yapısındaki indirgenmiş form ($-\text{SH}$ grubu) ne kadar fazla olursa bileşiğin o kadar güçlü antioksidan etki gösterdiği teorisini [52] doğrulamaktadır.

Tablo 4.9’da tiyol grubu antioksidan bileşiklerin DTNB-Au-NP yöntemi ve referans yöntem olarak kullanılan orjinal Ellman yöntemine göre elde edilen LOD değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir. DTNB-Au-NP yöntemine göre hesaplanan LOD değerleri, orjinal Ellman yöntemine göre elde edilen LOD değerlerinden daha düşüktür. DTNB-Au-NP yöntemine göre DTE için elde edilen LOD değeri (0.02 μM) en düşük LOD değeridir. Glutatyon için DTNB-Au-NP yöntemine göre elde edilen LOD değeri (0.32 μM), Huang ve diğerleri tarafından aminotiyollerin tayininde yüzey destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş seçici prob olarak Nil kırmızısı bağlı-Au-NP’lerin kullanıldığı yöntemle elde edilen LOD değerinden (1.0 μM) daha düşüktür [160].

Standart tiyol grubu antioksidan bileşiklerin üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımlar hazırlanmış ve bu sentetik karışımların toplam tiyol içerikleri (TTC), DTNB-Au-NP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.10). Sentetik karışımlar için teorik olarak beklenen toplam tiyol içerikleri ile deneysel olarak bulunan toplam tiyol içeriklerinin (mM Cys) birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve sapmanın yalnızca $\pm$ % 5.7 olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ışığında Beer kanunundan kimyasal sapmaların olmadığı, tiyol karışımları varlığında oluşan TNB'lerin absorbanslarının toplamsal olduğu ve tiyol karışımının içerdiği tiyol grubu antioksidanların bireysel tiyol içeriklerinin toplamının karışımın toplam tiyol içeriğini belirlediği anlaşılmaktadır.

Tiyol grubu antioksidan bileşikler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) (DTNB-Au-NP yöntemine göre sentetik tiyol karışım çözeltilerinin mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TTC değerleri Tablo 4.10'da gösterilmiştir) ve artıkların (residuals) karelerinin-ortalamalarını (mean-squares) içeren F-testinin uygulandığı iki-yönlü varyans analizi (ANalysis Of VAriance (ANOVA)) karşılaştırması sonucunda işlemler (gruplar) arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir [173]. Diğer taraftan, DTNB-Au-NP yöntemine göre deneysel olarak bulunan toplam tiyol içeriği sonuçları ile beklenen toplam tiyol içeriği sonuçları %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 1.875$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 6.608$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, geliştirilen yöntem valide edilmiştir.

Karaciğer doku homojenatlarına yapılan standart tiyol bileşik katkıları (glutatyon, N-asetil sistein ve sisteamin) ve bu çözeltilerin geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi ile yapılan tayinleri sonuçları ışığında yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemenin yapıldığı konsantrasyon aralığında absorbans ölçümlerinin bağlı standart sapma (% RSD) değeri yöntemin tekrarlanabilirliğini temsil etmektedir ve DTNB-Au-NP yöntemi için en yüksek olarak % 0.98 bulunmuştur (Tablo 4.11). Her bir tiyol grubu antioksidan bileşiğinin geri kazanım değerleri DTNB-Au-NP yöntemi ile oluşturulan bireysel kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.11 incelendiğinde geri kazanım değerlerinin % 94.0 ile 97.4 arasında olduğu görülmektedir.

Tablo 4.12’de geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemi, orjinal Ellman yöntemi ve HPLC yöntemine göre bazı farmasötik ilaçların tiyol içerikleri ve bu yöntemlerle elde edilen geri kazanımlar verilmiştir. Geliştirilen yöntem Brunac göz damlası, Trom ve Mentopin efervesan tabletler, Glutasyon tablet ve Primene aminoasit solüsyonuna başarılı bir şekilde uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre; DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yöntem olarak kullanılan HPLC yöntemiyle uyumlu sonuçlar vermiştir. Geliştirilen yöntemin başlıca avantajı, kompleks matrislerdeki biyotiyol bileşiklerinin duyarlı olarak tayin edilebilmesidir. Farmasötik ilaçların içerdiği (mg cinsinden beklenen) tiyol miktarları incelendiğinde, DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen sonuçlar, orjinal Ellman yöntemiyle elde edilen sonuçlardan daha yakın bulunmuştur (Tablo 4.12). Böylece önerilen metodoloji gerçek örnekler için valide edilmiştir.

