



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BESİN ÖZÜTLERİ VE SERUMDA ANTIOKSİDAN
KAPASİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN MOLEKÜLER
SPEKTROSKOPİK SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Kimyager Mustafa BENER

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof.Dr. Reşat APAK

II. Danışman

Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Haziran, 2013

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BESİN ÖZÜTLERİ VE SERUMDA ANTİOKSİDAN
KAPASİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN MOLEKÜLER
SPEKTROSKOPİK SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ**

Yüksek Kimyager Mustafa BENER

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Prof.Dr. Reşat APAK

II. Danışman

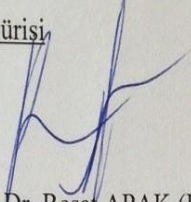
Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK

Haziran, 2013

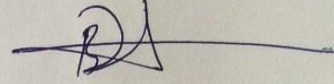
İSTANBUL

Bu çalışma 13/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

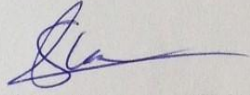
Tez Jürisi



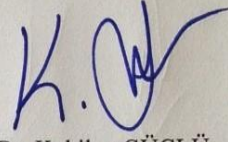
Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



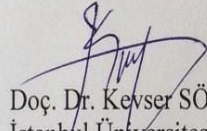
Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Süleyman AKMAN
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Keyser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 18392 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışman 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 kariyerimin her aşamasında çalışmalarına özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla yakından ve içtenlikle ilgilenen hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok değerli hocam, ikinci tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik tecrübelerinden yararlandığım ve aynı zamanda tez izleme jürimde yeralan değerli hocam Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye en içten dileklerle şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Akademik kimliği ve kişiliği ile örnek aldığım, görevli olduğum Anorganik Kimya Anabilim Dalı Başkanı olan ve çalışmalarımın her aşamasında gösterdiği yüksek hoşgörü ve yardımları için Sayın Prof. Dr. Bahri ÜLKÜSEVEN'e en derin ve içten şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

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

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Burcu BEKDEŞER'e, Yük. Kimyager Nilay GÜNGÖR'e, Yük. Kimyager Sefa BAKI'ye, Araş. Gör. Esin KONDAKÇI'ya, Yüksek Kimyager Gülşah KIBRISLIOĞLU'na ve diğer grup arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan 18392 numaralı doktora tez projesine destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve yurt dışı doktora sırası burs programı (2214) kapsamında ABD Louisiana State Üniversitesi Gıda Bilimi Departmanında yaptığım çalışma sırasında maddi destek sağlayan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca yardımları, destekleri ve sabırları için başta annem Rabia BENER olmak üzere nişanlım Sedef KILIÇ'a ve değerli aileme yürekten teşekkür ederim.

Haziran, 2013

Mustafa BENER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ	xi
SEMBOL LİSTESİ	xiv
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	7
2.1. OKSİDATİF GERİLİM VE ANTİOKSİDANLAR	7
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLER.....	11
2.2.1. E vitamini.....	11
2.2.2. Askorbik Asit (C vitamini)	11
2.2.3. Antioksidan Enzimler	12
2.2.3.1. Süperoksit Dismutaz.....	12
2.2.3.2. Glutasyon Peroksidaz.....	12
2.2.3.3. Katalaz	13
2.2.4. Karotenoidler.....	13
2.2.5. Polifenoller	13
2.2.5.1. Flavonoidler.....	14
2.2.5.2. Fenolik Asitler	16
2.2.5.3. Fenolik polimerler (Tanenler).....	17
2.2.6. Tiyol Tipi Antioksidanlar	18
2.2.6.1. Glutasyon.....	18
2.2.6.2. Sistein	18
2.2.6.3. Homosistein.....	19
2.2.6.4. N-asetil sistein.....	19
2.2.6.5. Metiyonin.....	20

2.2.6.6. <i>Lipoik Asit</i>	20
2.3. ANTİOKSİDAN KAPASİTEYE ETKİ EDEN FAKTÖRLER	20
2.4. SENSÖRLER	22
2.4.1. Kimyasal Sensörler	22
2.4.1.1. <i>Optik Sensörler</i>	24
2.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	30
2.5.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	30
2.5.1.1. <i>ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi</i>	30
2.5.1.2. <i>TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi</i>	31
2.5.1.3. <i>Luminol Yöntemi</i>	31
2.5.1.4. <i>Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocine Bleaching Assay)</i>	32
2.5.1.5. <i>TOSC (Toplam Oksiradikal Uzaklaştırma Kapasitesi) Yöntemi</i>	32
2.5.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	33
2.5.2.1. <i>CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi</i>	33
2.5.2.2. <i>TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi</i> ...	35
2.5.2.3. <i>FRAP (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü) Yöntemi</i>	36
2.5.2.4. <i>DPPH Yöntemi</i>	36
2.5.2.5. <i>Folin Ciocalteu Yöntemi</i>	37
2.6. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN GIDA ÖRNEKLERİ	38
2.6.1. Meyve Suları	38
2.6.1.1. <i>Portakal Suyu</i>	38
2.6.1.2. <i>Vişne Suyu</i>	38
2.6.1.3. <i>Kayısı Suyu</i>	38
2.6.1.4. <i>Şeftali Suyu</i>	38
2.6.2. Meyve Posaları	39
2.6.2.1. <i>Üzüm Posası</i>	39
2.6.2.2. <i>Yaban Mersini Posası</i>	40
2.6.3. Baharatlar	40
2.6.3.1. <i>Zerdeçal (Curcuma longa L.)</i>	40

2.6.3.2. Zencefil (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>).....	41
2.6.3.3. Havlıcan (<i>Alpinia officinarum</i>).....	42
2.6.3.4. Aspir Çiçeği (<i>Carthamus tinctorius</i>).....	43
2.7. SENSÖR ESASLI ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ İLE İLGİLİ UYGULAMALAR	43
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	46
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	46
3.2. KİMYASAL MADDELER	46
3.3. ÇÖZELTİLERİN, ÖZÜTLERİN, HİDROLİZATLARIN VE HOMOJENİZATLARIN HAZIRLANMASI	47
3.3.1. Standart Antioksidan Bileşiklerin Hazırlanması.....	47
3.3.2. Yeşil Çay Özütünün Hazırlanması.....	47
3.3.3. Üzüm ve Yaban Mersini Posasının Hazırlanması.....	47
3.3.4. Üzüm ve Yaban Mersini Posası Hidrolizatlarının Hazırlanması	48
3.3.5. Üzüm ve Yaban Mersini Posası Özütlerinin Hazırlanması.....	48
3.3.6. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması	48
3.3.7. Baharat Özütlerinin Hazırlanması.....	48
3.3.8. Doku Homojenizatlarının Hazırlanması.....	49
3.3.9. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	49
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	49
3.4.1. Orijinal CUPRAC Yöntemi	49
3.4.2. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemi (CUPRAC Antioksidan Sensörü).....	50
3.4.3. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü	50
4. BULGULAR	52
4.1. OPTİK SENSÖR ESASLI CUPRAC YÖNTEMİNİN STANDART ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI.....	52
4.1.1. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi.....	52
4.1.2. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Troloks Antioksidan Bileşiğine Uygulanması.....	54

4.1.3. Standart Antioksidan Bileşiklerin Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemine Göre Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi.....	56
4.1.3.1. <i>Kuersetin</i>	56
4.1.3.2. <i>Kateşin</i>	57
4.1.3.3. <i>Rutin</i>	57
4.1.3.4. <i>Kafeik asit</i>	58
4.1.3.5. <i>Fisetin</i>	58
4.1.3.6. <i>Morin</i>	59
4.1.3.7. <i>Naringin</i>	59
4.1.3.8. <i>Kaemferol</i>	60
4.1.3.9. <i>Naringenin</i>	60
4.1.3.10. <i>Rozmarinik asit</i>	61
4.1.3.11. <i>Gallik asit</i>	61
4.1.3.12. <i>Delfinidin</i>	62
4.1.3.13. <i>Glutasyon</i>	62
4.1.3.14. <i>Askorbik asit</i>	63
4.1.3.15. <i>Sistein</i>	63
4.1.3.16. <i>Homosistein</i>	64
4.1.3.17. <i>Ürik asit</i>	64
4.1.3.18. <i>α-tokoferol</i>	65
4.1.3.19. <i>Bilirubin</i>	65
4.1.4. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımı	68
4.1.5. Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması ve Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemi Uygulanarak Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan TEAC Değerlerinin Karşılaştırılması	69
4.2. OPTİK SENSÖR ESASLI CUPRAC YÖNTEMİNİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI	70
4.2.1. Meyve Suyu Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi.....	70

4.2.1. Meyve Posası Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi.....	71
4.2.1.1. Üzüm ve Yaban Mersini Posalarının Farklı pH'larda Hazırlanan Hidrolizatlarının Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi..	71
4.2.1.2. Üzüm ve Yaban Mersini Posa Özütlelerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	73
4.2.1.3. Yaban Mersini Posasına Uygulanan Fırınlama İşleminin Toplam Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi.....	74
4.2.3. Baharat Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi.....	76
4.2.4. Biyolojik Örneklerin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi.....	77
4.3. FİBER-OPTİK REFLEKTOMETRİK CUPRAC SENSÖRÜNÜN STANDART ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI.....	78
4.3.1. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörünün Troloks Antioksidan Bileşiğine Uygulanması.....	78
4.3.2. Standart Antioksidan Bileşiklerin Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Doğru Denklemlerinin, Lineer Çalışma Aralıklarının ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi.....	79
4.3.2.1. Kuersetin.....	80
4.3.2.2. Kateşin.....	80
4.3.2.3. Rutin.....	81
4.3.2.4. Kafeik asit.....	81
4.3.2.5. Fisetin.....	82
4.3.2.6. Morin.....	82
4.3.2.7. Naringin.....	83
4.3.2.8. Kaemferol.....	83
4.3.2.9. Naringenin.....	84
4.3.2.10. Rozmarinik asit.....	84
4.3.2.11. Gallik asit.....	85
4.3.2.12. Delfinidin.....	85
4.3.2.13. Glutatyon.....	86

4.3.2.14. Askorbik asit.....	86
4.3.2.15. Sistein.....	87
4.3.2.16. Homosistein.....	87
4.3.2.17. Ürik asit.....	88
4.3.2.18. α -tokoferol.....	88
4.3.2.19. Bilirubin.....	89
4.3.3. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörünün Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımı	92
4.3.4. Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması ve Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan TEAC Değerlerinin Karşılaştırılması	93
4.4. FİBER-OPTİK REFLEKTOMETRİK CUPRAC SENSÖRÜNÜN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI	94
4.4.1. Meyve Suyu Örneklerinin Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	94
4.4.2. Baharat Örneklerinin Fiber-Optik Reflektans CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	95
4.4.3. Biyolojik Örneklerin Fiber-Optik Reflektans CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	96
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	97
KAYNAKLAR	111
ÖZGEÇMİŞ.....	122

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin rektif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim).	7
Şekil 2.2: Oksidatif gerilime sebep olan serbest radikal kaynakları.....	8
Şekil 2.4: α -tokoferolün kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.5: C vitamininin kimyasal yapısı.	11
Şekil 2.6: β -karotenin kimyasal yapısı.	13
Şekil 2.7: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.8: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları.	15
Şekil 2.9: Fenolik asitlerin (bazı hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitlerin) kimyasal yapıları.	17
Şekil 2.10: Fenolik polimerlerin yapısı.	17
Şekil 2.11: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.12: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.13: Homosistein ve homosistinin kimyasal yapısı.	19
Şekil 2.14: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.	19
Şekil 2.15: Metiyoninin kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.16: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.17: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.	22
Şekil 2.18: Nafyonun ($C_7HF_{13}O_5S.C_2F_4$) yapısı.	25
Şekil 2.19: Optik fiber bileşenleri ve ışık iletiminin şematik gösterimi.	26
Şekil 2.20: Lüminesans sinyallerinin elde edilmesi için kullanılan a) Tek fiberli sensör ve b) Çoklu fiber sensör için tipik enstrümental kurulum.	29
Şekil 2.21: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.	34
Şekil 2.22: $ABTS^{+}$ katyonunun yapısı.	35
Şekil 2.23: $ABTS$ radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.	36
Şekil 2.24: Üzüm posasının görünümü.....	39
Şekil 2.25: Yaban mersini posasının görünümü.	40
Şekil 2.26: Zerdeçal bitkisinin görünümü.	40
Şekil 2.27: Kurkuminin kimyasal yapısı.	41
Şekil 2.28: Zencefil bitkisinin görünümü.	41
Şekil 2.29: 6-gingerol'ün kimyasal yapısı.	41
Şekil 2.30: Havlıcan bitkisinin görünümü.	42
Şekil 2.31: Galangin'in kimyasal yapısı.	42
Şekil 2.32: Aspir çiçeğinin görünümü.	43
Şekil 2.33: Kuersetin ve luteolinin kimyasal yapısı.	43
Şekil 3.1: Optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin şematik gösterimi.	50
Şekil 3.2: Reflektans ölçüm düzeneği.	51
Şekil 4.1: Referans sensör için karıştırma süresi-absorbans grafiği.	53
Şekil 4.2: Referans sensörün bekleme süresi-absorbans grafiği.....	53
Şekil 4.3: Örnek tayini için karıştırma süresi-absorbans grafiği.	54

Şekil 4.4: Çeşitli konsantrasyonlarda (son konsantrasyon) troloks varlığında sensör üzerinde oluşan Cu(I)-Nc kelatının görünür alan spektrumu.....	55
Şekil 4.5: Troloks bileşiğinin optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.	55
Şekil 4.6: Kuersetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	56
Şekil 4.7: Kateşin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	57
Şekil 4.8: Rutin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	57
Şekil 4.9: Kafeik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	58
Şekil 4.10: Fisetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	58
Şekil 4.11: Morin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	59
Şekil 4.12: Naringin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	59
Şekil 4.13: Kaemferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	60
Şekil 4.14: Naringenin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	60
Şekil 4.15: Rozmarinik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	61
Şekil 4.16: Gallik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	61
Şekil 4.17: Delfinidin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil 4.18: Glutatyon bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	62
Şekil 4.19: Askorbik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil 4.20: Sistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	63
Şekil 4.21: Homosistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	64
Şekil 4.22: Ürik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	64
Şekil 4.23: α - tokoferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	65
Şekil 4.24: Bilirubin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	65
Şekil 4.25: Bazı meyve suyu örneklerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	70
Şekil 4.26: Üzüm posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	71
Şekil 4.27: Yaban mersini posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	72
Şekil 4.28: Meyve posası özütlerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	73
Şekil 4.29: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde orijinal CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi (N=3).	74
Şekil 4.30: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.....	75
Şekil 4.31: Orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	76
Şekil 4.32: Bazı biyolojik örneklerin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	77

Şekil 4.33: Çeşitli konsantrasyonlarda (son konsantrasyon) troloks varlığında reflektometrik sensör üzerinde oluşan Cu(I)-Nc kelatının görünür alan reflektans spektrumu ((a) 7.9 µM (b) 15.8 µM (c) 23.7 µM (d) 31.6 µM).	78
Şekil 4.34: Troloks bileşiğinin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	79
Şekil 4.35: Kuersetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	80
Şekil 4.36: Katesin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	80
Şekil 4.37: Rutin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	81
Şekil 4.38: Kafeik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	81
Şekil 4.39: Fisetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	82
Şekil 4.40: Morin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	82
Şekil 4.41: Naringin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	83
Şekil 4.42: Kaemferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	83
Şekil 4.43: Naringenin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	84
Şekil 4.44: Rosmarinik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	84
Şekil 4.45: Gallik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	85
Şekil 4.46: Delfinidin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	85
Şekil 4.47: Glutasyon bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	86
Şekil 4.48: Askorbik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	86
Şekil 4.49: Sistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	87
Şekil 4.50: Homosistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	87
Şekil 4.51: Ürik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.....	88
Şekil 4.52: α-tokoferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	88
Şekil 4.53: Bilirubin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.	89
Şekil 4.54: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı meyve suyu örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	94
Şekil 4.55: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.	95
Şekil 4.56: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı biyolojik örneklerin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitüsyon modelleri ve besin kaynakları [42].	16
Tablo 4.1: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (c: molar konsantrasyon ve A: absorbans).	56
Tablo 4.2: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	57
Tablo 4.3: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	57
Tablo 4.4: Kafeik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	58
Tablo 4.5: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	58
Tablo 4.6: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	59
Tablo 4.7: Naringinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	59
Tablo 4.8: Kaemferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	60
Tablo 4.9: Naringenin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	60
Tablo 4.10: Rozmarinik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	61
Tablo 4.11: Kafeik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	61
Tablo 4.12: Delfinidinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	62
Tablo 4.13: Glutatyonun konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	62
Tablo 4.14: Askorbik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	63
Tablo 4.15: Sisteinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	63
Tablo 4.16: Homosisteinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	64
Tablo 4.17: Ürik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	64
Tablo 4.18: α -tokoferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	65
Tablo 4.19: Bilirubinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.	65
Tablo 4.20: Gıda antioksidanlarının optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.	66
Tablo 4.21: Plazma antioksidanlarının optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.	67
Tablo 4.22: Yeşil çay özütüne antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3).	68
Tablo 4.23: Sentetik antioksidan karışımlarının beklenen ve bulunan troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri.	69
Tablo 4.24: Bazı meyve suyu örneklerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.	70
Tablo 4.25: Üzüm posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.	71
Tablo 4.26: Yaban mersini posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).	72
Tablo 4.27: Meyve posası özütlerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).	73

Tablo 4.28: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde orijinal CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	74
Tablo 4.29: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerleri (N=3).	75
Tablo 4.30: Orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	76
Tablo 4.31: Bazı biyolojik örneklerin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	77
Tablo 4.32: Kuersetinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	80
Tablo 4.33: Kateşinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	80
Tablo 4.34: Rutinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	81
Tablo 4.35: Kafeik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	81
Tablo 4.36: Fisetinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	82
Tablo 4.37: Morinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	82
Tablo 4.38: Naringinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	83
Tablo 4.39: Kaemferolün konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	83
Tablo 4.40: Naringenin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	84
Tablo 4.41: Rozmarinik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	84
Tablo 4.42: Gallik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	85
Tablo 4.43: Delfinidinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	85
Tablo 4.44: Glutasyonun konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	86
Tablo 4.45: Askorbik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi. ...	86
Tablo 4.46: Sisteinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	87
Tablo 4.47: Homosisteinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	87
Tablo 4.48: Ürik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	88
Tablo 4.49: α -tokoferolün konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.....	88
Tablo 4.50: Bilirubinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.	89
Tablo 4.51: Gıda antioksidanlarının fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.....	90
Tablo 4.52: Plazma antioksidanlarının fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.....	91
Tablo 4.53: Yeşil çay özütüne antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3).	92
Tablo 4.54: Sentetik karışımların beklenen ve bulunan troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri.....	93
Tablo 4.55: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı meyve suyu örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	94
Tablo 4.56: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	95

Tablo 4.57: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı biyolojik örneklerin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).....	96
---	----

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Nc	: neokuproin
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
TR	: troloks
TAC	: toplam antioksidan kapasite
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
HAT	: hidrojen atomu transfer
ET	: elektron transfer
ROS	: reaktif oksijen türleri
AAPH	: 2,2'azobis (2-metil propionamidin) dihidroklorür
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
FRAP	: demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
QR	: kuersetin
CT	: kateşin
TOC	: α -tokoferol
GSH	: glutatyon
CYS	: sistein
HCYS	: homosistein
BIL	: bilirubin
KA	: kaemferol
RA	: rozmarinik asit
RT	: rutin
CFA	: kafeik asit
FS	: fisetin
MR	: morin
N	: naringin
NG	: naringenin
GA	: gallik asit
AA	: askorbik asit
UA	: ürik asit
DP	: delfinidin

ÖZET

BESİN ÖZÜTLERİ VE SERUMDA ANTIOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜMÜ İÇİN MOLEKÜLER SPEKTROSKOPİK SENSÖRLER GELİŞTİRİLMESİ

Reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan 'oksidatif gerilim' koşulları altında kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan hastalıklarla savaşmanın en iyi yolu antioksidanlarca zengin gıdalar tüketerek reaktif oksijen türleri seviyesini dengelemektir. Antioksidanlar oksidasyonu engelleyen veya geciktirebilen maddelerdir. Günümüzde reaktif oksijen türlerinin canlı organizmalardan uzaklaştırılması ve bu türleri süpürebilen antioksidanların araştırılmasına olan ilgi giderek artmaktadır. Bu tez çalışmasında yeni geliştirilen moleküler spektroskopik sensörlerde amaç; besin özütlerinde ve biyolojik örneklerde toplam antioksidan kapasite (TAC) tayini için literatürdeki mevcut yöntemlerin eksikliklerini ve kısıtlamalarını ortadan kaldırabilmektir. Bu bağlamda, çalışma grubumuzca daha önce literatüre kazandırılan ve dünyada yaygın kullanım alanına sahip CUPRAC 'Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' tayin yönteminin esasına bağlı kalınarak besin özütleri ve biyolojik örneklerde TAC tayini için moleküler sensör esaslı spektroskopik yöntemler geliştirilerek CUPRAC yönteminin uygulama alanı genişletilmiştir.

Tez çalışmasında, gıda özütlerinde ve biyolojik örneklerde toplam antioksidan tayini için düşük maliyetli ve geniş kullanım alanı bulabilecek sensör esaslı spektrofotometrik yöntemler (optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör) geliştirilmiştir. Nafyon persülfolanmış bir polimerdir. Bu polimer membran hidrofobik perfloroetilen ana iskeletine sülfolanmış perfloroeter gruplarının düzenli aralıklarla bağlanmasıyla oluşmuştur. Nafyonun CUPRAC reaktifiyle türevlendirilmesi sonucu üretilen kimyasal sensör kullanımıyla geliştirilen yöntemlerde çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan nihai ürünlerin absorpsiyon veya reflektans değerleri ölçülmüş ve analitlerin antioksidan kapasiteleri ile ilişkilendirilmiştir.

Geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin temelinde, CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) kompleksi katyon değiştirici polimerik membran olan nafyon film üzerinde tutturulduktan sonra antioksidan varlığında redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatının absorpsiyondaki değişimler 450 nm'de ölçülmektedir. Tez kapsamında geliştirilen diğer bir sensör esaslı antioksidan kapasite tayin yöntemi olan fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörüne göre ise, Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidan ile reaksiyonu sonucu Nafyon membran üzerinde oluşan Cu(I)-Nc kelatının reflektansındaki oluşan değişimler minyatür reflektans spektrometresi kullanılarak 530 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Böylece geliştirilen membran sensörlerin absorpsiyon ve reflektansları farklı dalga boylarında okunmuştur. Absorptimetrik sensörden farklı olarak reflektometrik sensör, ışık geçirgenliği olmayan opak ortamlara da uyarlanabilmektedir.

Çeşitli antioksidan bileşiklerin (C ve E vitaminleri ve polifenolik bileşikler, tiyol tipi antioksidanlar) troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri geliştirilen optik

sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile belirlendikten sonra orijinal CUPRAC yöntemi bulgularıyla karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntemler için güvenilirliği ve hassasiyeti tanımlayan lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım parametreleri test edilerek yöntem validasyonu yapılmıştır. Standart antioksidan bileşikler için geliştirilen yöntem bunların sentetik karışım çözeltilerine uygulanarak bulunan TAC değerleri, standart antioksidanların bireysel TEAC değerleri kullanılarak hesaplanan beklenen TAC değerleri ile karşılaştırılmıştır. Son olarak geliştirilen yöntemler besin özütleri (meyve suları, meyve posası ve baharat özütleri) ve biyolojik örnekler (inek serumu, sıçan böbrek ve karaciğer dokusu) gibi kompleks matrislere uygulanmıştır ve elde edilen TAC değerleri orijinal CUPRAC yöntemi ile bulunan değerlere karşı valide edilmiştir.

Tez çalışmasının sonucunda geliştirilen sensör esaslı yöntemler kullanılarak besin özütleri ve biyolojik örneklerde TAC tayininin daha hızlı, basit ve düşük maliyetle yapılabilmesi orijinal CUPRAC yöntemine karşı avantaj sağlamaktadır. Ayrıca geliştirilen sensörler, yakın gelecekte kit formatına dönüştürülerek daha yaygın kullanım potansiyeline de sahip olabileceklerdir.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF MOLECULAR SPECTROSCOPIC SENSORS FOR MEASUREMENT OF ANTIOXIDANT CAPACITY IN FOOD EXTRACTS AND SERUM

Reactive oxygen species (ROS) attack various biological macromolecules (proteins, enzymes, DNA etc.) under 'oxidative stress' conditions to give rise to a number of diseases and cancer. The best way to combat such health risks is to balance these ROS through diet by the consumption of foods rich in antioxidants. Antioxidants are substances that delay or prevent the oxidation of cellular oxidizable substrates. Recently the importance of removing excessive active oxygen species from living organisms is becoming increasingly recognized, together with a growing interest in finding antioxidants that can scavenge reactive oxygen species. The aim of the developed molecular spectroscopic sensors are to resolve shortcomings and limitations of the available methods in literature for the determination of total antioxidant capacity (TAC) of food extracts and biological samples. The widely used CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity) method was originally developed and introduced to world literature by our research group. In this context, a CUPRAC-based molecular spectroscopic sensor was developed for the determination of TAC of food extracts and biological samples so as to extend the range of application of the CUPRAC method.

In this thesis work, low-cost and widely applicable sensor-based spectrophotometric methods (optical sensor-based CUPRAC method and fiber-optic reflectometric CUPRAC sensor) were developed for the total assay of antioxidants in food extracts and biological samples. Nafion is a perfluorosulfonate polymer in which hydrophilic perfluorinated ether side chains terminate with sulfonate groups, which are periodically attached to the hydrophobic perfluoroethylene backbone. Absorbance or reflectance values of the final products formed from the testing reactions on the derivatized Nafion chemical sensor were measured, and correlated to antioxidant capacities of the analytes.

As the basis of the developed optical sensor-based CUPRAC method, the chromogenic oxidizing reagent of CUPRAC method, copper(II)-neocuproine (Cu(II)-Nc) complex, was immobilized onto a cation-exchanger film of Nafion, and the absorbance changes associated with the formation of the highly-coloured Cu(I)-Nc chelate as a result of reaction with antioxidants were measured at 450 nm. According to another developed sensor-based antioxidant capacity method, fiber-optic reflectometric CUPRAC sensor, the reflectance changes associated with the formation of the highly-coloured Cu(I)-Nc chelate on the Nafion as a result of reaction of Cu(II)-Nc reagent with antioxidants were measured at 530 nm using miniature reflectance spectrometer. Thus, absorbance and reflectance of the sensor membranes were measured at different wavelengths. As a distinct difference from absorptimetric sensor, the reflectometric sensor principle can be applied to non-transparent opaque media.

The trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of various antioxidants (vitamins C and E, polyphenolics, thiol type antioxidants) using the developed optical sensor-based CUPRAC assay and fiber-optic reflectometric CUPRAC sensor were compared to those of the original CUPRAC assay. The developed methods were validated through linearity, additivity, precision and recovery, demonstrating that the

assays are reliable and robust. The tests developed for single standard compounds were applied to their synthetic mixtures, and the found TAC values were compared to those theoretically expected by calculation through individual TEAC values of standard antioxidants. Finally, the developed methods were applied to complex matrices such as food extracts (fruit juices, fruit pomace and spices extracts) and biological samples (bovine serum, rat kidney and liver tissues) and obtained TAC values were validated against those found by original CUPRAC method.

As a result of this thesis work, the developed sensor based methods offer advantages over original CUPRAC method, including the potential of being used as a rapid, low-cost, and easily applicable screening tool for TAC of food extracts and biological samples, and prospects of future refinements of sensor-based methods to a kit format.

1. GİRİŞ

Biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve metabolitlerinin oluşumu insan vücudundaki savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte reaktif oksijen türlerinin sürekli ve aşırı üretimi veya antioksidan savunma sistemindeki azalma dokuları tahrip ederek hasara neden olmakta ve ateroskleroz, nörolojik dejenerasyon gibi çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır [1].

Çeşitli hastalıklara yol açabilen reaktif oksijen türlerinin dengelenmemesinden kaynaklanan “oksidatif gerilim” ile mücadele etmenin en önemli yollarından biri radikal süpürücü bileşiklerce zengin gıdaların mevcut olduğu bir beslenmedir. Birçok çalışma meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oluşumunu engellediğini belirtmiştir. Bu olumlu etkiler özellikle meyve ve sebzelerde bolca bulunan polifenoller, karotenoidler, C vitamini ve tokoferol gibi antioksidan aktivite gösteren çeşitli bileşikler varlığında oluşmaktadır. Bu nedenle bu tür gıdaları, antioksidan özelliklerine göre ayırt etmek ve sınıflandırmak için bilim dünyasında kabul gören basit, kullanışlı, hızlı, ucuz ve duyarlı antioksidan kapasite tayin yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda tez kapsamında besin özütlerinde, serumda ve doku homjenizatlarında bulunan bileşiklerin antioksidan etkilerinin incelenmesi amacıyla antioksidan kapasite tayini için moleküler spektroskopik sensörler geliştirilmiştir.

Önemli hastalıkların önlenmesinde besin antioksidanlarının büyük rolü olduğunun kanıtlanması birçok antioksidan kapasite tayin yönteminin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Literatürde mevcut olan antioksidan kapasite/aktivite tayin yöntemleri hidrojen atomu transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) esaslı olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. HAT esaslı tayinlerin büyük bölümü yarışmalı reaksiyon kinetiğine dayanmaktadır. Bu yöntemlerin başlıcaları ORAC [2] (Oksijen Radikal Absorbans Kapasite) ve TRAP [3] (Toplam Radikal Tutma Parametresi) yöntemleridir. Elektron transfer (ET) esasına dayanan antioksidan tayin yöntemleri ise,

indirgenmesinde renk değiştiren yükseltgenlerin indirgenmesi sonucu antioksidanların kapasitesini ölçerler. Renk değişiminin derecesi, numunedeki antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir (örneğin absorbans artışı ya da azalışı, toplam antioksidan derişimi ile orantılı olur). ET-esaslı başlıca yöntemler: ABTS/TEAC [4] (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat/Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite), DPPH [5] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), FRAP [6] (Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü), Folin-Ciocalteu [7] toplam fenol tayini yöntemleridir. Bu yöntemlere toplu bir bakış yaptığımızda genel olarak önemli bir dezavantaj olarak, kullanılan reaktiflerden ikisinin (ABTS ve DPPH) farklı bekletme ve reaksiyon koşullarında kararsızlık gösterebilen radikalik reaktifler olduğunu ve antioksidanlarla redoks tepkimesine girerek renk yoğunluklarının azaldığını söyleyebiliriz.

Anabilim dalımızca geliştirilen ve dünya literatüründe önemli bir yere sahip olan elektron transfer esaslı 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' CUPRAC [8] tayin yöntemi kromojenik bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlar tarafından indirgenmesi sonucu oluşan Cu(I)-Nc kelatının görünür bölgede maksimum absorpsiyon yaptığı dalgaboyu olan 450 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan bir spektrofotometrik antioksidan kapasite tayin yöntemidir. 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 ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. Cu(II)-Nc reaktifi, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Antioksidan bileşikler, Cu(II)-Nc reaktifi ile esas olarak tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı 450 nm'de maksimum absorbans verir.

CUPRAC yöntemi [8-10]; toplam antioksidan kapasitesi (TAC) bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden bitkisel çaylara [11], van otlı peynirine [12], ayvalık yöresi endemik bitkilerine [13], kayısı ekstraktlarına [14] uygulanmıştır. Ayrıca CUPRAC yönteminin esasına bağlı kalınarak birçok modifiye CUPRAC yöntemleri geliştirilmiştir. Bu modifiye yöntemler; insan serumunda toplam antioksidan kapasite

tayini [15], flavonoidler yanında askorbik asit tayini [16], hidrofilik-lipofilik antioksidanların aynı çözücü ortamında makrosiklik oligosakkarit metil- β -siklodekstrin varlığında toplam antioksidan kapasite tayini [17], bazı lipofilik antioksidanların EtOH-H₂O karışımındaki çözünürlüğünü arttırmak amacıyla metil- β -siklodekstrin kullanımı [18], zayıf asidik katyon değiştirici reçine ile önderiştirme işlemiyle toplam antioksidan kapasite tayini [19], hidrofilik antioksidanların hidroksil radikali süpürme antioksidan aktivite tayini [20], endüstriyel bitkilerden üretilen doğal boyaların fenolik içeriklerinin belirlenmesi [21], polifenolik bileşiklerin hidroksil radikali süpürme antioksidan aktivite tayini [22], polifenolik bileşiklerin ksantin oksidaz inhibisyon aktivitelerinin tayini [23], polifenolik bileşiklerin hidrojen peroksit süpürme aktivitelerinin tayini [24] şeklinde sıralanabilir. CUPRAC yöntemi, güncel çalışmalarla gerek antioksidan aktivite gerekse antioksidan kapasite ölçümlerinde kullanılan teknikleri bünyesinde toplayıp çoklu analizlerin gerçekleştirilebildiği bir paket yöntem olarak bilim dünyasına kazandırılmıştır.

Dünyada yaygın olarak kullanılan antioksidan kapasite tayin yöntemlerine göre CUPRAC yönteminin önemli üstünlüklerini özetlemek gerekirse;

- CUPRAC yöntemi tiyol grubu içeren antioksidanları yükseltgemedede yeteri kadar hızlı iken, FRAP yöntemi tiyol grubu taşıyan ve canlı bitki ve hayvan hücrelerinde bulunan glutatyon gibi önemli bir antioksidanı ölçememektedir.
- Reaktif seçicidir, çünkü fenantrolin veya tripiridiltriazin ligandları varlığında Fe(II)-Fe(III) çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyele sahiptir. Bu nedenle CUPRAC reaktifiyle (normalde antioksidan sınıfına girmeyen) indirgen şekerler ve sitrik asid yükseltgenemez.
- Reaktif, diğer kromojenik reaktiflere (ABTS, DPPH vb.) oranla daha kararlı ve kolay ulaşılabiliridir.
- Bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 515 nm'de DPPH ile çakışan spektrumlar vermesi analizin yorumunu güçleştirir ve doğruluğunu etkiler. Ayrıca çoğu antioksidan sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş reaksiyona girer. Bundan dolayı yöntem; DPPH radikali ile farklı hızlarda reaksiyona giren antioksidanların tümünün antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez.

- CUPRAC yönteminin standart kolorimetreler kullanan ticari laboratuarlarda uygulanması son derece kolaydır. Karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır.
- Renkli Cu(I)-Nc kelatı hava, güneş ışığı, pH ve nem gibi çeşitli parametrelere göreceli olarak duyarsızdır. Cu(I)-Nc kelatının aksine DPPH'nin rengi, ışık, hava oksijeni, nem ve pH gibi parametrelere fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek güçtür.
- Absorbans-konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrileri CUPRAC yönteminde yüksek lineerlik (doğrusallık) verirken diğer yöntemlerde polinomial eğriler oluşmaktadır.
- CUPRAC yöntemi fizyolojik pH'a yakın ortamlarda çalışabilirken, FRAP yöntemi asidik (pH 3.6), Folin yöntemi ise bazik (pH 10) ortamlarda işlemektedir. Sonuçta antioksidanların protonlanmış veya protonlarını vermiş olmasına bağlı olarak oksidasyon gerçekte olduğundan daha güç veya daha kolay olmakta ve bunun uzantısı olarak toplam antioksidan kapasite olduğundan daha eksik ya da fazla bulunabilmektedir.
- CUPRAC yöntemi kolay, hızlı, etkili ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, hem lipofilik hem hidrofilik antioksidan bileşikler (vitaminler, polifenoller, karotenoidler, flavonoidler vb.) analiz edilebilmektedir.

Birçok avantajı nedeniyle CUPRAC yöntemi diğer spektrofotometrik antioksidan tayin yöntemlerine üstünlük sağlamaktadır. Bu bağlamda, tez çalışmada CUPRAC yöntemi esas alınarak antioksidan tayini için optik sensörler geliştirilmiştir. 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. Tez çalışmasında uygun membran olarak katyonik iyon değiştirici kopolimer Nafyon kullanılmıştır. Nafyon ($C_7HF_{13}O_5S.C_2F_4$) tetrafloroetilenin sülfolanmasıyla oluşturulmuş bir kopolimerdir. Nafyon, iyonomer olarak da adlandırılan iyonik özelliğe sahip ilk sentetik polimerdir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc kompleksi kation değiştirici Nafyon membran üzerinde elektrostatik olarak tutturularak antioksidan tayini için optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin optimum deney koşulları belirlenmiştir. Yöntemin esası, Nafyon kopolimeri üzerine tutturulan Cu(II)-Nc reaktifi, antioksidan varlığında Cu(I)-Nc kelatına dönüşmekte ve sensör üzerinde oluşan sarı-turuncu rengin 450 nm dalga boyunda Cu(II)-Nc tutturulmuş referans sensöre karşı spektrofotometre ile absorbansının ölçümüne dayalıdır.

Çalışmanın ikinci aşamasında geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi kullanılarak standart antioksidan bileşiklerin kalibrasyon doğruları oluşturulup sentetik bir antioksidan olan troluks (TR) eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) belirlenmiştir. Kullanılan bileşiklerden üçlü sentetik karışım çözeltileri hazırlanarak bu sentetik karışımların beklenen ve bulunan antioksidan kapasiteleri mM TR ekivalenti cinsinden hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında hazırlanan çay ekstratlarına standart antioksidan bileşiklerin katkısı yapılarak optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi kullanılarak yüzde geri kazanımları hesaplanmıştır. Besin özütlerinin (meyve suları, meyve posası ve baharat özütlerinin) ve biyolojik örneklerin (serum ve doku örnekleri) toplam antioksidan kapasiteleri optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi kullanılarak belirlendikten sonra sonuçlar orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak valide edilmiştir.