Tablo 4.13’te DTNB-Au-NP yöntemi ile tiyol antioksidanların tayininde biyolojik ve farmasötik örneklerde bulunması mümkün olabilen türlerin enterfere edici etkileri gösterilmiştir. Buna göre biyolojik ve farmasötik örneklerde yaygın olarak bulunan basit aminoasitler, flavonoidler, vitaminler ve plazma antioksidanlarının varlığı, tiyoller varlığındaki TNB oluşumunu enterfere etmemiştir.

Bu tez çalışmasında; Ellman reaktifi (DTNB) bağlı altın nanoparçacıklar (DTNB-Au-NP’ler) kullanılarak ilk olarak biyolojik ve farmasötik örneklerde biyotiyollerin duyarlı olarak tayini için yeni bir optik sensör geliştirilmiştir. Çalışılan tiyol grubu antioksidan bileşikler için geliştirilen bu sensörle daha düşük LOD değerleri (klasik Ellman yöntemiyle elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında) elde edilmiştir. Literatürde tiyol tayini için sensör olarak Nil kırmızısı bağlı altın nanoparçacıkların kullanıldığı çalışmayla karşılaştırıldığında [19] geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin lineerliği bu yöntemden daha iyidir. Biyolojik açıdan oldukça önemli bir tiyol antioksidanı olan glutasyonun geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen LOD değeri, literatürde var olan yüzey destekli lazer dezorpsiyon/ionizasyon MS yöntemiyle birleştirilmiş bir sensörün kullanıldığı yöntemle elde edilen değerden daha düşük bulunmuştur [160]. Yöntemin kararlı, hızlı, çok yönlü ve tekrarlanabilir bir yöntem olabilmesi için altın

nanoparçacık oluşumu ve DTNB bağlı Au-NP'lerin hazırlanma parametreleri hassas bir şekilde optimize edilmiştir. DTNB reaktifi, tiyollerin disülfürlere göre Au-NP yüzeyine tercihli olarak adsorbe edilebilirliği ve tiyol-değişim reaksiyonunun termodinamik/kinetik elverişliliği [177] sebebiyle türevlendirilmiş Au-NP'lerin yüzeyinden seçimli olarak desorbe edilebilmiştir. Geliştirilen yöntemde DTNB-Au-NP probunun duyarlılığı artırması ve tiyol değişim reaksiyonunun özgüllüğü kullanılarak biyotiyollerin diğer antioksidanlar arasından seçimli olarak tayini mümkün kılınmıştır. Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemine göre, 7 tiyol grubu antioksidan bileşiğin CETC katsayıları ve lineer oldukları konsantrasyon aralıkları bulunmuştur. Geliştirilen DTNB-Au-NP protokolü, biyolojik ve farmasötik ilaç örneklerinin ve bireysel olarak biyotiyol bileşiklerin toplam tiyol içeriklerinin değerlendirilmesinde altın nanoparçacık esaslı önemli bir yöntemdir. Amino asitler, flavonoidler, vitaminler ve plazma antioksidanları gibi yaygın biyolojik örnek içerikleri geliştirilen yöntemi enterfere etmemiştir. Geliştirilen DTNB-Au-NP yöntemiyle elde edilen sonuçlar referans yöntem olarak kullanılan orjinal Ellman yöntemiyle oldukça uyumlu sonuçlar vermiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında geliştirilen DTNB bağlı altın nanoparçacık esaslı tiyol tayin yönteminin, düşük maliyet, yüksek duyarlılık ve seçicilik gibi bazı üstünlükleri sayesinde literatürde kullanılan klasik spektroskopik yöntemlere alternatif olması beklenmektedir. Geliştirilen DTNB-Au-NP yönteminin kullanımı ile özellikle tıp ve biyokimya alanındaki araştırmacıların, reaktif oksijen türlerinin biyolojik örneklerle verdiği hasarları nispeten az donanımlı laboratuvarlarda bile kolaylıkla izleyebilmeleri, insan sağlığı ile ilgili bazı parametrelerin belirlenerek oksidatif stres kökenli hastalıkların teşhis ve tedavisini kolaylaştıracaktır. Tez çalışması sonucunda yapılacak olan yayınların, nanoparçacıkların biyomedikal ve biyoanalitik alanlarında kullanımı konusunda yararlı ve özgün kaynaklar olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., 1994, *Antioxidants in nutrition, health, and disease*, Oxford University Press: Oxford, New York.
- [2] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12, 1496–1547.
- [3] Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856.
- [4] Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends Anal. Chem.*, 30, 652–664.
- [5] Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302.
- [6] Khaydarov, R. R., Khaydarov, R. A., Estrin, Y., Evgrafova, S., Scheper, T., Endres, C., Cho, S. Y., 2009, *In nanomaterials: Risks and benefits*, Linkov, I., Steevens, J., Eds., Springer, Dordrecht, The Netherlands, 287–297.
- [7] Frattini, A., Pellegrini, N., Nicastro, D., de Sanctis, O., 2005, First-principles study of the adsorption of NH₃ on Ag surfaces, *Mater. Chem. Phys.* 94, 148–152.
- [8] Cao, Y. W., Jin, R. C., Mirkin, C. A., 2002, Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection, *Science*, 297, 1536–1540.
- [9] Kapoor, S., Lawless, D., Kennepohl, P., Meisel, D., Serpone, N., 1994, Reduction and aggregation of silver ions in aqueous gelatin solutions, *Langmuir*, 10, 3018–3022.
- [10] Forough, M., Farhadi, K., Biological and green synthesis of silver nanoparticles, 2010, *Turkish J. Eng. Environ. Sci.*, 34, 281–287.
- [11] Schneider, S., Halbig, P., Grau, H., Nickel, M., 1994, Reproducible preparation of silver sols with uniform particle size for application in surface-enhanced Raman spectroscopy, *Photochem. Photobiol.*, 60, 605–610.