Çalışmanın dördüncü aşamasında Cu(II)-Nc kompleksi tutturulmuş kation değiştirici Nafyon membran kullanılarak fiber-optik reflektometrik sensör geliştirilmiştir. Antioksidan varlığında Nafyon üzerinde meydana gelen Cu(I)-Nc'in sarı-turuncu renginin 530 nm dalga boyundaki % reflektansının ölçülmesi fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörünün temelini oluşturmaktadır. Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak standart antioksidan bileşiklerin kalibrasyon doğruları oluşturulup TEAC değerleri belirlenmiştir. Standart antioksidan bileşiklerden oluşturulan üçlü sentetik karışım çözeltilerinin geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak elde edilen antioksidan kapasiteleri mM TR ekivalenti cinsinden

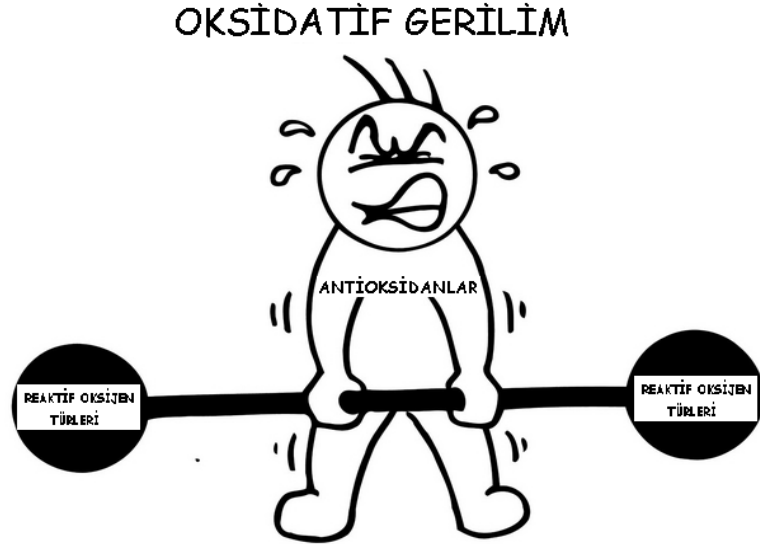
belirlenmiştir ve hesap yolu ile elde edilen beklenen kapasite değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmanın son aşamasında hazırlanan çay ekstraktlarına antioksidan katkısı yapılarak fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak yüzde geri kazanımları hesaplanmıştır. Besin özütlerinin (meyve suları, meyve posası ve baharat özütleri) ve biyolojik örneklerin (serum ve doku örnekleri) toplam antioksidan kapasiteleri fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlendikten sonra sonuçlar orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak valide edilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. OKSİDATİF GERİLİM VE ANTIOKSİDANLAR

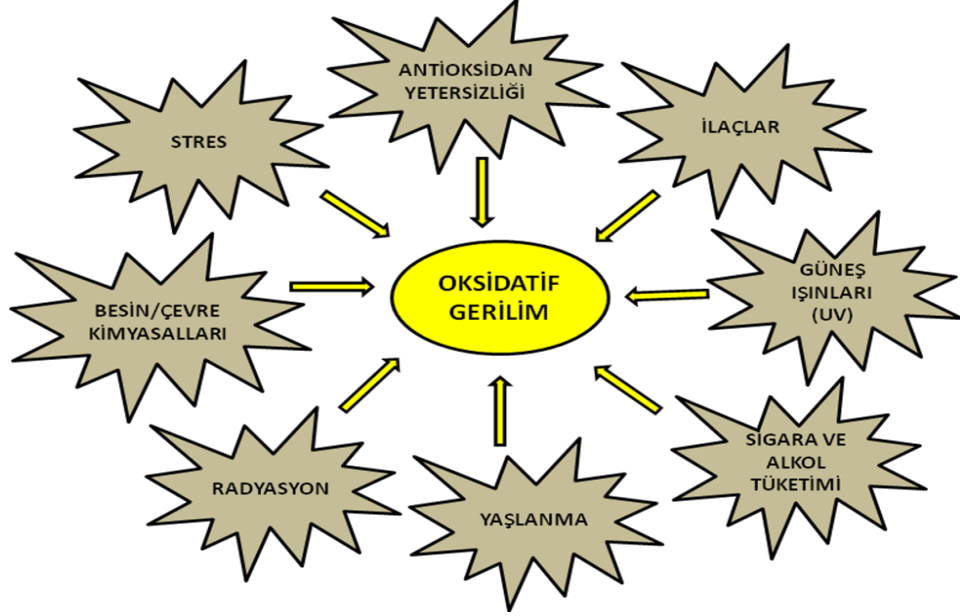
Oksijen yaşam için gereklidir ancak vücut üzerinde zararlı etkileri de vardır. Oksijen, insan vücudunda solunum zinciri içinde süperoksit anyon radikali, singlet oksijen, hidroksil radikali vb. reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaktadır. Reaktif oksijen birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan “oksidatif gerilim” koşulları altında kanser, koroner kalp rahatsızlığı, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikal zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Oksidatif gerilim, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur (Şekil 2.1) [25].



Şekil 2.1: Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin reaktif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim).

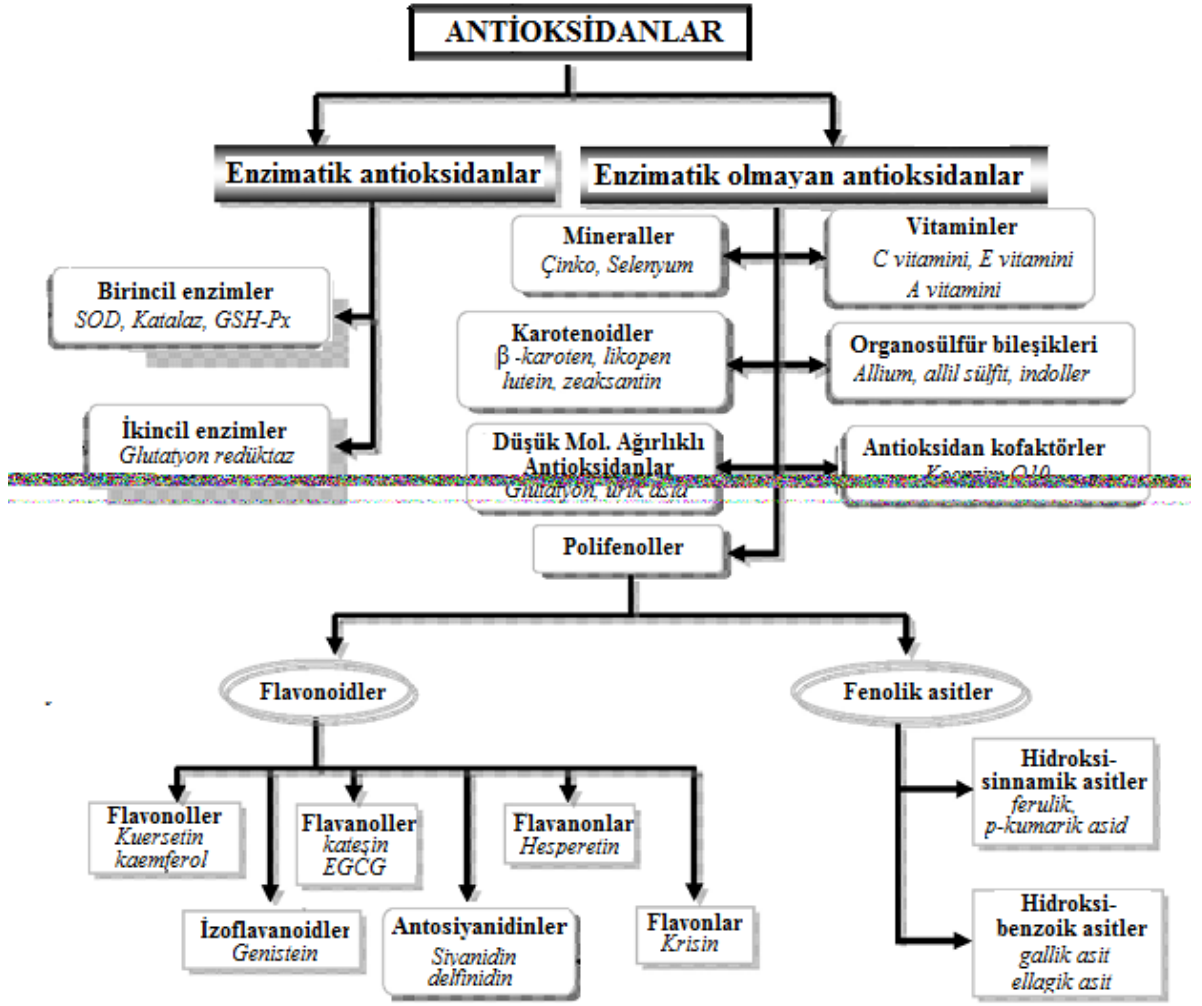
Vücudumuzda metabolik yolla oluşabileceği gibi çevresel faktörlere (eksojen) örneğin ultraviyole ışınlar, hava kirliliği, sigara dumanına maruz kalma, alkol ve bazı ilaçların alınmasıyla da serbest radikal (ROS) oluşumu gerçekleşebilir (Şekil 2.2). Bu süreçlerde

oluşan başlıca serbest radikaller; süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\bullet}), peroksil radikali (ROO^{\bullet}), alkoksil radikal (RO^{\bullet}), hipoklorik asit ($OHCl$) ve peroksinitrit ($ONOO^-$)'tir.



Şekil 2.2: Oksidatif gerilime sebep olan serbest radikal kaynakları.

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 [26]. 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 (Şekil 2.3) [27]. 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 [28,29]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin (HO^{\bullet} , $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2) süpürücüleri olarak bilinirler [27].



Şekil 2.3: Antioksidanların sınıflandırılması [27].

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 olan 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 [30]. 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 uğrattırır (süpürürler). Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler, metal iyonu katalizörlerini bağlarlar [31].

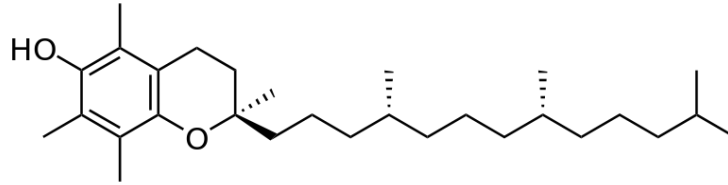
Antioksidanlar yükseltgenen maddeler olduğundan zincir reaksiyonlarını (örneğin lipidlerin oksidatif parçalanmasına yol açan radikal zincir reaksiyonunu) kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenen maddeyi (örneğin biyolojik makromolekülleri) koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder. Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri genellikle onların serbest radikal yutucu (süpürme) olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Zincir kırıcı antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesinde hem antioksidanın molekül başına verebildiği elektron veya giderebildiği serbest radikal sayısı (yani reaksiyon stökiyometrisi), hem de reaksiyon hızı (kinetik) önemlidir. Antioksidan aktivite, spesifik bir antioksidan ile spesifik bir oksidan arasındaki reaksiyona ait hız sabitini işaret eder ve bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (genelde redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [30].

2.2. DOĞAL ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLER

2.2.1. E vitamini

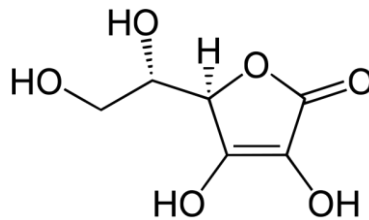
E vitamini; hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan koruyan yağda çözünen bir antioksidandır (Şekil 2.4). Dört tokoferol ve dört tokotrienol olmak üzere 8 moleküler formu vardır. Bunlardan α -, β -, γ - ve δ -tokoferoller antioksidan aktivite için gerekli olan hidroksil grupları içerirler. Antioksidan özellik α -tokoferolde en fazladır. Tokoferollerin gösterdiği antioksidatif aktivitenin esası, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline aktarma yolu ile serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek onların vücutta yaptıkları hasarı onarmaktır [32].



Şekil 2.4: 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 ajanlardandır (Şekil 2.5). Askorbik asit, lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu elektron vererek durdurur. Askorbik asit serbest radikalleri hücre membranına varmadan etkisiz hale getirir. 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 vücudu, glukozu C vitaminine dönüştüren enzimden yoksundur [33]. 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 [34].



Şekil 2.5: 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 anyon 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 [35].

2.2.3.1. Süperoksit Dismutaz

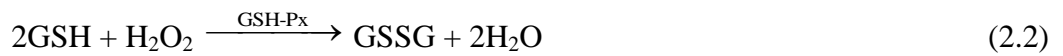
Süperoksit dismutaz enziminin başlıca görevi, dokularda ve hücrelerde oluşan reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktır. Süperoksit dismutaz enzimi, çok önemli bir süperoksit süpürücüsüdür. Daha çok ekstrasellüler matrikste olmak üzere hücre yüzeylerinde bulunur. Süperoksit dismutaz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

Süperoksit dismutaz, süperoksit anyon radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksit dismutaz, katalitik aktivitesi çok yüksek olan bir enzimdir [36].



2.2.3.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hücredeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu anahtar rolü oynayan bir enzimdir. Glutatyon peroksidaz enzimi, sitozol ve mitokondride bulunur. Peroksitlerin indirgenmesini katalizleyen glutatyon peroksidaz enzimi hücredeki indirgenmiş glutatyonu (GSH) yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüştürmektedir. Glutatyon peroksidaz glutatyonu hidrojen donör olarak kullanarak hidrojen peroksiti elimine etmektedir. Bu reaksiyonlar, canlı organizmada oksidatif stresin zararlı etkilerinden hücrel membranları korumaya yarar [37].



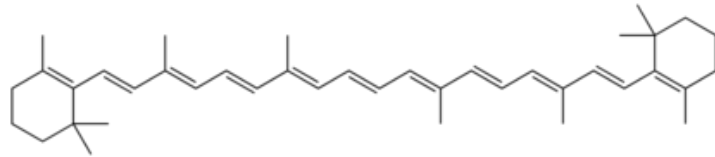
2.2.3.3. Katalaz

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 [31].



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 2.6). A-veitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β -karoten antioksidan aktiviteye sahiptir [38].



Şekil 2.6: β -karotenin kimyasal yapısı.

2.2.5. Polifenoller

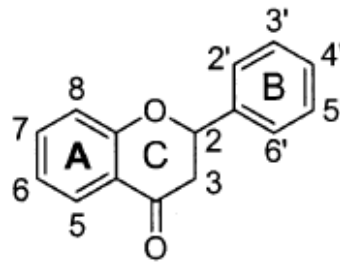
Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler olarak üç sınıfa ayrılır. Polifenoller güçlü antioksidanlardır 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 [39]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük derşimlerde bulduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [40].
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [41].

2.2.5.1. Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük moleköl 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 2.7). 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 yutma ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [42].



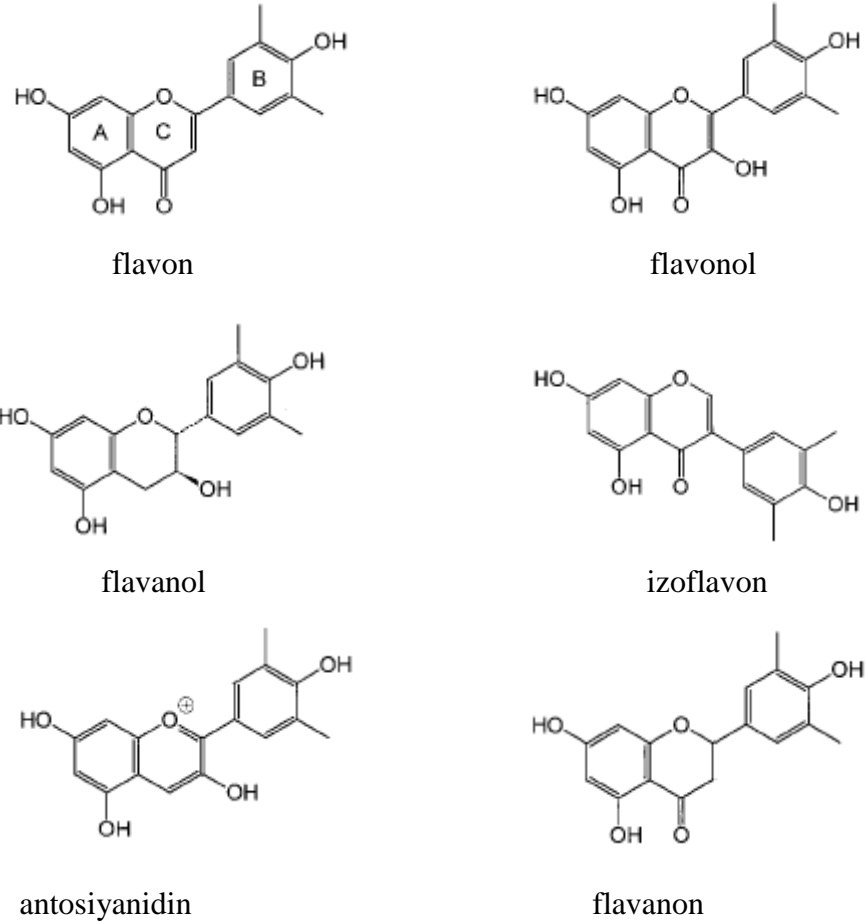
Şekil 2.7: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo- γ -furan türevleridir [42]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (Şekil 2.7) [38]:

1. Antoksaninler

- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

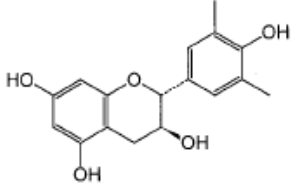
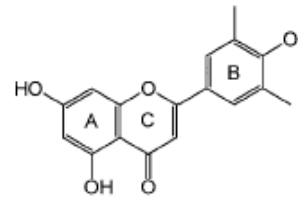
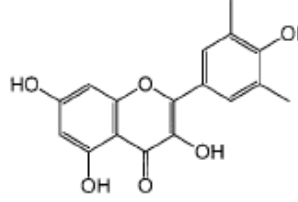
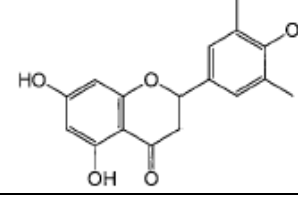
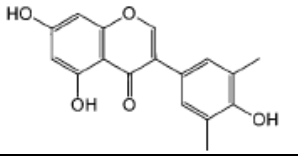
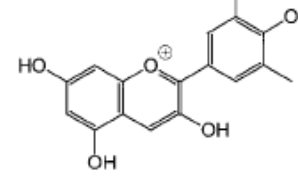
2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



Şekil 2.8: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları.

Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitüsyon modelleri ve bazı besin kaynakları Tablo 2.1’de verilmiştir [42].

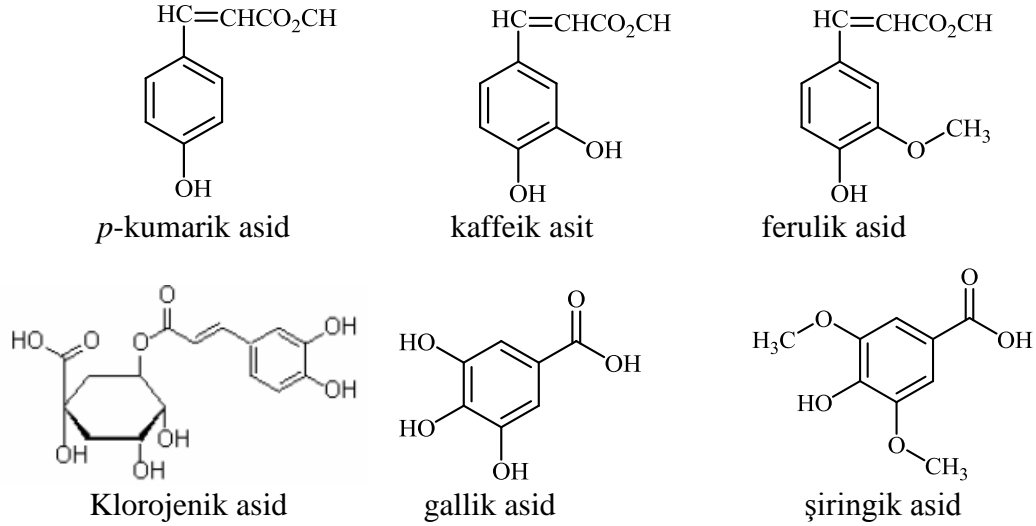
Tablo 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, süstitüsyon modelleri ve besin kaynakları [42].

Sınıfı	Adları	Genel Yapıları	Süstitüsyon Modelleri	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 [43]. L-fenil alanin veya L-tirosinden

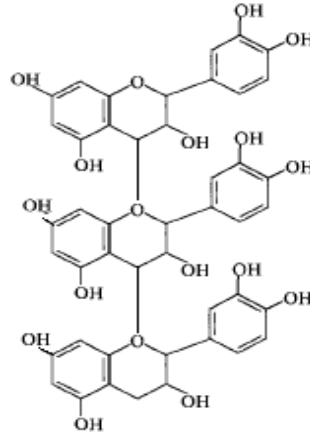
p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir (Şekil 2.9). Yapılarındaki $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ gruplarının varlığı, hidrojen atomu verebilme yeteneklerini arttırmanın yanısıra benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilir. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik asit, protokateşuik asit'dir.



Şekil 2.9: Fenolik asitlerin (bazı hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik 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 [43].

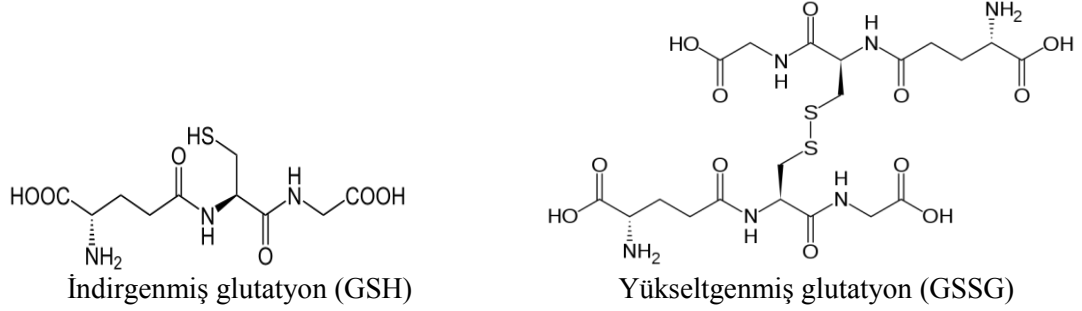


Şekil 2.10: Fenolik polimerlerin yapısı.

2.2.6. Tiyol Tipi Antioksidanlar

2.2.6.1. Glutasyon

Glutasyon; hücrelerde suda çözünebilir formlarda bulunan düşük molekül ağırlıklı antioksidan bir moleküldür [44]. L-sistein, L-glutamat ve L-glisin amino asitlerinden oluşan ve glutamat ile sistein amino asitleri arasında γ -peptid bağı içeren bir tripeptiddir. Bu molekül karaciğerde sentezlenebilmektedir.

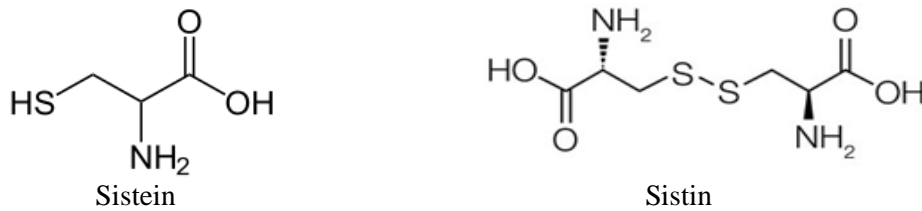


Şekil 2.11: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutasyonun kimyasal yapısı.

İndirgenmiş glutasyon (GSH) içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder [45]. Oksidatif stres sonucunda artan ROS oluşumunun hücre hasarlarındaki etkileri bilinmektedir. Bu ürünlerin detoksifikasyonu, glutasyonun indirgenmiş formunun (GSH) yükseltgenmiş formuna (GSSG) dönüşümü ile sağlanmaktadır.

2.2.6.2. Sistein

Glutasyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar açısından önemlidir [46]. Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında önemli rolü olan GSH'ın sentetik bir ön maddesidir [47].

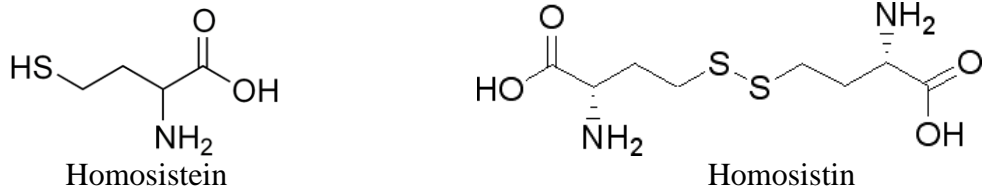


Şekil 2.12: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı.

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 [48].

2.2.6.3. Homosistein

Tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden bir diğeri olan homosistein, temel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasında oluşan bir ara üründür. Homosisteinin yükseltgenmiş hali homosistindir [49].

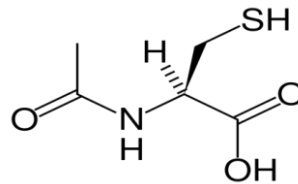


Şekil 2.13: Homosistein ve homosistin kimyasal yapısı.

2.2.6.4. 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 [50,51]. NAC tiyolünün ROS'la olan bu etkileşimi, son ürün olan NAC disülfürle beraber bir ara ürünün oluşumuna yol açar [52]. Ayrıca NAC, bir GSH ön maddesi olarak dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir [50].

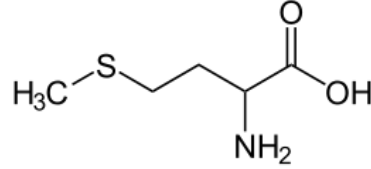
N-asetil sistein, 'in vivo' ve 'in vitro' koşullarda bir antioksidan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. N-asetil sistein, kuvvetli bir hipokloroz asit süpürücüdür. Aynı zamanda iyi bir hidroksil radikali süpürücüdür. NAC, hidrojen peroksitle ise yavaş bir şekilde reaksiyona girmektedir [51].



Şekil 2.14: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.

2.2.6.5. Metiyonin

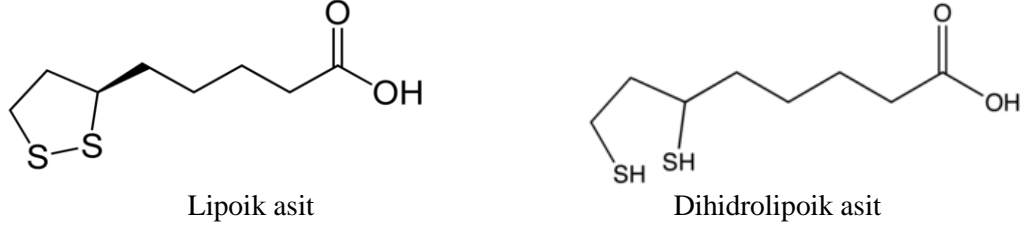
Serbest tiyol grubu değil, fakat Me-S- grubu içeren antioksidan bileşiklerden bir diğeri de metiyonindir [53]. Kükürt içeren bir amino asit olan metiyonin vücudumuzda sentezlenemez. Bu nedenle besin yoluyla vücuda alınmak zorundadır [54].



Şekil 2.15: Metiyoninin kimyasal yapısı.

2.2.6.6. Lipoik 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 [55]. Birçok hayvan ve bitki dokusunda olduğu kadar çoğu prokaryot ve ökaryot mikroorganizmalarda da bulunur [56].



Şekil 2.16: Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

Yükseltgenmiş hal olan lipoik asit, hidroksil radikali, hipokloroz asit ve singlet oksijen süpürücü olarak rol oynamaktadır. Aynı zamanda geçiş metallerini kelatlayıcı olarak da rol oynamaktadır.

2.3. ANTIOKSİDAN KAPASİTEYE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki sübstituentlerin 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 [57,58].

Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil sübstitüentlerinin 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. pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan)

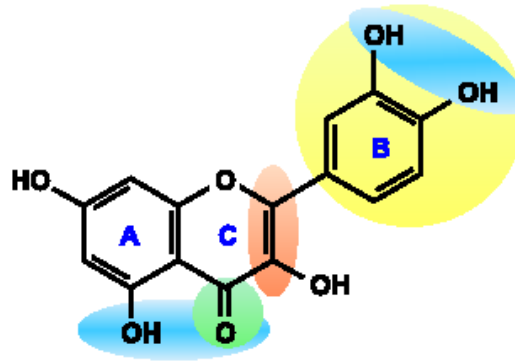
Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan şekere ve cinsine göre de azalır [41].

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 [57].

B halkasındaki 3',4'-kateşol yapısı lipid peroksidasyonunu çok kuvvetli şekilde azaltır [59]. 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 [58,60].

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 [42]. Şekil 2.17’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 *ortho*-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 [61].



Şekil 2.17: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı.

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 [62].

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 [63].

Kimyasal sensörler iki basit fonksiyonel birimden meydana gelmektedir. Bunlar alıcı ve dönüştürücü kısımlarıdır. Bazı sensörler, membran (zar) gibi ayırıcı içerirler [64]. Kullanılan kimyasal seçici membran, film veya tabakanın formu veya bileşimi sensörün seçiciliği, duyarlılığı, ömrü ve cevap süresi açısından etkili bir tayin için hayati önem taşımaktadır. Analitin bu film tarafından kimyasal olarak tanımlanması film üzerinde bulunan ligand veya fonksiyonel gruplar gibi komponentlerin oluşturduğu sinyaller aracılığıyla olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı sensörün yapısının tayin için büyük önemi vardır [62]. Dönüştürücü kısımları ise oluşturulan bu sinyallere cevap verir ve elde edilen analit miktarını sinyal büyüklüğüne çevirir [63].

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 [65].

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 [65].

Dönüştürücü tiplerine bağlı olarak kimyasal sensörler 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 [63].

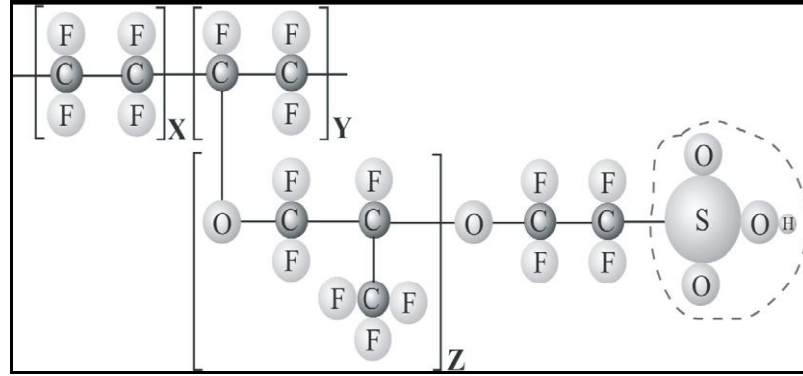
- **Optik Sensörler;** optik sensörler kimyasal reaksiyonlara ilişkin spektroskopik ölçümlerden yararlanır. Fiber optikler kliniksel analizler için uygun olduğundan 1997'den beri bu alanda yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır. Bazı biosensörlerde optiksel ölçümlerden yararlanılır. Absorbans, yansıma ve lüminesans ölçümleri farklı tip optik sensörlerde kullanılır [63].
- **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 [63].
- **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 [66].

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 [67].

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 [68].

Nafyon ($C_7HF_{13}O_5S.C_2F_4$), tetrafloroetilenin sülfolanmasıyla oluşturulmuş bir kopolimerdir (Şekil 2.18). İyonomer olarak adlandırılan iyonik özelliğe sahip ilk sentetik polimerdir. Nafyonun benzersiz iyonik özellikleri sülfonat grubuyla sona eren perflorovinil eter gruplarının tetrafloroetilen (Teflon) iskeletine birleştirilmesinin sonucudur. Nafyon sensör üretiminde destek maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır [68].



Şekil 2.18: Nafyonun ($C_7HF_{13}O_5S.C_2F_4$) yapısı.

Nafyon, hem lipofilik ligandların tutturulmasında hem de iyonik türlerin değiştirilmesinde hidrofobik ve hidrofilik yapısından dolayı uygun şartları sağlamaktadır. Nafyon membranlar UV-Vis-NR bölgesinde oldukça saydamdır ve florokarbon zincir iskeletinden dolayı kimyasal, termal ve mekanik kararlılığa sahiptir. Nafyonun yapısında bulunan sülfonat grupları ise iyon değişimini ve şişme yeteneğini sağlamaktadır [64].

➤ *Fiber-Optik Kimyasal Sensörler*

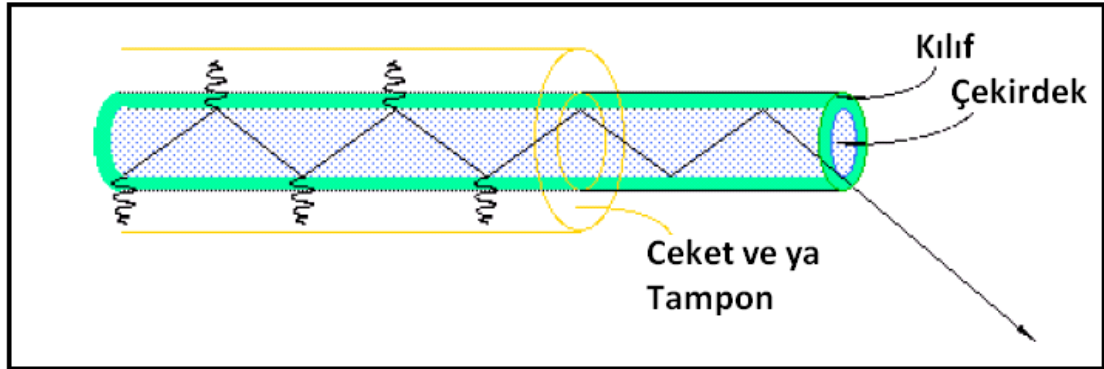
Birçok durumda optik kimyasal sensörler fiber optik teknolojisinin büyük avantajlarından yararlanabilmektedirler. Fiber optik kimyasal sensörler (FOCS), optik fiberlerin geometrik olarak çok yönlülüğü, düşük sönümlenme ve elektriksel gürültülerden etkilenmeme gibi özelliklerinden yararlanırlar [69].

Işık, ışık kaynağından meydana gelir ve optik fiberler boyunca iletilir. Daha sonra ışık tekrar optik fiberler vasıtasıyla geri döner ve bir ışık dedektörü vasıtasıyla yakalanır. Bazı fiber optik sensörler, tek optik fiber kullanmasına rağmen diğerleri ışık kaynağı ve dedektör için fiber optik sensörleri ayırır.

Ölçümlerin belirli özelliklerinden biri monitörün devamlı ve hızlı olarak sistemdeki değişiklikleri yansıtmasıdır. Optik fiberlerin ışığı iletme özellikleri ile optik spektroskopik yöntemlerin birleşmesi fiber optik kimyasal sensörlerin (FOCSs) meydana gelmesi ile sonuçlanır. Bu yöntem giderek kimyasal analizde yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmiştir.

➤ Fiber Optikler ve Çalışma Prensipleri

Optik fiberler bir mikrometreden yüzlerce mikrometreye kadar ölçüm aralığı olan bir diyaetre (çap) içeren silindirik kablolardır. Fabrikasyonla üretilen fiber optiklerde genellikle plastik, cam ve kuartz kullanılır. Materyallerin seçimi fiber boyunca iletilecek radyasyonun (ışımının) spektral aralığına göre belirlenir. Örnek olarak, eğer görünür alandaki bir radyasyon iletilecekse cam ve plastik fiberler uygun iken UV radyasyonu için daha pahalı olan kuartz veya kaynaklanmış silika fiberler kullanılabilir. Şekil 2.19'da gösterildiği gibi, iç gövdeye çekirdek denir ve refraktif indeksi verir, ikinci bir materyalle sarılan ve daha düşük bir refraktif indeks veren kısma ise kılıf adı verilir. Fibere mekanik dayanıklılık ve esneklik veren kısma ise ceket veya tampon denir ve genellikle polimerik ve esnek materyallerden yapılır. Fiber optik içindeki ışığın iletimi tamamen tam yansıma prensibine dayanır. Bu nedenle ışık enerjisi hiçbir kayba uğramaz [70].



Şekil 2.19: Optik fiber bileşenleri ve ışık iletiminin şematik gösterimi.

➤ Fiber Optik Kimyasal Sensörlerin Sınıflandırılması

Fiber-optik sensörler iki kategori altında incelenebilir. Bunlar sırasıyla doğrudan spektroskopik sensörler ve reaktif aracılıklı sensörlerdir. Doğrudan spektroskopik sensörde fiber fonksiyonlar yalnızca basit bir optik kablo ile algılama bölgesini görüntüleyici enstrumandan ayırır. Fiber uzaktaki bir örneğin doğrudan spektral

analizine (floresans, absorpsiyon, Raman saçılması, reflektans, vb.) olarak sağlar. Reaktif aracılıklı sensörlerde ise optik fiber kimyasal reaktif ile birleştirilmiştir. Seçilen reaktifin analitle duyarlı ve seçici reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ürünün optik özelliğinde (floresans, absorpsiyon, reflektans) meydana gelen değişimin doğrudan ölçülmesi analit konsantrasyonunu tayin etmemizi sağlar. Genellikle uygun reaktifin destek matrisine tutturulmasıyla oluşturulan fiber sensörler bu alanda kullanılmaktadır [69].

Optik fiber sensörler bir şekilde daha sınıflandırılabilirler;

- içte etkileşimli (intrinsic) veya aktif
- dışta etkileşimli (extrinsic) veya pasif

Aktif sensörlerin çalışma biçimi fiberlerin ışığı iletme özelliklerindeki meydana gelen değişikliklerin ölçülmesini temel alır. Sonuç olarak sistemin bunu algılaması ile birlikte fiber özelliklerinde bazı değişimler meydana gelir (örn; reflektif indeks). Bu tip sensörler genel olarak fiziksel ve fizikokimyasal çalışmalarda kullanılır. Örnek olarak basıncın, sıcaklığın ve reaksiyon entalpilerinin ölçülmesi verilebilir [70].

Pasif sensörler ise radyasyonun kaynaktan örneğe veya örnekten ölçüm sistemine iletilmesi esasına dayanır ve bu yöntem en çok tercih edilen fiber optik kimyasal yöntemdir.

➤ **Fiber Optik Kimyasal Sensörlerin Kullanım Alanları**

Spektral ışınım alanının optik fiberler boyunca kayıplara uğramadan iletilebildiği spektroskopik yöntemler elverişli yöntemlerdir. Fiber optik kimyasal sensörlerin kullanıldığı spektral yöntemler; UV-vis, orta ve yakın infrared spektrometri, spektrofluorometri, spektrofotometri, geleneksel ve rezonans Raman saçılması ve kemilüminesans'tır. Bununla birlikte FOCS uygulamalarının büyük çoğunluğu moleküler floresans analizini içermektedir. Buna ek olarak bu teknikte muhteşem duyarlılık başarılmıştır. Küçük boyutlardaki lazer ışınları yüksek verim ile optik fiberler ve ışınımın birleşmesini kolay kılarlar. Bunun sonucu olarak analit oldukça düşük konsantrasyonlarda olduğunda bile (nM - μ M) kimyasal bilgi çok kısa zamanda örneklerden elde edilebilir [70].