- [12] Nezhad, M.R.H., Karimi, M.A., Shahheydari, F., 2010, A sensitive colorimetric detection of ascorbic acid in pharmaceutical products based on formation of anisotropic silver nanoparticles, *Transaction F: Nanotechnology*, 17, 148-153.
- [13] Sharma, V. K., Yngard, R. A., Lin, Y., 2009, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 83-96.
- [14] Jensen, T. R., Malinsky, M. D., Haynes, C. L., Van Duyne, R. P., 2000, Nanosphere lithography: Tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles, *J. Phys. Chem. B*, 104, 10549-10556.
- [15] Eustis, S., El-Sayed, M. A., 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem. Soc. Rev.*, 35, 209-217.
- [16] Jiang, Z. J., Liu, C. Y., 2003, Seed-mediated growth technique for the preparation of a silver nanoshell on a silica sphere, *J. Phys. Chem. B*, 107, 12411-12415.
- [17] L. Wlodek, 2002, Beneficial and harmful effects of thiols, *Pol. J. Pharmacol.* 54, 215-223.
- [18] Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001, Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1191-1212.
- [19] Chen, S.-J., Chang, H.-T., 2004, Nile red-adsorbed gold nanoparticles for selective determination of thiols based on energy transfer and aggregation, *Anal. Chem.* 76, 3727-3734.
- [20] Daniel, M.-C., Astruc, D., 2004, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.*, 104, 293-346.
- [21] Ma, L.-N., Liu, D.-J., Wang, Z.-X., 2010, Synthesis and applications of gold nanoparticle probes, *Chin. J. Anal. Chem.*, 38, 1-7.
- [22] Philip, D., 2008, Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta A*, 71, 80-85.
- [23] Tseng, W.-L., Lee, K.-H., Chang, H.-T., 2005, Using nile red-adsorbed gold nanoparticles to locate glutathione within erythrocytes, *Langmuir*, 21, 10676-10683.
- [24] De Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N., Gunnlaugsson, T., 1998, Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) reagents for thiols, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5077-5080.

- [25] Tolbert, T.J., Wong, C.-H., 2002, New methods for proteomic research: Preparation of proteins with N-terminal cysteines for labeling and conjugation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 2171–2174.
- [26] Maeda, H., Matsuno, H., Ushida, M., Katayama, K., Saeki, K., Itoh, N., 2005, 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 2922–2925.
- [27] Hansen, R.E., Østergaard, H., Nørgaard, P., Winther, J.R., 2007, Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine, *Analytical Biochemistry*, 363, 77-82.
- [28] Turkevich, J., Stevenson, P.C., Hillier, J., 1951, Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–74.
- [29] Frens, G., 1973, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature*, 241, 20–22.
- [30] Ellman, G.L., 1958, A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, *Arch. Biochem. Biophys.*, 74, 443–450.
- [31] Cao, G., Prior, R.L., 1999, *In vivo* antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
- [32] Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.
- [33] Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758.
- [34] Cao, G., Prior, R.L., 1998, Comparison of different analytical methods for assesing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.
- [35] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- [36] Shahidi, F., 1996, *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
- [37] Tüzün, Y., Garip, F., 2005, E vitaminin dermatolojideki yeri, *Dermatose*, 96-98.
- [38] Durmaz, G., 2002, *Kayısı meyvesinin ve kavrulmuş kayısı çekirdeğinin antioksidan özellikleri*, Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [39] Hudson, B.J.F., 1990, *Food antioxidants*, Elsevier Applied Science, Amsterdam, 1-85166-440-8.
- [40] Halliwell, B., 2001, *Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo, handbook of antioxidants*, Los Angeles.
- [41] Helle, R.A., Jesper, B.N., Fleming, N., 1997, Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry*, 43, 562-568.
- [42] Sheng, L., Zheng, X., Tong, H., Liu, S., Du, J., Liu, Q., 2004, Purification and characterization of cytosolic isoenzyme III of Cu, Zn-superoxide dismutase from tobacco leaves, *Plant Science*, 167, 1235-1241.
- [43] Keskin, H., Erkmen G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
- [44] Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- [45] Halliwell, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
- [46] Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.
- [47] Heim, K.E., Tagliaferro, R., Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572-584.
- [48] Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Dekker, M., New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- [49] Sen, C.K., Packer, L., 2000, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-669.
- [50] Deneke, S.M., 2000, Thiol-based antioxidants, *Current Topics in Cellular Regulation*, 36, 151-180.
- [51] Wardman, P., Von, S.C., 1995, Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells, *Methods Enzymol*, 251, 31-45.
- [52] Atmaca, G., 2004, Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids, *Yonsei Medical Journal*, 45, 776-788.
- [53] Meister, A., Anderson, M.E., 1983, Glutathione, *Annual Review Biochemistry*, 52, 711-760.