Fiber optik kimyasal sensörler ile en kolay olarak birleştirilen yöntem kemilüminesanstır. Bu teknikte radyasyon yaratmak için dışardan bir kaynağa ihtiyaç yoktur. Optik fiberler sadece kimyasal reaksiyon ile meydana gelen radyasyonu ölçme cihazına yollamak için kullanılır. Fiber optik kimyasal sensörlere dayanan (temel alan) kemilüminesans yöntemi, arka plan girişimlerinin olmadığı, seçiciliğin ve ölçümleme özelliklerinin çok iyi olduğu bir teknik olmuştur.

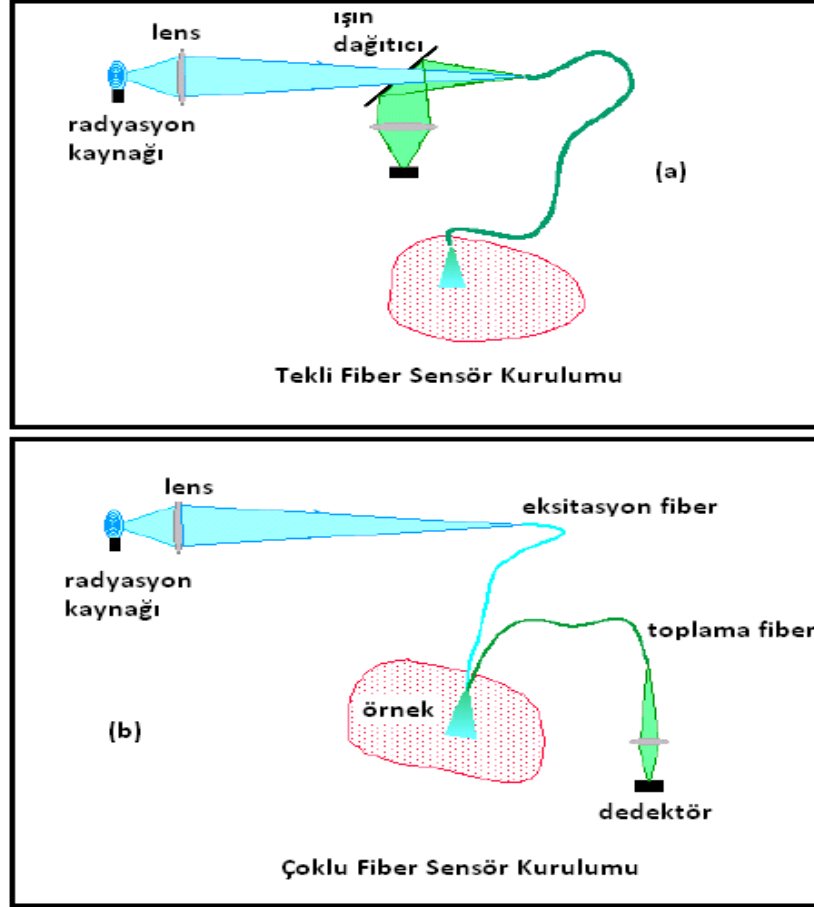
➤ **Fiber Optik Kimyasal Sensörlerin Enstrümantasyonunun Temel Özellikleri**

Şekil 2.20’de fiber optik kimyasal sensörlerin kullanıldığı bir cihazda spektrokimyasal sinyallerin alınabilmesi için gerekli olan temel enstrümantasyon örneği gösterilmektedir. Kaynaktan gelen radyasyon sensörün sonundaki proksimal üzerine odaklanmıştır. Yüksek hassasiyet gerektiğinde (örneğin; floresans, fosforesans ve Raman saçılması), az miktarda ışının kaynaktan fiberlere girmesine rağmen lazer kullanılması gerekmektedir. Spektrofotometrik analizler için, kaynağın ışın yoğunluğu önemli değildir. Bu durumda, tungsten veya yüksek basınçlı ksenon ark lambaları gibi polikromatik kaynaklar kullanılır. Çünkü bunlardan kolaylıkla absorban spektrumu elde edilebilir [70].

Kemilüminesans uygulamaları haricinde sadece yayılan radyasyon fiber boyunca yönetilir. Diğer spektrokimyasal teknik Şekil 2.20 (a)’da gösterilmiştir. Bu tip sensörler çok iyi bir verimliliğe sahiptirler çünkü uyarılma ve verimlilik örtüşür. Bununla birlikte yayılan enerjinin algılanması, uyarılma enerjisinden spektral bir ayırım gerektirir. Eğer uyarılma ve emisyonun dalga boyları yeteri kadar farklıysa dikroik filtreler kullanılabilir. Uyarılma ve emisyon dalga boylarını ayırmak için yüksek çözünürlük gerektiğinde, delikli aynalar kullanılabilir. Dual ya da çoklu fiber sensörlerde (Şekil 2.20 (b)), bir fiber uyarılma enerjisini örneğe taşıırken, diğer fiber yayılma veya saçılma enerjisini toplar ayrıca bu ikinci fiber radyasyonu dedektöre taşır. Birçok tasarımda fiberler birbirlerine paralel olarak yerleştirilirler. Bununla birlikte çoklu fiber sensörlerin fabrikalarda yapımı tek fiberli sensörlerin yapımından daha zordur.

Toplanan radyasyon monokromatör veya polikromatör kullanılarak spektral olarak analiz edilir. Dedektör olarak genellikle fotoçoğaltıcı tüp seçilir. CCD(charge-coupled

device) kameralar zayıf sinyallerin belirlenmesinde yararlanılan en iyi cihazlardır. Bu cihazların bu kadar iyi olmasının sebebi çok küçük bir karanlık sinyallerinin olmasıdır.



Şekil 2.20: Lüminesans sinyallerinin elde edilmesi için kullanılan a) Tek fiberli sensör ve b) Çoklu fiber sensör için tipik enstrümental kurulum.

➤ **Fiber Optik Kimyasal Sensörlerin Avantajları ve Kullanım Sınırları**

Bu sensörlerin küçük boyutları ve esneklikleri doğal ve canlı dokulara yapılan analizler için fiber optik kimyasal sensörleri en ideal araç haline getirmektedir. Radyasyonun uzak mesafelere önemli bir kayıp yaşanmadan taşınması uzaktan ölçüme olanak sağlamaktadır. Ayrıca fiber optik sensörler radyoaktivite ve elektrik alanları gibi gürültü kaynaklarından diğerlerine nispeten daha az etkilenirler. Fiber optiklerle elde edilen sinyaller çevresel interferanslara karşı çok daha az eğilim gösterirler ve sonrasında bu sinyaller elektrik kabloları boyunca iletilir ve tasarımı sayesinde analiz için yüksek hassaslık ve seçicilik sağlarlar.

En büyük zorluk fiber optik kimyasal sensörlerin hızlı cevap süresi ve uzun süre stabil kalması ile kimyasal ayırım fazlarının geliştirilmesidir. Daha önce de bahsedildiği gibi doğru sensörde çıkış, girişteki değişime anında yanıt vermelidir. Eğer algılama işlemlerindeki kimyasal reaksiyonlar yavaş veya tersinir değil ise sensör devamlı ve doğru sonucu sağlayamaz [70].

2.5. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

Antioksidanların öneminin anlaşılması ile bu konuda yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artış göstermiştir. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri iki temel prensibe dayanır. Bunlardan birincisi ‘Hidrojen Atom Transferi’ni (HAT) temel alan analizler, ikincisi ise ‘Elektron Transferi’ni (ET) temel alan analizlerdir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azo-bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmalı kinetik reaksiyonları kullanmaktadır. ET temelli yöntemler ise antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir [57].

2.5.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.5.1.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [2,71,72]; büyük oranda Glazer [73] tarafından yayınlanan çalışmayı esas alır. Peroksil radikalini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikalini oluşturmak için $\text{Cu(II)-H}_2\text{O}_2$ 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) tekniğini kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [26]. Net AUC, antioksidan miktarıyla orantılıdır.

2.5.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve arkadaşları [74] tarafından geliştirilen bu yöntemde; plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitelebilen maddelerden ve AAPH'dan meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH'ın 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 [75] 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 [76].

2.5.1.3. 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 [77]. 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 ışımalarının 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 [78]. Luminol maddesinin hidrojen peroksit veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanır. 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 [78].

2.5.1.4. Krosin Beyazlatma Yöntemi (*Crocine Bleaching Assay*)

Tubaro ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde kinetik parametreler karşılaştırılarak plazma içindeki antioksidan kapasitesi ölçülmektedir [79]. Bu yöntem; AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltmesi (rengini gidermesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri ile yükseltgenme reaksiyonunda antioksidanların olmadığı durumdaki hızı (V_0) ve antioksidanların olduğu durumdaki hızı (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 bileşiğin 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.

2.5.1.5. 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 [80]. Kısmen antioksidanlar tarafından engellenen etilen oksidasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmektedir. Toplam kapasiteyi elde etmek için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{TOSC} = 100 - \left(\frac{I_{SA}}{I_{CA}} \times 100 \right) \quad (2.5)$$

SA: örnek reaksiyon eğrisi, CA: kontrol reaksiyon eğrisi

Antioksidan veya TOSC değerleri 0-100 arasında verilmiştir. Bu yöntemde kullanılan alan integralleri açık bir sistemdir, unk 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 [26].

2.5.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

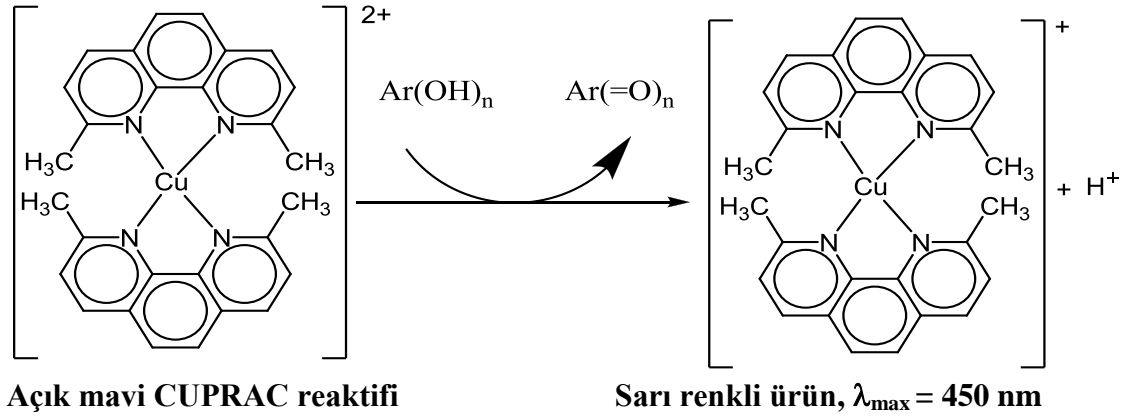
2.5.2.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Çalışma grubumuz tarafından kromojenik oksidan olan Cu(II)-neokuproin reaktifi kullanarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenolleri, 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 [8]. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) kompleksinin antioksidan bileşikler varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına (şekil 2.21) indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidanların antioksidan kapasiteleri ölçülebilmektedir. Bu özellikten yola çıkararak geliştirilen antioksidan kapasite tayin yöntemi 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' kısaca CUPRAC yöntemi olarak adlandırılmıştır.

CUPRAC yöntemi; toplam antioksidan kapasitesi (TAC) bakır(II) iyonu indirgeme kapasitesi cinsinden bitkisel aylara [11], Van otlu peynirine [12], Ayvalık yöresi endemik bitkilerine [13], kayısı ekstraktlarına [14] uygulamalar şeklinde ve insan serumuna [15], flavonoidler yanında tek başına askorbik asidin tayinine [16], bazı polifenolik bileşiklere [9], zayıf asidik katyon değiştirici reçine kullanılarak askorbik asitin nderiştirilmesine [19], hidrofilik ve lipofilik antioksidanların metil-β-siklodekstrin kullanılarak birlikte tayinine [18], lipofilik ve hidrofilik antioksidanların, %2'lik metil-β-siklodekstrin ile inklüzyon kompleksleri oluşturularak tek bir çözücü içinde yanyana tayinine [17], hidroksil radikal süpürücü maddelere [20], katalaz enzimi yardımıyla fenoliklerin ve flavonoidlerin hidroksil radikali süpürme aktivitelerinin ve ksantin oksidaz inhibisyon aktivitelerinin tayinine [22,23], endüstriyel bitkilerden

üretileen doğal boyaların fenolik içeriklerinin belirlenmesine [21], fenolik bileşiklerin hidrojen peroksit süpürme aktivitelerinin tayinine [24] modifiye edilerek başarıyla uygulanmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 2.21), 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.

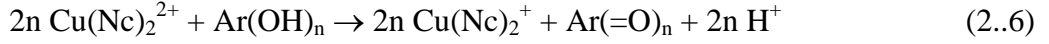


Şekil 2.21: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)_n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.

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 çözünebilir analogu) antioksidan aktivite için yaygın olarak kabul edilen bir standart olduğundan CUPRAC yöntemi sonuçları troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır. Aşağıda verilen antioksidan bileşiklerin yükseltgenmesi

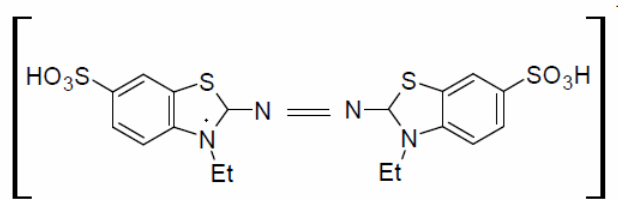
reaksiyonunda antioksidan bileşikler aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler:



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 absorptiviteyi ($7.5-8.5 \times 10^3$).2n L mol⁻¹cm⁻¹ olacaktır.

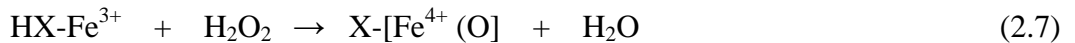
2.5.2.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları [4,76] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorpsiyonunun, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında ABTS⁺ radikal katyonunun (Şekil 2.22) absorpsiyonunda belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yönteme “troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi” (ABTS/TEAC) adı da verilir.



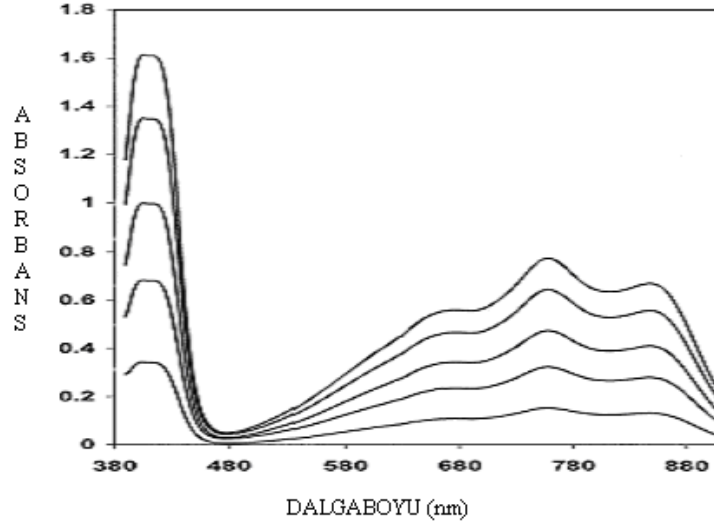
Şekil 2.22: ABTS⁺ katyonunun yapısı.

660, 734 ve 820 nm'de maksimum veren ABTS⁺ radikal katyonu metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu ile üretilen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir. ABTS⁺ katyon radikalini oluşturmak için, ABTS; myoglobin ve H₂O₂ ile inkübe edilir [81].



(HX-Fe³⁺ = myoglobin; X-[Fe⁴⁺(O)] = ferrilmyoglobin)

Orijinal TEAC denemesinin bağıl standart sapma değerleri, gün içi denemeler için % 0.54 - 1.59, günler arası denemeler için % 3.6 - 6.1 olarak bulunmuştur [76].



Şekil 2.23: ABTS radikal kationunun absorpsiyon spektrumu.

Re ve arkadaşları [82] tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş TEAC yönteminde potasyum persülfatla ABTS'nin oksidasyonu sonucu üretilen $ABTS^+$ radikal kationları kullanılır. Üretilen bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararlıdır. Geliştirilen bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilir.

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

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde [6] demir(III)'in indirgenmesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük pH'larda oluşan Fe(III)'in, kısa adı TPTZ olan tripiridiltriazin ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)-TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltriazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavidir ve 593 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir.

2.5.2.4. DPPH Yöntemi

DPPH yöntemi; antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan $DPPH^{\bullet}$ (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli $DPPH^{\bullet}$ radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon verir. Etanol veya metanollü $DPPH^{\bullet}$ çözeltilisine

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 [5].

Yöntemin hızlı ve basit olması gibi avantajlarına karşın bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 515 nm'de DPPH ile kesişen spektrum vermesi analizin yorumunu zorlaştırır. Ayrıca çoğu antioksidan sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş reaksiyona girer. Bundan dolayı yöntem; DPPH ile reaksiyona giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme ortaya koyamaz. Bunların yanında DPPH'nin rengi, ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH'a fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi oldukça güçleşir.

2.5.2.5. Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem Singleton ve arkadaşları [7] tarafından antioksidanların toplam fenolik içeriğini ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfomolibdik-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, $\text{P(MoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$ 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 yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar.

2.6. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN GIDA ÖRNEKLERİ

2.6.1. Meyve Suları

2.6.1.1. Portakal Suyu

Portakal suyu en güçlü antioksidanlardan flavonoidler (hesperetin, naringenin ve glikozitleri), karotenoidler (ksantofiller, kriptoksantinler, karotenler) ve C vitaminiyle birlikte folat gibi yararlı antioksidanlar içermektedir. Tüm bu özellikleri dolayısıyla portakal suyu diğer meyve ve sebzeler gibi kanser ve kalp hastalıklarına karşı önemli koruyucu özelliğe sahiptir [83].

2.6.1.2. Vişne Suyu

Vişnenin içerdiği yüksek miktarda antosiyanin bileşikler, önemli derecedeki antioksidan etkileri nedeni ile sağlıklı beslenme açısından oldukça önemlidir [84,85]. Vişne suyunda bulunan en önemli antosiyanin bileşikler siyanidin, pelargonidin, peonidin ve bu antosiyaninlerin glikozitleridir. Vişne suyunda antosiyaninler yanında kuersetin, kaemferol, kateşin ve askorbik asit bileşikleri de bulunmaktadır [86,87].

2.6.1.3. Kayısı Suyu

Kayısı meyvesi başta Türkiye olmak üzere, İran, Çin ve Japonya gibi ülkelerde etkin bir şekilde yetiştirilmektedir. Kayısı suyu içeriğinde bulunan yüksek miktardaki C vitamini antioksidan kapasitesine yaklaşık % 20'lik bir katkı yapmaktadır [88]. Diğer yandan yapısında bulunan başlıca antioksidan bileşikler; kafeik asit, klorojenik asit, kateşin, epikateşin, flavonoller ve *p*-kumarik asit türevleridir.

2.6.1.4. Şeftali Suyu

Şeftali meyvesi insan sağlığının gelişimi açısından büyük öneme sahip doğal kimyasal ve pigmentler açısından oldukça zengindir. İçeriğinde bulunan en önemli antioksidan bileşikler; C vitamini, E vitamini ve karotenoidlerdir [89].

2.6.2. Meyve Posaları

2.6.2.1. Üzüm Posası



Şekil 2.24: Üzüm posasının görünümü.

Üzüm posası, meyve suyu ve şarap üretimi sırasında endüstri atığı olarak ele geçmekte ve içeriği temel olarak üzüm çekirdeği, kabuğu ve sapından meydana gelmektedir. Şarap ve üzüm suyu imalat işlemine bağlı olarak üretiminin ardından, üzümün doğal bileşenlerinden olan, resveratrol ve linoleik asit gibi bileşenler posada kalabilmektedir [90]. Üzüm çekirdeğinin temel bileşenleri (w/w); %40 lif, %16 uçucu yağ, %11 protein ve %7 tanninler, şekerler, mineraller gibi kompleks fenolik bileşiklerdir. Uçucu yağ içeriğinin büyük bir kısmı kozmetik ve ilaç sanayisinde yaygınca kullanılmaktadır. Üzüm kabuğu lipoperoksidasyonu azaltan ve anti mutajenik aktiviteye de sahip antioksidan özellikli doğal pigmentler olan antosiyanin ve antosiyanidin kaynağıdır. Üzüm sapı tannik bileşikler bakımından oldukça zengindir, içerdikleri fenolik bileşenler yüksek nutrasötik ve farmakolojik öneme sahiptir [91,92].

2.6.2.2. Yaban Mersini Posası



Şekil 2.25: Yaban mersini posasının görünümü.

Yaban mersini meyvesinin içerdiği yüksek konsantrasyondaki antosiyaninler ve diğer fenolik bileşikler sahip oldukları yüksek antioksidan aktiviteleri nedeniyle çeşitli kronik hastalıklara karşı korunmada büyük katkıya sahiptirler [93]. Yaban mersini hasatın ardından tazeliğini hızlı bir şekilde kaybetmektedir. Yaban mersininin büyük kısmı meyve suyu eldesi amacıyla işleme sokulmaktadır ve bu işlem sırasında atık ürün olarak yüksek miktarlarda posa oluşmaktadır. Posa preslenmiş kabuk, pulp kalıntısı ve çekirdek içermektedir. Antosiyanince zengin olan yaban mersini meyvesinin posasında önemli miktarlarda antosiyaninler bağlanmış şekilde kalmaktadır [94].

2.6.3. Baharatlar

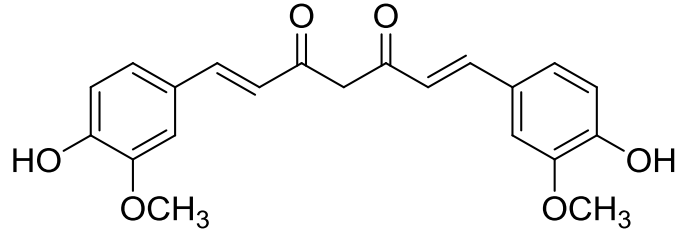
2.6.3.1. Zerdeçal (*Curcuma longa* L.)



Şekil 2.26: Zerdeçal bitkisinin görünümü.

Curcuma longa, önemli bir baharat çeşidi ve boya maddesi olup yaklaşık 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. *Curcuma longa*, turmerik, zerdeçal ve kurkumin isimleri ile de anılmaktadır. Sarı renk pigmentleri, bitkinin kökünün öğütülmesiyle elde edilir.

Hindistan ve diğ er Asya ülkelerinde geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır ve etken maddesi kurkumindir [95].



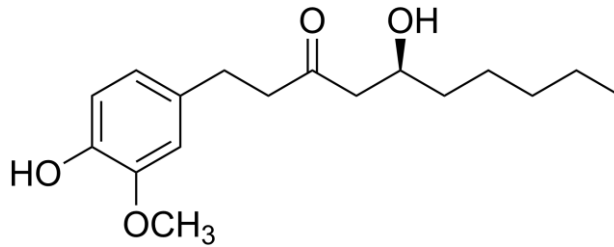
Şekil 2.27: Kurkuminin kimyasal yapısı.

2.6.3.2. Zencefil (*Zingiber officinale Roscoe*)



Şekil 2.28: Zencefil bitkisinin görünümü.

Taze ve kuru olarak tüketilebilen zencefil, rizom köklerinden meydana gelmektedir. Binlerce yıldır Çin ve Hindistan'da baharat ve tıbbi bitki olarak yetiştirilmektedir. Hindistan'da da geniş bir üretim ve kullanım alanı vardır ve etken maddesi 6-gingerol'dür. Geleneksel Hint tıbbında, pıhtılaşmayı ve kolesterolü önleyici, mafsallı iltihabını tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Zencefilin aktif maddelerinden, 6-gingerol ve 6-paradol bileşimlerinin promyelotik lösemiye durdurma etkisi vardır. Bu da kanser hücresi DNA sentezini bozarak etkileme şeklindedir. Antiinflamatuar etkisi ile artrit ve baş ağrısını tedavi edici etkisi de rapor edilmiştir [96,97].



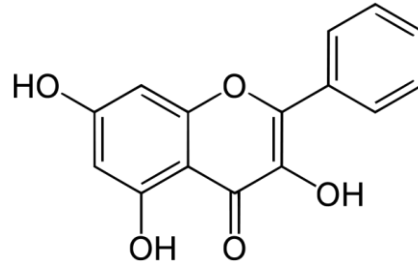
Şekil 2.29: 6-gingerol'ün kimyasal yapısı.

2.6.3.3. Havlıcan (*Alpinia officinarum*)



Şekil 2.30: Havlıcan bitkisinin görünümü.

Havlıcan (*Alpinia officinarum*) zencefilgiller familyasına ait çok yıllık bir bitki türüdür. Ana vatanı Hindistan ve güneydoğu Asyadır. Havlıcan çiçekleri pembe ya da beyaz çiçeklidir, yaprakları ise mızraksıdır. Kökleri ve toprak altı kısmı baharat olarak kullanılır. Havlıcan da bulunan etkin madde flavonol grubundan galangin'dir. Tıp ve mutfak alanında geniş bir kullanım alanı olan kök saplı bir bitkidir. Bugün en çok Güneydoğu Asya'da yetiştirilmektedir ve bu coğrafyanın mutfak kültüründe oldukça fazla kullanılmaktadır.



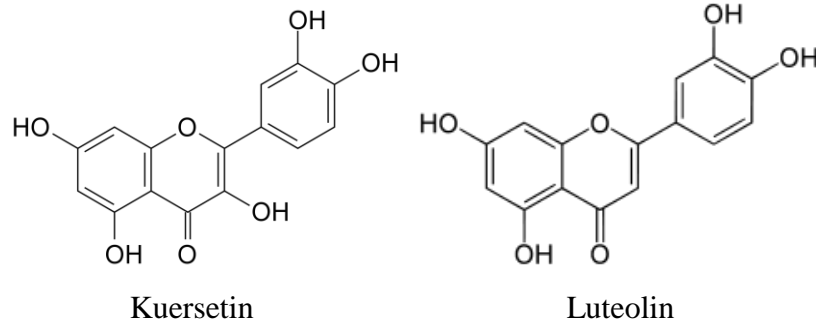
Şekil 2.31: Galangin'in kimyasal yapısı.

2.6.3.4. Aspir Çiçeği (*Carthamus tinctorius*)



Şekil 2.32: Aspir çiçeğinin görünümü.

Ülkemizde Güneydoğu Anadolu bölgesinde yetiştirilen Aspir çiçeği doğu ve batı asya da geniş bir alanda dağılmıştır. Aspir çiçeği doğal bir renklendirici kaynağı olması yanında geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca önemli bir antioksidan kaynağı olan Aspir çiçeğinin içerisinde önemli miktarda kuersetin, luteolin ve bu bileşiklerin glikozitleri bulunmaktadır [98].



Şekil 2.33: Kuersetin ve luteolinin kimyasal yapısı.

2.7. SENSÖR ESASLI ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ İLE İLGİLİ UYGULAMALAR

Moleküler spektroskopik olarak toplam antioksidan kapasite tayini için optik sensörlerin kullanımı ile ilgili literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Steinberg ve Milardovic, DPPH• ve galvin oksil (GV•) gibi kromojenik radikallerin plastikleştirilmiş polivinil klorür (PVC) matriksinde tutturulmaları ile elde ettikleri optik sensörleri kullanarak askorbik asit, troloks, glutatyon ve ürik asit gibi antioksidan bileşikleri tayin etmişlerdir [99].

Palaroan ve arkadaşları antioksidan tayini için fiber optik biyosensör kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan fiber optik biyosensör hidrojen peroksidin lüminol/hematein reaktifi ile reaksiyonu sonucu oluşan kemilüminesans ürününün sönümlenmesine dayanmaktadır [100].

Ruthenium-bipiridil komplekslerinin ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$), Nafyon filme tutturularak elektron transfer davranışları elektrokimyasal olarak incelenmiştir. Ancak çalışmalarda oluşturulan bu materyaller antioksidan tayin sensörü olarak kullanılmamıştır [101,102].

Tang ve arkadaşlarının antioksidan tayini için önerdikleri prob, radikal süpürme aracılığıyla floresansında geri dönüşümlü sönümlenme meydana gelen anyonik konjuge polimerdir. Floresansta meydana gelen geri kazanımın, kullanılan probta antioksidan tarafından radikale hidrojen transferi sonucunda antioksidanın radikali ingirmesiyle gerçekleştiği öne sürülmüştür. Bu materyalin askorbik asit tayininde oldukça kullanışlı olmasına karşın sistein, glutatyon ve ürik asit için duyarlılığın oldukça düşük olduğu rapor edilmiştir [103].

Wang ve arkadaşları antioksidan tayini için ince film fotodiyod (OPD) kemilüminesans (CL) sensörü geliştirmişlerdir. Antioksidan konsantrasyonuna karşı CL intensitesi (I_0/I) ile oluşturulan eğriden iyi bir lineerlik elde edilememiştir ve çalışmada antioksidan olarak α -tokoferol, β -karoten ve kuersetin olmak üzere yalnızca üç bileşik test edilmiştir [104].

Lee ve arkadaşları geliştirdikleri renkli ince filmi kullanarak bazı örneklerin radikal süpürme aktivitelerini tayin etmişlerdir. Çalışmada menekşe renkli stabil serbest radikal olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) polivinil alkol (PVA) ince film üzerine tutturulmuştur. Antioksidanların varlığında renkli ince filmin absorbansındaki düşüş ölçülerek antioksidan örneğinin radikal süpürme aktivitesi tayin edilmiştir [105].

Antioksidan tayini için moleküler spektroskopik sensörler gibi literatürde elektrokimyasal esaslı sensörlerin kullanımı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu

sensörler ile antioksidanlar için yüksek lineerlikte kalibrasyon elde edilememesi yanında sadece limitli sayıda antioksidan bileşik için sinyal elde edilebilmiştir.

Guo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada demir kompleksleri esaslı amperometrik sensör ve modifiye protein elektrod kullanarak oluşturdukları kinetik model aracılığıyla antioksidanların hidrojen peroksit süpürme aktivitelerini ölçmüşlerdir. Antioksidan varlığında ve yokluğunda elde edilen karşılıklı katodik akım farklılığının antioksidan konsantrasyonunun lineer fonksiyonu olduğu kabul edilerek tayin gerçekleştirilmiştir [106].

Liu ve arkadaşları, antioksidan konsantrasyonunu, geliştirdikleri modifiye DNA karbon elektrod sensör yardımıyla bulmuşlardır. Burada bipiridil-Ru(II) kompleksi aracılığı ile yapılan kinetik modelleme ile elektro-adsorplanan DNA oksidasyonu varlığında ve yokluğunda elde edilen akımın pik oranı antioksidan konsantrasyonunun karekökünün lineer fonksiyonu olarak elde edilmiştir [107].

Jayasri ve Narayanan yaptıkları çalışmada geliştirdikleri bütillenmiş hidroksianizol (BHA) sensörü ile elde ettikleri kalibrasyon denkleminin kayım değeri ile eğim değerinin büyüklüğü birbirine yakın çıkmıştır. Geliştirilen sensör yalnızca BHA sentetik antioksidan bileşiği için iyi bir şekilde tayin gerçekleştirebilmiştir [108].

Liu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, indiyum kalay oksit ile modifiye ettikleri TiO_2 üzerine adsorplanan DNA'nın fotoksidasyonu sonrasında metilen mavisinin akımındaki azalmanın başlangıçtaki antioksidan konsantrasyonunun fonksiyonu olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada geliştirilen sensör ile model antioksidanlar olarak yalnızca glutatyon ve gallik asit tayin edilebilmiştir [109].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada, kimyasal maddelerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde S220 model Mettler Toledo pH-metre, inkübasyon işlemi için J.P. Selecta su banyosu, baharat ekstralarının hazırlanmasında Milestone Inc. Ethos One mikrodalga ekstraksiyon sistemi, absorbans ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu ve 1 mm ışık yollu birer çift kuartz küvet, reflektans ölçümleri için CCD temelli dedektöre sahip olan minyatür fiber optik spektrofotometre (Ocean Optics Inc., HR4000CG-UV-NIR), reflektans ölçümlerinde kullanılmak üzere uygun fiber prob (Ocean Optics Inc., R400-7-SR) ve ışık kaynağı olarak tungsten lamba (Ocean Optics Inc., LS-1), bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, sensörlerin hazırlanmasında kullanılmak üzere programlanabilir rotator (BİOSAN, Bulti Bio RS-24) kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; Nafyon[®] 115 perflorürlenmiş membran (incelik 0.005 inç), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc), troloks (TR), morin (MR), kuersetin (QR), naringin (N), naringenin (NG), gallik asit (GA), rozmarinik asit (RA), α -tokoferol (TOC), kafeik asit (CFA), L-askorbik asit (AA), kateşin (CT), rutin (RT), mirisetin (MR), fisetin (FS), kaemferol (KA), glutatyon (GSH), sistein (CYS), homosistein (HCYS), ürik asit (UA), bilirubin (BIL), delfinidin (DP), bakır(II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), amonyum asetat ve mutlak etil alkol (EtOH), metil alkol (MeOH) ve hidroklorik asit (HCl) ve sodium hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Lipton yeşil çay (*Camellia sinensis*) Unilever Türk San. Tic. A.Ş., portakal ve vişne suyu örnekleri Tamek Gıda Konserve San. Tic. AŞ. (İstanbul, Türkiye), kayısı ve şeftali suyu örnekleri Aroma Meyve Suları Gıda San AŞ. (Bursa, Türkiye), konkord üzüm ve yaban mersini meyveleri Wal-Mart Store Inc. (Sen Bruno, Kaliforniya, USA), baharat örnekleri Ayfer Kaur Baharat ve Doğal Ürünler'den (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

Çalışılan doku homojenizatları ve serum örnekleri İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden (Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı) temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN, ÖZÜTLERİN, HİDROLİZATLARIN VE HOMOJENİZATLARIN HAZIRLANMASI

3.3.1. Standart Antioksidan Bileşiklerin Hazırlanması

Ürik asit (1.0×10^{-3} M) ve bilirubin (5.0×10^{-4} M) standart çözeltileri 0.01 M NaOH çözeltisi içerisinde ve bazın aşırısı 0.01 M HCl çözeltisi ile nötrleştirilerek hazırlanmıştır. Askorbik asit, sistein, homosistein (1.0×10^{-3} M) ve delfinidin (3.0×10^{-4} M) çözeltileri suda çözülerek hazırlanmıştır. Diğer tüm antioksidan bileşiklerin standart çözeltileri 1.0×10^{-3} M konsantrasyonda olacak şekilde EtOH ile günlük olarak hazırlanmıştır.

3.3.2. Yeşil Çay Özütünün Hazırlanması

Yeşil çay bardak poşeti (2 g), beher içerisinde bulunan 250 mL'lik kaynatılmış suya 2 dakika süre ile batırılıp çıkarıldı, ardından 3 dakika süre ile üstü kapatılmış beherde demlenmeye bırakıldı. Poşet çıkarıldı ve bulanık çözelti siyah bantlı whatman kantitatif filtrelerden geçirilerek elde edilen berrak çözelti oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

3.3.3. Üzüm ve Yaban Mersini Posasının Hazırlanması

Üzüm posası ve yaban mersini posası şu şekilde hazırlandı: Üzüm örneği ve yaban mersini taneleri mikser yardımı ile öğütüldü. Öğütülen üzüm taneleri kaplara alındı ve üzerine su eklenerek çökmesi için 1 gece boyunca soğuk odada ($\approx +4$ °C) bekletildi. Süpernatant kısım dekante edildi ve posa kısmı 425 µm boyutundaki elekten geçirildi ve elekten çıkan sulu kısım renksiz oluncaya dek su ile yıkandı. Toplanan posa kısmı çeker

ocakta kurutuldu ve havan içinde öğütüldü. Posa örnekleri analiz işlemine kadar $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ buzdolabında muhafaza edildi.

3.3.4. Üzüm ve Yaban Mersini Posası Hidrolizatlarının Hazırlanması

Üzüm ve yaban mersini posası örneğinden alınan 0.2 gramlık kısımlar ekstraksiyon balonuna yerleştirildi ve üzerine 10 mL farklı pH'larda (pH 1, 4 ve 7) distile su çözeltisi ilave edildi. Ekstraksiyon balonu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki su banyosuna geri soğutucu eşliğinde yerleştirildi. 30 dakikalık hidroliz işlemi sonucunda ele geçen çözeltiler $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden süzülerek hidrolizatlar hazırlanmıştır.

3.3.5. Üzüm ve Yaban Mersini Posası Özütlerinin Hazırlanması

Üzüm ve yaban mersini posası örneğinden alınan 0.2 gramlık kısımlar ekstraksiyon balonuna yerleştirildi ve üzerine 10 mL %50 metanol-distile su (pH 1) karışımı ilave edildi. Ekstraksiyon balonu $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki su banyosuna geri soğutucu eşliğinde yerleştirildi. 15 dakika süre ile ekstraksiyon işlemi sonucunda ele geçen çözelti $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden süzülerek ekstre hazırlanmıştır.

3.3.6. Meyve Suyu Örneklerinin Hazırlanması

Kutu şeklinde temin edilen hazır meyve suları analiz öncesinde $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden geçirilerek berrak çözelti elde edildi ve analize hazır hale getirildi.

3.3.7. Baharat Özütlerinin Hazırlanması

Öğütülerek toz haline getirilmiş örneklerden (zerdeçal, zencefil, havlıcan ve aspir çiçeği) 0.1 gram tartılarak mikrodalga ekstraksiyon cihazının rotorlarına yerleştirildikten sonra üzerlerine 20 mL % 80 metanol-su karışımı eklendi. Rotorlar mikrodalga ekstraksiyon sistemine yerleştirildikten sonra ekstraksiyon işlemi üç adımdan oluşmuştur;

25 dakika süre ile max. 1500W enerji verilerek sıcaklığın $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ulaşması sağlandı, 10 dakika süre ile $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkla ekstraksiyon işlemi yapıldı ve son olarak 10 dakika soğutma işlemi uygulandı. Ele geçen örnekler $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden geçirilerek analize hazır hale getirildi.