- [54] Dimascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., 1991, Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols, *American Journal of Clinical Nutrition*, 53, 194-200.
- [55] Anbar, M., Neta, P., 1967, A compilation of specific biomolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution, *Int. J. Appl. Radiat. Isot*, 18, 493-523.
- [56] Gilbert, H.F., 1995, Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability, *Methods Enzymol*, 251, 8-28.
- [57] Gilbert, H.F., 1990, Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 63, 69-172.
- [58] Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Cornacchiari, A., Ferrari, R., Albertini, A., 1987, Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress, *Clin. Chem*, 33, 1448-1449.
- [59] Ulakoğlu, Z.E.M., Gümüştaş, K.M., Belce, A., Altuğ, T., Kökoğlu, E., 1998, Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi, *Cerrahpaşa C. Med.*, 29, 127-131.
- [60] John, P., Richie, J.R., 1992, The role of glutathione in aging and cancer, *Experimental Gerontology*, 27, 615-626.
- [61] Moldeus, P., Cotgreave, I. A., Berggren, M., 1986, Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine, *Respiration*, 50, 31-42.
- [62] Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989, The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radic Biol Med*, 6, 593-597.
- [63] Ziment, I., 1986, Acetylcysteine: a drug with an interesting past and a fascinating future, *Respiration*, 50, 26-30.
- [64] Hultberg, B., Andersson, A., Masson, P., Larsson, M., Tunek, A., 1994, Plasma homocysteine and thiol compound fractions after oral administration of N-acetylcysteine, *Scand J Clin Lab Invest*, 54, 417-422.
- [65] Pettit, F.H., Yeaman, S.J., Reed, L.J., 1978, Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4881-4885.
- [66] Lodge, J.K., Youn, H.D., Handelman, G.J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V.V., Packer, L., 1997, Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection, *J. Appl. Nutr.*, 49, 3-11.

- [67] Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.* 19, 227-250.
- [68] Packer, L., Tritschler, H.J., Wesel, K., 1997, Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 359-378.
- [69] Nath, K.A., Salahudeen, A.K., 1993, Autooxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate, *Am J Physiol*, 264, 306-314.
- [70] House, J.D., Jacobs, R.L., Stead, L.M., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 1999, Regulation of homocysteine metabolism, *Adv. Enzyme Regul.*, 39, 69-91.
- [71] Vecsei, L., Widerlov, E., 1990, Preclinical and clinical studies with cysteamine and pantethine related to the central nervous system, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 14, 835-862.
- [72] Palkovits, M., Brownstein, M.J., Eiden, L.E., Beinfeld, M.C., Russell, J., Arimura, A., 1982, Selective depletion of somatostatin in rat brain by cysteamine, *Brain Res*, 240, 178-180.
- [73] Chi-Un, P., Chul, L., In-Ho, P., 2007, Therapeutic possibilities of cysteamine in the treatment of schizophrenia, *Medical Hypotheses*, 69, 199-202.
- [74] Mao, Z., Choo, Y.S., Lesort, M., 2006, Cystamine and cysteamine prevent 3-NP-induced mitochondrial depolarization of Huntington's disease knock-in striatal cells, *Eur J Neurosci*, 23, 1701-1710.
- [75] Babic, I., Amiot, M.J., Nguyen-The, C., Aubert, S., 1993, Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage, *J. Food Sci.*, 58, 351-356.
- [76] Shu, Z., Fei-Yan, C., Hong, Y., Yong, G., Harding, J.J., 2008, Effects of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester drops on streptozotocin-induced diabetic cataract in rats, *Molecular Vision*, 14, 862-870.
- [77] Wan, X.S., Ware, J.H., Zhou, Z., Donahue, J.J., Guan, J., Kennedy, A.R., 2006, Protection against radiation-induced oxidative stress in cultured human epithelial cells by treatment with antioxidant agents, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64, 1475-1481.
- [78] Steenvoorden, D.P., Hasselbaink, D.M., Beijersbergen-Van-Henegouwen, G.M., 1998, Protection against UV-induced reactive intermediates in human cells and mouse skin by glutathione precursors: a comparison of N-acetylcysteine and glutathione ethyl ester, *Photochem Photobiol*, 67, 651-656.
- [79] Nimni, M. E., Han, B., Cordoba, F., 2007, Are we getting enough sulfur in our diet? *Nutrition & Metabolism*, 24(4), 1743-1765.