3.3.8. Doku Homojenizatlarının Hazırlanması

Hayvanlar (CD-1 mice) dekapitasyon yoluyla sakrifiye edildikten sonra hızlı bir şekilde karaciğer ve böbrek dokuları 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de saklanmıştır. Doku homojenizatlarının analiz öncesinde etil alkol ilavesi (1:10) ile proteinleri çöktürülmüş ve santrifüj (4000 rpm, 5 dakika) edilerek, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ membran filtreden süzölmüştür [110-112].

3.3.9. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

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 ($\text{pH}=7.0$) 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 çözümlenip 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu çözeltilere ek olarak Nafyon katyonik iyon değiştirici membran geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi için 4.5×0.5 cm boyutlarında ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü için 2.0×1.0 cm boyutlarında olacak şekilde kesilmiştir.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Orijinal CUPRAC Yöntemi

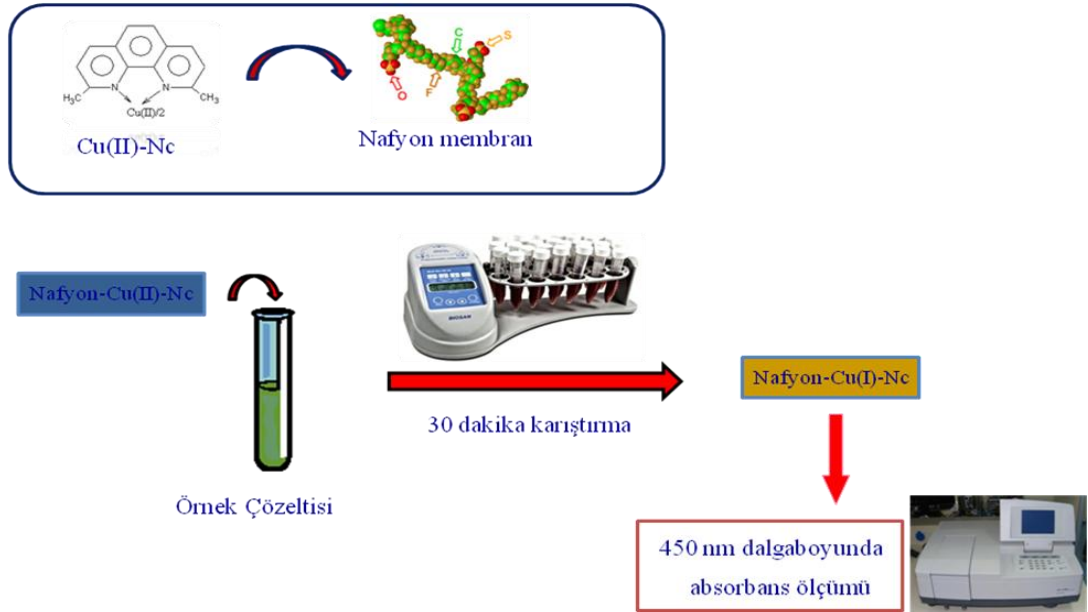
Bir deney tüpü içerisine 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL standart antioksidan çözeltisi ve $(1.1-x)$ mL H_2O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra 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 absorbanans değerleri ölçüldü.

$$1\text{ mL Cu(II)} + 1\text{ mL Nc} + 1\text{ mL tampon} + x\text{ mL örnek çöz.} + (1.1-x)\text{ mL H}_2\text{O} \quad (3.1)$$

$$V_{\text{toplam}} = 4.1\text{ mL}$$

3.4.2. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemi (CUPRAC Antioksidan Sensörü)

Vidalı kapaklı deney tüpü içerisine 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan sırasıyla 2'şer mL ilave edildi ve toplam hacim 8.2 mL olacak şekilde distile su eklendi. Daha önceden hazırlanmış Nafyon membranlar çözelti içerisine eklenerek 30 dakika süre ile karıştırma işlemi uygulandı. Karıştırma sonunda elde edilen membran antioksidan çözeltisine (etanol ile 8.2 mL'ye seyreltilmiş) eklendi ve tekrar 30 dakika süre ile karıştırıldı. Elde edilen sensörler içerisi su ile doldurulmuş 1mm ışık yollu küvetlerde Cu(II)-Nc tutturulmuş referans sensöre karşı, oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbens değerleri ölçüldü. Optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin uygulanışı şematik olarak Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



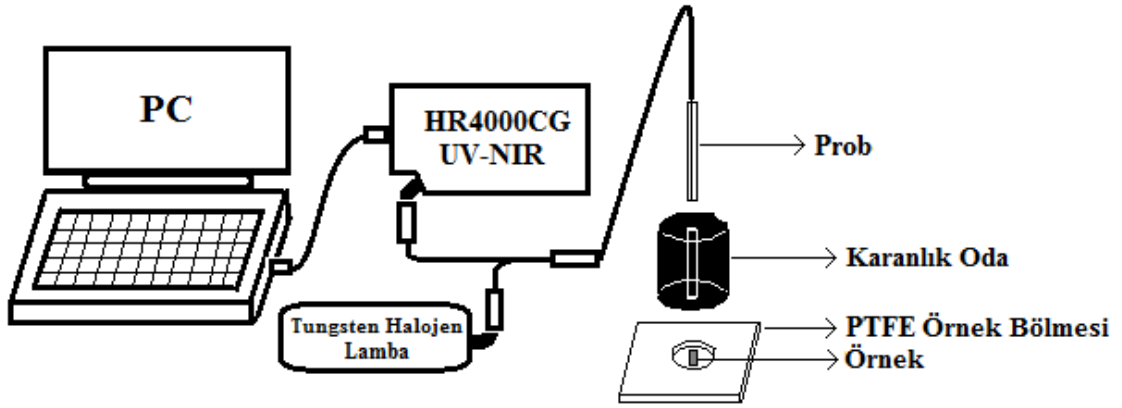
Şekil 3.1: Optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin şematik gösterimi.

3.4.3. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü

Vidalı kapaklı deney tüpü içerisine 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tamponundan sırasıyla 2'şer mL ilave edildi ve toplam hacim 8.2 mL olacak şekilde distile su eklendi. Daha önceden hazırlanmış Nafyon membranlar (2.0x1.0 cm) çözelti içerisine eklenerek 30 dakika süre ile karıştırma işlemi uygulandı. Karıştırma sonunda elde edilen membran antioksidan çözeltisine (etanol ile 8.2 mL'ye seyreltilmiş) eklendi ve tekrar 30 dakika süre ile karıştırıldı. Bu süre sonunda antioksidan çözeltisine eklenmemiş olan Cu(II)-Nc tutturulmuş referans sensör örnek

bölmesine yerleştirilerek reflektans değeri sıfırlandı ve ardından antioksidan içeren çözeltiliden çıkarılan sensörün fiber-optik spektrometre kullanılarak 530 nm dalga boyunda reflektans değeri ölçüldü.

Reflektans ölçümleri için kullanılan sistem Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Reflektans ölçümleri için ışık kaynağı olarak tungsten lamba kullanıldı ve CCD temelli dedektöre sahip olan minyatür fiber optik spektrofotometre (Ocean Optics Inc., HR4000CG-UV-NIR) kullanılarak ölçüm gerçekleştirildi. Prob yüzeyinden yansıyan ışın fiber optik kablo ile minyatür fiber optik spektrofometreye iletilti. Diğer taraftan PC ve yazıcı ile bağlantı kuruldu. Optik izolasyon amacıyla prob karanlık oda içerisinde tutuldu ve bu şekilde çevreden gelen ışıkların girişimi en aza indirildi.



Şekil 3.2: Reflektans ölçüm düzeneği.

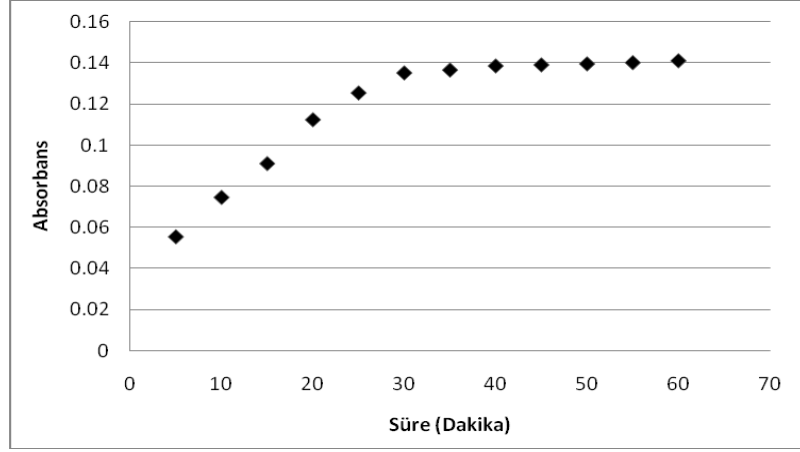
4. BULGULAR

4.1. OPTİK SENSÖR ESASLI CUPRAC YÖNTEMİNİN STANDART ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI

4.1.1. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

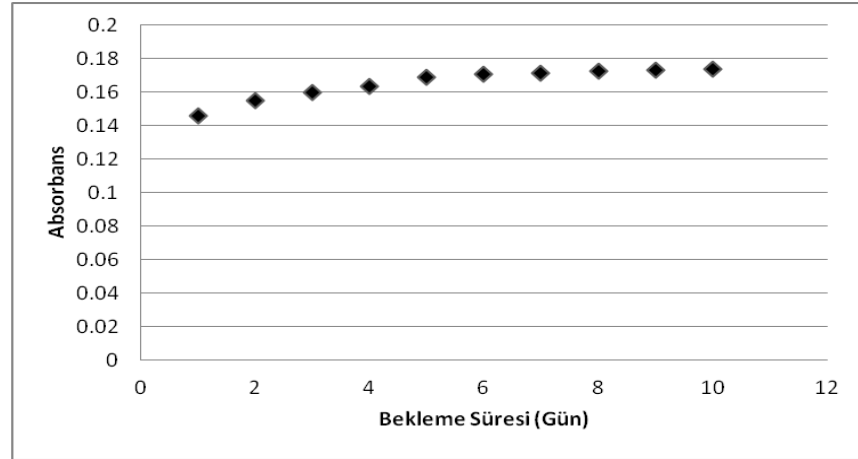
Deneysel çalışmaların ilk adımında optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin optimum deney şartlarını belirlemek amacıyla bir dizi deneme yapılmıştır. Bunlar sırasıyla CUPRAC reaktifinin (Cu(II)-Nc) nasyon membran üzerine tutturulması (CUPRAC sensörü), reaktif tutturulan membranın kararlılığının araştırılması ve örnek çözeltisi içerisine eklenen reaktif tutturulmuş membranın karıştırma süresinin belirlenmesi çalışmalarıdır.

Cu(II)-Nc kompleksini Nasyon katyon değiştirici membran üzerine tutturmak amacıyla uygun boyutlarda kesilen membran (4.5x0.5 cm) CUPRAC çözeltisi içerisine eklendi. CUPRAC çözeltisi; tüplere 2 mL CuCl₂, 2 mL Nc, 2 mL NH₄Ac ve 2.2 mL su eklenerek hazırlandı. Reaktifin membran üzerinde kararlı olarak kaldığı karıştırma süresi belirlenmesi amacıyla içerisine membran eklenen CUPRAC çözeltileri karıştırıcıya yerleştirilerek karıştırma işlemi uygulandı. Değişik sürelerde alınan membranların 450 nm dalgaboyunda suya karşı absorbans okumaları yapıldı ve optimum karıştırma süresi 30 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.1). 30 dakikalık karıştırma süresi sonucunda reaktif tutturulmuş membranlar referans sensör olarak kullanıldı.



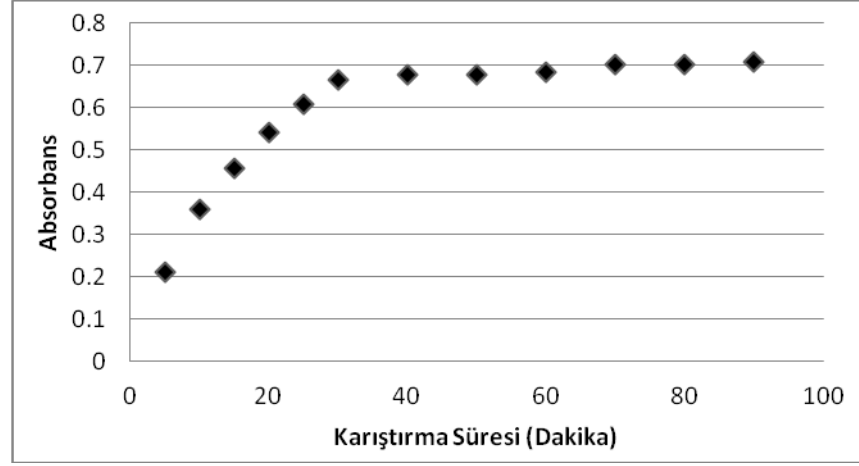
Şekil 4.1: Referans sensör için karıştırma süresi-absorbans grafiği.

Referans sensörler ağız kapalı tüpler içerisinde bekletilerek günler arası suya karşı absorbans değerleri ölçülerek bir değişimin meydana gelip gelmediği incelendi. 10 gün sonunda absorbansta belirgin bir değişim olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Referans sensörün bekleme süresi-absorbans grafiği.

Standart antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerini belirlemek için seçilen referans bileşik olan troluks bileşiğinden (1.0×10^{-3} M) alınan 0.2 mL örnek toplam hacim 8.2 mL olacak şekilde etanol ile seyreltildi. Hazırlanan etanolik çözeltiye referans sensör eklendi ve karıştırıcıda karıştırma işlemi uygulandı. Değişik karıştırma sürelerinde çözeltiden alınan sensörün referans sensöre karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri yapıldı. Örnekler için optimum karıştırma süresi 30 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.3).

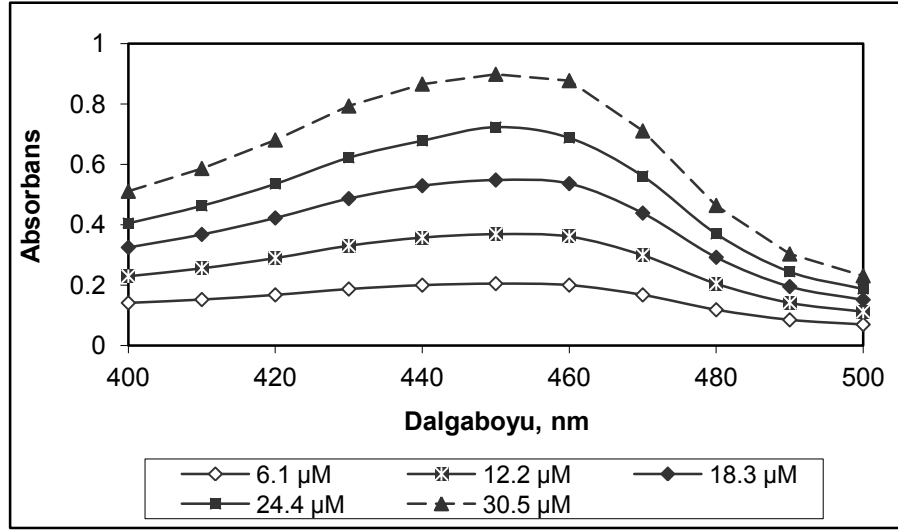


Şekil 4.3: Örnek tayini için karıştırma süresi-absorbans grafiği.

Yapılan denemeler sonucunda optimum deney koşulları belirlendi ve Şekil 3.1’de özetlenen sistemle yöntem uygulandı. İlk olarak CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi Nafyon membran üzerine tutturularak referans sensör elde edilir. Referans sensörler, etanol ile 8.2 mL toplam hacime seyreltilmiş antioksidan çözeltilerine eklenerek yarım saat süre ile karıştırıcıda karıştırıldı. Yarım saat sonunda elde edilen sensörlerin referans sensöre karşı 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapıldı.

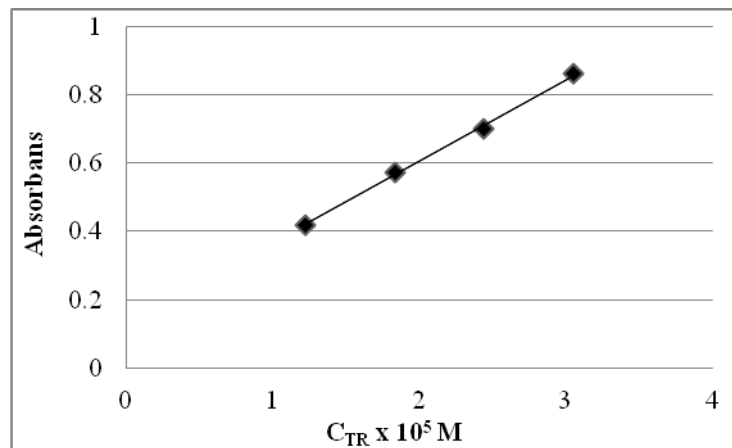
4.1.2. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Troloks Antioksidan Bileşiğine Uygulanması

Geliştirilen yöntemde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun 1.0×10^{-3} M standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi uygulandı. Denemeler sonucunda Şekil 4.4’teki spektrumda görüldüğü gibi maksimum absorpsiyon elde edilen dalgaboyu 450 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.4: Çeşitli konsantrasyonlarda (son konsantrasyon) troloks varlığında sensör üzerinde oluşan Cu(I)-Nc kelatinin görünür alan spektrumu.

Optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltilerine uygulanarak troloks'un kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusu oluşturularak elde edilen doğru denklemi $A=2.40 \times 10^4 c + 0.05$ şeklindedir. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısını (ϵ) vermektedir. Troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı $2.40 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5: Troloks bileşiğinin optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.

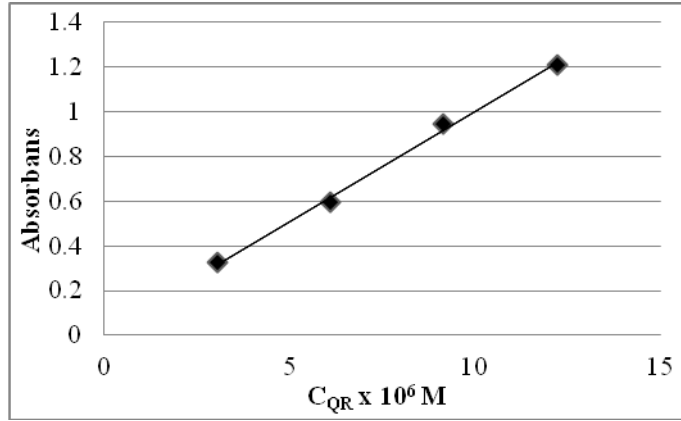
4.1.3. Standart Antioksidan Bileşiklerin Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemine Göre Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

Gıda ve plazma örneklerinde zengince bulunan antioksidan bileşiklerine (kuersetin, kateşin, rutin, kafek asit, fisetin, morin, naringin, kaemferol, naringenin, rozmarinik asit, gallik asit, delfinidin, glutatyon, askorbik asit, sistein, homosistein, ürik asit, α - tokoferol, bilirubin) optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi uygulanarak molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir.

4.1.3.1. Kuersetin

Tablo 4.1: Kuersetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi (c: molar konsantrasyon ve A: absorbans).