- [80] Kızıl, M., 2007, *Benzo(A)Piren verilen ratlarda E vitamini ve selenyumun kan ve dokularda lipit peroksidasyonu ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkileri*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [81] Şimşir, I.Y., Özgen, A.G., 2010, Tiroid ve selenyum-olgu sunumu. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 14, 76-9.
- [82] Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine*. 22, 749-760.
- [83] Burda, S., Oleszek, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2774-2779.
- [84] Mora, A., Paya, M., Rios, J.L., Alcaraz, M.J., 1990, Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, *Biochemistry and Pharmacology*, 40, 793-797.
- [85] Pannala, A.S., Chan, T.S., O'brien, P.J., Rice-Evans, C.A., 2001, Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics, biochemistry, *Biophysics Research Communication*, 282, 1161-1168.
- [86] Williams, R.J., Spencer, J.P.E., Rice-Evans, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
- [87] Klabunde, K., 2001, *Nanoscale Materials in Chemistry*, Wiley Interscience: New York.
- [88] Rosi, N. L., Mirkin, C. A., 2005, Nanostructures in biodiagnostics, *Chem. Rev.*, 105, 1547–1562.
- [89] Katz, E., Willner, I., 2004, Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 43, 6042–6108.
- [90] Di Ventra, M., Evoy, S., Heflin Jr., J.R., 2004, *Introduction to Nanoscale Science and Technology*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- [91] Siegel, R. W., 1994, *Nanophase materials*, In Encyclopedia of applied physics, 11, Trigg, G. L. (ed.), Weinheim: VCH, 1-27.
- [92] Xia, Y., Halas, N. J., 2005, Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures, *MRS Bulletin*, 30, 338-347.
- [93] Liveri, V.T., 2006, *Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems*, Springer-Verlag, New York.

- [94] Drude, L., 1900, On the electron theory of metals, *Annalen der Physik* 1, 3, 566-613.
- [95] Mie, G., 1908, Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions, *Annalen der Physik*, 25 (3), 377-445.
- [96] Lee, K.-S., 2006, El-Sayed, M.A., Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition, *J. Phys. Chem. B*, 110, 19220-19225.
- [97] Kreibig, U., Volmer, M., 1995, *Optical properties of metal clusters*, Springer-Verlag, Berlin.
- [98] Ruach-Nir, I., Bendikov, T.A., Doron-Mor, I., Barkay, Z., Vaskevich, A., Rubinstein, I., 2007, Silica-stabilized gold island films for transmission localized surface plasmon sensing, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 84-92.
- [99] Siegel, J., Kvitek, O., Ulbrich, P., Kolska, Z., Slepicka, P., Svorcik, V., 2012, Progressive approach for metal nanoparticle synthesis, *Materials Letters*, 89, 47–50.
- [100] Kelly, L. K., Coronado, E., Zhao, L., Schatz, G. C., 2003, The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment, *Journal of Physical Chemistry B*, 107, 668-677.
- [101] Lisiecki, L., Billoudet, F., Pileni, P., 1996, Control of the shape and the size of copper metallic particles, *Journal of Physical Chemistry*, 4160-4166.
- [102] Pileni, M. P., 1998, Optical properties of nanosized particles dispersed in colloidal solutions or arranged in 2D or 3D superlattices, *New Journal of Chemistry*, 693-702.
- [103] El-Sayed, M., Link, S., 2000, Shape and size dependence of radiative, nonradiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *International Reviews in Physical Chemistry*, 19 (3), 409-453.
- [104] Pileni, M. P., Supra- and nanocrystallinities: a newscientific adventure, 2011, *J. Phys.: Condens. Matter* ,23, 503102, 1-8.
- [105] Moores, A., Goettmann, F., 2006, The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications, *New Journal of Chemistry*, 30, 1121-1132.
- [106] Solomon, S., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A., Rutkowsky, S., Boritz, C., Mulfinger, L., 2007, Synthesis and study of silver nanoparticles, *Journal of Chemical Education*, 84 (2), 322-325.

- [107] Kim, T., Lee, C.-H., Joo, S.-W., Lee, K., 2008, Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling, *Journal of Colloid and Interface Science*, 318, 238–243.
- [108] Bahadory, M., 2008, *Synthesis of Noble Metal Nanoparticles*, Thesis (PhD), Drexel University.
- [109] Haes, A. J., Hall, W. P., Chang, L., Klein, W. L., Van Duyne, R. P., 2004, A localized surface plasmon resonance biosensor: First steps toward an Alzheimer's disease assay, *Nano Lett.*, 4, 1029–1034.
- [110] Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Whyman, R. J., 1994, Synthesis of thiol-derivatized gold nanoparticles in a twophase liquid-liquid system, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 801-802.
- [111] Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009, Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, *J Nanopart Res*, 11, 77–89.
- [112] Feldheim, D.L., Foss, C.A., 2002, *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*, Boca Raton, FL: CRC Press.
- [113] Sepeur, S., 2008, *Nanotechnology: technical basics and applications*. Hannover: Vincentz.
- [114] Shahverdi A.R., Shakibaie, M., Nazari, P., 2011, *Basic and practical procedures for microbial synthesis of nanoparticles*, Metal nanoparticles in microbiology, In: Rai, M., Duran, N. (ed.), Berlin: Springer, 177–197.
- [115] Mittal, A. K., Chisti, Y., Banerjee, U. C., 2013, Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 31, 346–356.
- [116] Huang, H., Yang, X., 2004, Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method, *Carbohydrate Res*, 339, 2627–2631.
- [117] Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M., 2004, Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth, *J Colloid Interface Sci*, 275, 496–502.
- [118] Cao, G., 2004, *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications*, London: Imperial College Press.
- [119] Schaffer, B., Hohenester, U., 2009, Trugler, A., Hofer, F., High-resolution surface plasmon imaging of gold nanoparticles by energy-filtered transmission electron microscopy, *Phys Rev B*, 79.

- [120] Eppler, A. S., Rupprechter, G., Anderson, E. A., Somorjai, G. A., 2000, Thermal and chemical stability and adhesion strength of Pt nanoparticle arrays supported on silica studied by transmission electron microscopy and atomic force microscopy, *J Phys Chem B*, 104, 7286–7292.
- [121] Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C. W., 2006, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett*, 6, 662–668.
- [122] Sun, S., Murray, C., Weller, D., Folks, L., Moser, A., 2000, Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices, *Science*, 287, 1989–1992.
- [123] Strasser, P., Koh, S., Anniyev, T., Greeley, J., More, K., Yu, C., 2010 Lattice-strain control of the activity in dealloyed core–shell fuel cell catalysts, *Nat Chem*, 2, 454–460.
- [124] Diamond, D., 1998, *Principles of Chemical and Biological Sensors*, Wiley Interscience, New York, 0-471-54619-4.
- [125] Cattrall, W. R., 1997, *Chemical Sensors*, Oxford University Press, Oxford, 71.
- [126] Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., 1991, Chemical sensors definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1247-1250.
- [127] Wang, J., 1999, Electroanalysis and biosensors, *Analytical Chemistry*, 12, 328-332.
- [128] Newcombe, D.T., Cardwell, T.J., Cattrall, R.W., Kolev, S.D., 1999, An optical redox chemical sensor based on ferroin immobilised in a nafion membrane, *Analytica Chimica Acta*, 401, 137-144.
- [129] Kawalec, A., Jasek, K., Pasternak, M., 2008, Measurements results of SAW humidity sensor with nafion layer, *European Physical Journal-Special Topics*, 154, 123-6.
- [130] Xu, H., Kall, M., 2002, Modeling the optical response of nanoparticle-based surface plasmon resonance sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 87 (2), 244-249.
- [131] Yonzon, C. R., Stuart, D. A., Zhang, X., McFarland, A. D. Haynes, C. L., Van Duyne, R. P., 2005, Towards advanced chemical and biological nanosensors, an overview, *Talanta*, 67, 438–448.
- [132] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

- [133] Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, 84, 407-412.
- [134] Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods of Enzymology*, 234, 279-293.
- [135] Pellegrini, R. E. R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- [136] Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- [137] Sanchez, M. C., Larrauri, J. A., Saura, C. F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- [138] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-175.
- [139] Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.
- [140] Cao, G., Verdon, C.P., Wu, A.H.B., Wang, H., Prior, R.L., 1995, Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA, II. *Clinical Chemistry*, 41, 1738-1744.
- [141] Cao, G., Prior, R. L., 1999, The Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.
- [142] Glazer, A. N., 1990, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.
- [143] Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K., Locke, U. S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187, 33-37.
- [144] Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Locke, S., 1986, The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent, *Biochimica et Biophysica Acta*, 884, 119-123.
- [145] Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods of Enzymology*, 234, 279-293.

- [146] Alho, H., Leinonen, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods of Enzymology*, 299, 3-14.
- [147] Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G., Maxwell, S. R. J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 266, 265-277.
- [148] Tubaro, F., Ghiselli, A., Papuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F., 1998, Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 1228-1234.
- [149] Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J. Jr., Fong, J. H., Blanchard, K. A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biology & Medicine*, 24, 480-493.
- [150] Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A., 1995, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radical Biology & Medicine*, 18, 29-36.
- [151] Egwim, I. O. C., Gruber, H. J., 2001, Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'-dithiodipyridine, *Analytical Biochemistry*, 288, 188-194.
- [152] Sava, N., Plancken, I. V. D., Claeys, W., Hendrickx, M., 2005, The kinetics of heat-induced structural changes of {beta}-Lactoglobulin, *J. Dairy Sci.*, 88, 1646-1653.
- [153] Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., Apak, R., 2012, Development of a silver nanoparticle-based method for the antioxidant capacity measurement of polyphenols, *Anal. Chem.*, 84, 8052–8059.
- [154] Güçlü, K., Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Apak, R., 2013, Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles, *Analytica Chimica Acta*, 794, 90– 98.
- [155] Li, Z. P., Duan, X. R., Liu, C. H., Du, B. A., 2006, Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, 351, 18–25.
- [156] Kumar, V., Yadav, S. C., Yadav, S. K., 2010, *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 1301–1309.
- [157] Ling, J., Sang, Y., Huang, C. Z., 2008, Visual colorimetric detection of berberine hydrochloride with silver nanoparticles, *J Pharm Biomed Anal.*, 47, 860-864.

- [158] Liu, Q., Liu, H., Yuan, Z., Wei, D., Ye, Y., 2012, Evaluation of antioxidant activity of chrysanthemum extracts and tea beverages by gold nanoparticles-based assay, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92, 348–352.
- [159] Nezhad, M. R. H. Alimohammadi, M. Tashkhourian, J. Razavian, S. M., 2008, Optical detection of phenolic compounds based on the surface plasmon resonance band of Au nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A*, 71, 199–203.
- [160] Huang, Y.-F., Chang, H.-T., 2006, Nile red-adsorbed gold nanoparticle matrixes for determining aminothiols through, *Anal. Chem.*, 78, 1485–1493.
- [161] Nezhad, M. R. H., Seyedhosseini, E., Robatjazi, H., 2012, Spectrophotometric determination of glutathione and cysteine based on aggregation of colloidal gold nanoparticles, *Scientia Iranica F*, 19 (3), 958–963.
- [162] Yang, X.-H., Ling, J., Peng, J., Cao, Q.-E., Wang, L., Ding, Z.-T., Xiong, J., 2013, Catalytic formation of silver nanoparticles by bovine serum albumin protected-silver nanoclusters and its application for colorimetric detection of ascorbic acid, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, 224–230.
- [163] Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G., Lercker, G., 2003, Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 1011, 163–172.
- [164] Lee, P. C., Meisel, D., 1982, Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols, *J. Phys. Chem.*, 86, 3391–3395.
- [165] Scampicchio, M., Wang, J., Blasco, A. J., Arribas, A. S., Mannino, S., Escarpa, A., 2006, Nanoparticle-based assays of antioxidant activity, *Anal. Chem.*, 78, 2060–2063.
- [166] Nair, L. S., Laurencin, C. T., 2007, Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 3, 301–316.
- [167] Kumar, S., Gandhi, K. S., Kumar, R., 2007, Modeling of formation of gold nanoparticles by citrate method, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 46, 3128–3136.
- [168] Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.*, 66, 401–436.
- [169] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S. E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchim. Acta*, 160, 413–419.

- [170] Simic, A., Manojlovic, D., Segan, D., Todorovic, M., 2007, Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules*, 12, 2327–2340.
- [171] Koyama, J., Morita, I., Kobayashi, N., Konoshima, T., Takasaki, M., Osakai, T., Tokuda, H., 2008, Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of flavonoids, *Cancer Lett.*, 263, 61–66.
- [172] Tütem, E., Apak, R., Baykut, F., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116, 89–94.
- [173] Miller, J. C., Miller, J. N., 1993, *Statistics for analytical chemists*, Third Edition; Ellis Horwood and Prentice Hall: New York and London.
- [174] Friedman, M., 1973, *Reactive and unreactive sulfhydryl groups*, in: *The chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group in amino acids, peptides and proteins*, Pergamon, New York.
- [175] Ellman, G. L., Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82 (1959) 70–77.
- [176] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone Jr., R. M., 1961, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88–95.
- [177] Bain, C. D., Biebuyck, H. A., Whitesides, G. M., 1989, Comparison of self-assembled monolayers on gold: Coadsorption of thiols and disulfides, *Langmuir*, 5, 723–727.
- [178] Whitesides, G. M., Lilburn, J. E., Szajewski, R. P., 1977, Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's Reagent, *J. Org. Chem.*, 42, 332–338.
- [179] Chan, K.-Y., Wasserman, B. P., 1993, Direct colorimetric assay of free thiol groups and disulfide bonds in suspensions of solubilized and particulate cereal proteins, *Cereal Chem.*, 70, 22–26.
- [180] Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A., 1991, Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *J. Biol. Chem.*, 266, 4244–4250.
- [181] Bravo-Osuna, I., Teutonico, D., Arpicco, S., Vauthier, C., Ponchel, G., 2007, Characterization of chitosan thiolation and application to thiol quantification onto nanoparticle surface, *Int. J. Pharm.*, 340, 173–181.
- [182] Riddles, P. W., Blakeley, R. L., Zerner, B., 1983, Reassessment of Ellman's reagent, *Methods Enzymol.*, 91, 49–60.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Nilay GÜNGÖR
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	27.08.1984, İstanbul
Telefon	0(212) 631 8543
E-mail	nilgfb@hotmail.com
Web adres	

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Bölümü / Analitik Kimya	2014
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Bölümü / Analitik Kimya	2009
Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Mühendislik Fak. / Kimya Bölümü	2006
Lise	Y.D.A. Eminönü Cıbalı Lisesi	2002

Makaleler / Bildiriler

Makaleler

1. K. Güçlü, **N. Güngör**, M. Özyürek, S. Baki, R. Apak, “Selective optical sensing of biothiols with Ellman's reagent: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)-modified gold nanoparticles”, *Anal. Chim. Acta*, in press, (2013).
2. M. Özyürek, **N. Güngör**, S. Baki, K. Güçlü, R. Apak, “Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols”, *Anal. Chem.*, 84,18, 8052–8059, (2012).

3. M. Özyürek, S. Baki, **N. Güngör**, S.E. Çelik, K. Güçlü, R. Apak, "Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection", *Anal. Chim. Acta*, 750, 173–181, (2012).
4. **N. Güngör**, M. Özyürek, K. Güçlü, S. Demirci Çekiç, R. Apak, "Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods", *Talanta*. 83, 1650-1658 (2011).
5. M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, **N. Güngör**, R. Apak, "A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using CUPric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) methodology", *J. Food Compos. Anal.* 23, 689-698 (2010).
6. M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, K. Güçlü, **N. Güngör**, R. Apak, "Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method", *Anal. Chim. Acta*. 630, 28-39 (2008).

Bildiriler

1. **N. Güngör**, M. Özyürek, K. Güçlü, S. Baki, R. Apak, "Tiyol Grubu Antioksidanlara Duyarlı Altın Nanoparçacık Esaslı Sensör Geliştirilmesi", 26. Ulusal Kimya Kongresi, 01-06 Ekim 2012, Fethiye-Muğla, Türkiye, Özet Kitabı, AP-TR-034, 126.
2. S. Baki, M. Özyürek, K. Güçlü, **N. Güngör**, R. Apak, "Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için Gümüş Nanoparçacık Esaslı Yöntem Geliştirilmesi", 26. Ulusal Kimya Kongresi, 01-06 Ekim 2012, Fethiye-Muğla, Türkiye, Özet Kitabı, AP-TR-037, 132.
3. **N. Güngör**, M. Özyürek, K. Güçlü, R. Apak, "Application of Spectrophotometric Cuprac Antioxidant Capacity Assay to Compounds Containing Thiol Groups", 6th Aegean Analytical Chemistry Days, 9-12 Oct. 2008, Denizli, Turkey, Book of Abstracts, PPI-009, 71.
4. M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, **N. Güngör**, K. Güçlü, R. Apak, "Determination of Hydrogen Peroxide Scavenging Activity of Phenolics And Flavonoids With A Modified CUPRAC Method", 5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 23-26 September 2009, Fatsa-Ordu, Turkey, Book of Abstracts, PPIII-3, 186.
5. **N. Güngör**, K. Güçlü, M. Özyürek, B. Bektaşoğlu, R. Apak, "Analysis of Thiol-Type Compounds In Pharmaceuticals Using CUPRAC and HPLC Assays", 5th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 23-26 September 2009, Fatsa-Ordu, Turkey, Book of Abstracts, PPIII-2, 185.