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.3243
6.10×10^{-6}	0.5932
9.15×10^{-6}	0.945
12.2×10^{-6}	1.2114
Doğru Denklemi : $A = 9.88 \times 10^4 c + 0.02$ $r=0.9989$	

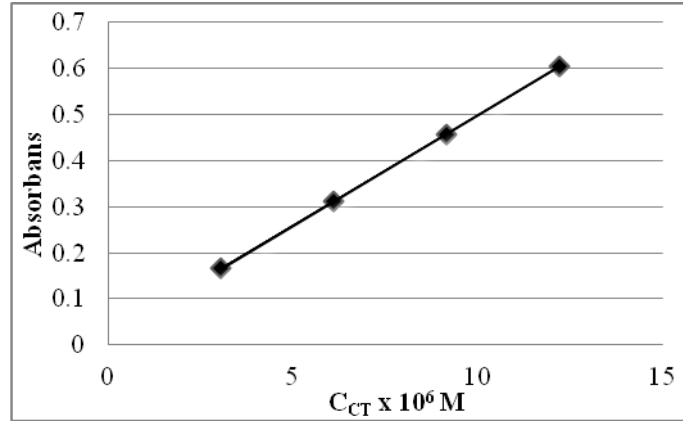


Şekil 4.6: Kuersetin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.2. Kateşin

Tablo 4.2: Kateşinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.1654
6.10×10^{-6}	0.3122
9.15×10^{-6}	0.4554
12.2×10^{-6}	0.6053
Doğru Denklemi : $A = 4.61 \times 10^4 c + 0.05$ $r=0.9999$	

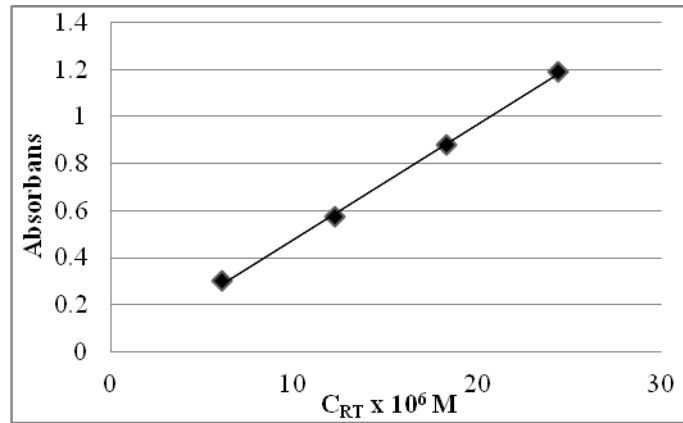


Şekil 4.7: Kateşin bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.3. Rutin

Tablo 4.3: Rutinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
6.10×10^{-6}	0.3019
12.20×10^{-6}	0.5745
18.30×10^{-6}	0.8789
24.40×10^{-6}	1.1896
Doğru Denklemi : $A = 4.88 \times 10^4 c - 0.01$ $r=0.9995$	



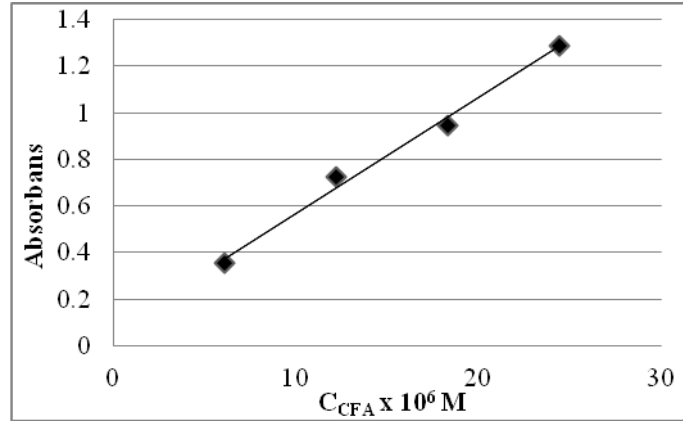
Şekil 4.8: Rutin bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.4. Kafeik asit

Tablo 4.4: Kafeik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
6.10×10^{-6}	0.3541
12.20×10^{-6}	0.7254
18.30×10^{-6}	0.9454
24.40×10^{-6}	1.2896

Doğru Denklemi : $A = 4.96 \times 10^4 c + 0.07$ $r=0.9957$



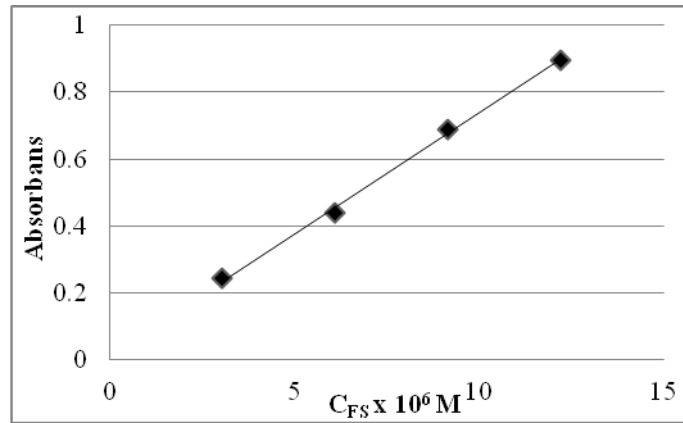
Şekil 4.9: Kafeik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.5. Fisetin

Tablo 4.5: Fisetinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.2440
6.10×10^{-6}	0.4390
9.15×10^{-6}	0.6882
12.20×10^{-6}	0.8952

Doğru Denklemi : $A = 7.44 \times 10^4 c + 0.02$ $r=0.9989$

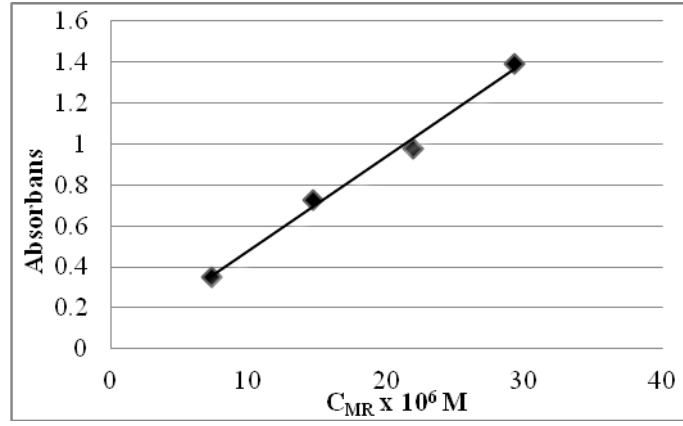


Şekil 4.10: Fisetin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.6. Morin

Tablo 4.6: Morinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri.

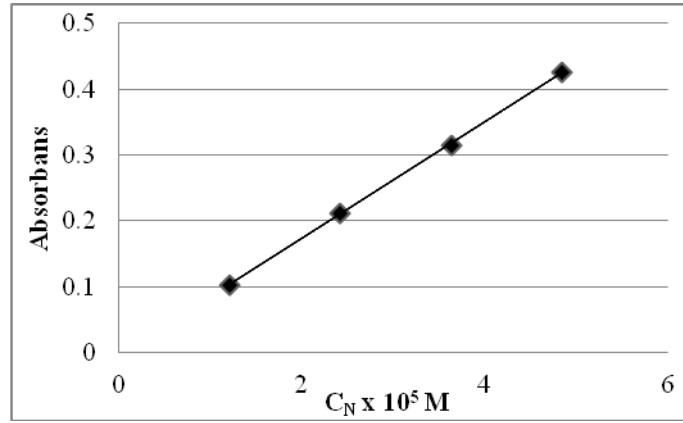
Konsantrasyon (M)	Absorbans
7.32×10^{-6}	0.3527
14.64×10^{-6}	0.7240
21.96×10^{-6}	0.9788
29.28×10^{-6}	1.3936
Doğru Denklemi : $A = 4.61 \times 10^4 c + 0.02$ $r=0.9962$	

**Şekil 4.11:** Morin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.7. Naringin

Tablo 4.7: Naringinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.21×10^{-5}	0.1021
2.42×10^{-5}	0.2114
3.63×10^{-5}	0.3145
4.84×10^{-5}	0.4257
Doğru Denklemi : $A = 8.88 \times 10^3 c - 0.01$ $r=0.9999$	

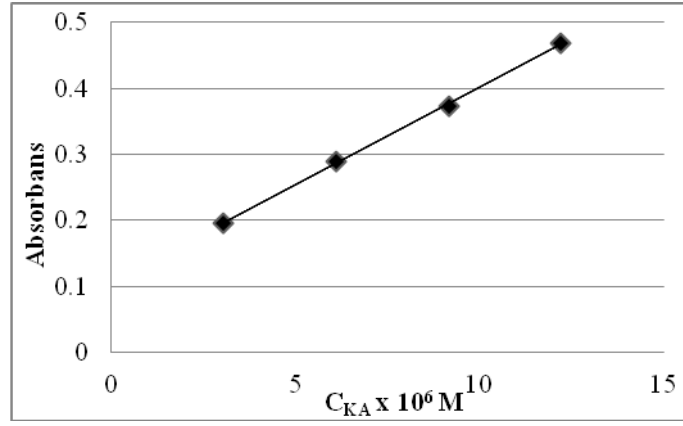
**Şekil 4.12:** Naringin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.8. Kaemferol

Tablo 4.8: Kaemferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.1959
6.10×10^{-6}	0.2882
9.15×10^{-6}	0.3736
12.20×10^{-6}	0.4684

Doğru Denklemi : $A = 2.95 \times 10^4 c + 0.11$ $r=0.9998$

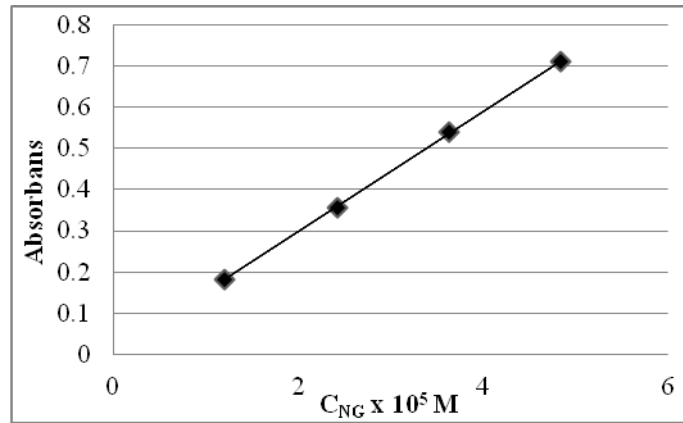
**Şekil 4.13:** Kaemferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.9. Naringenin

Tablo 4.9: Naringenin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.21×10^{-5}	0.1826
2.42×10^{-5}	0.3562
3.63×10^{-5}	0.5403
4.84×10^{-5}	0.7105

Doğru Denklemi : $A = 1.46 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9999$

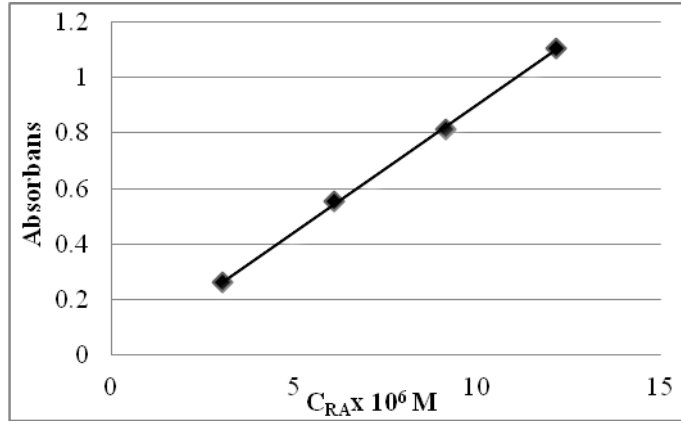
**Şekil 4.14:** Naringenin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.10. Rozmarinik asit

Tablo 4.10: Rozmarinik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.2603
6.10×10^{-6}	0.5529
9.15×10^{-6}	0.8133
12.2×10^{-6}	1.1049

Doğru Denklemi : $A = 9.19 \times 10^4 c - 0.02$ $r=0.9997$

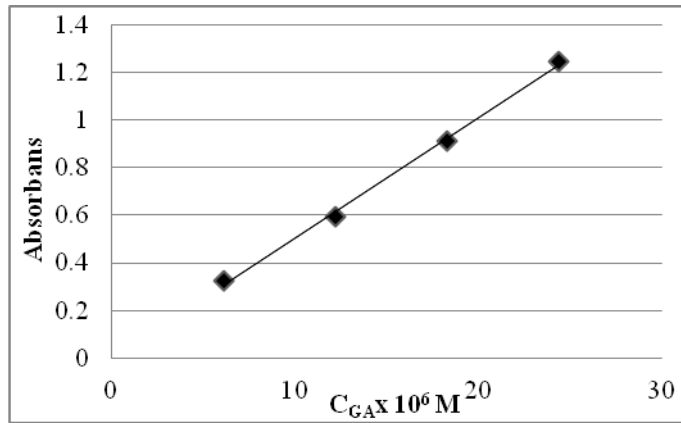
**Şekil 4.15:** Rozmarinik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.11. Gallik asit

Tablo 4.11: Kafeik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
6.10×10^{-6}	0.3224
12.20×10^{-6}	0.5965
18.30×10^{-6}	0.9135
24.40×10^{-6}	1.2458

Doğru Denklemi : $A = 5.06 \times 10^4 c + 0.01$ $r=0.9990$

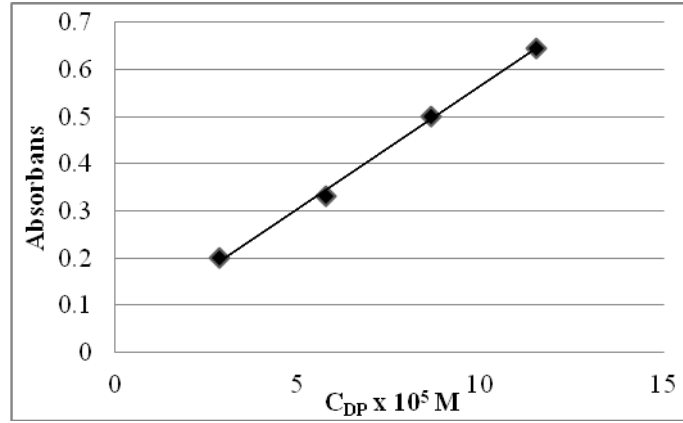
**Şekil 4.16:** Gallik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.12. Delfinidin

Tablo 4.12: Delfinidin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.88×10^{-6}	0.2005
5.76×10^{-6}	0.3303
8.64×10^{-6}	0.5015
11.52×10^{-6}	0.6453

Doğru Denklemi : $A = 5.22 \times 10^4 c + 0.04$ $r=0.9987$

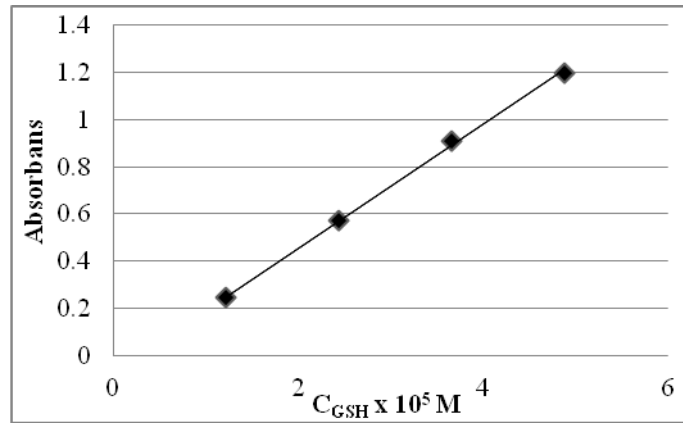
**Şekil 4.17:** Delfinidin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.13. Glutasyon

Tablo 4.13: Glutasyonun konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.21×10^{-6}	0.2456
2.42×10^{-6}	0.5706
3.63×10^{-6}	0.9107
4.84×10^{-6}	1.1958

Doğru Denklemi : $A = 2.61 \times 10^4 c - 0.07$ $r=0.9993$

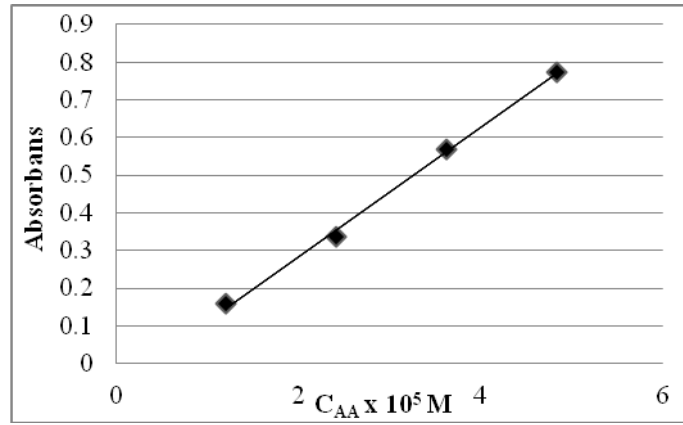
**Şekil 4.18:** Glutasyon bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.14. Askorbik asit

Tablo 4.14: Askorbik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
1.21×10^{-5}	0.1581
2.42×10^{-5}	0.3381
3.63×10^{-5}	0.5680
4.84×10^{-5}	0.7726

Doğru Denklemi : $A = 1.71 \times 10^4 c - 0.06$ $r=0.9989$

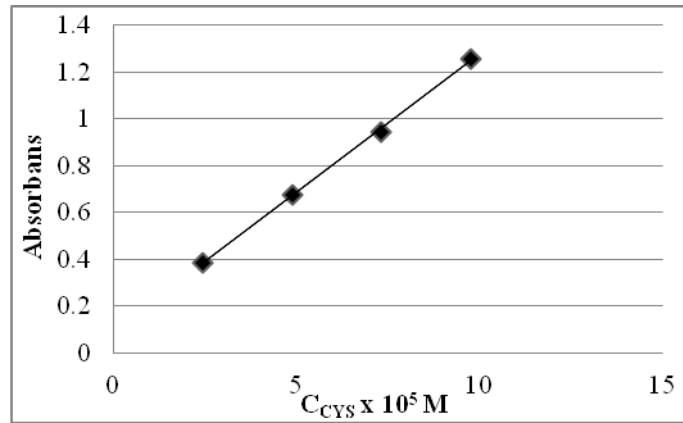
**Şekil 4.19:** Askorbik asit bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.15. Sistein

Tablo 4.15: Sisteinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-5}	0.3828
4.88×10^{-5}	0.6739
7.32×10^{-5}	0.9440
9.76×10^{-5}	1.3513

Doğru Denklemi : $A = 1.18 \times 10^4 c + 0.09$ $r=0.9996$

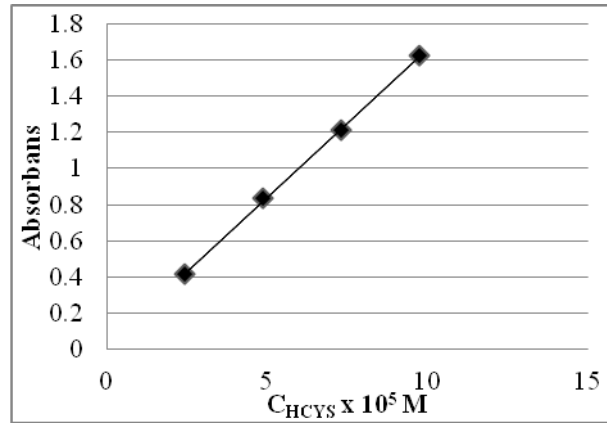
**Şekil 4.20:** Sistein bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.16. Homosistein

Tablo 4.16: Homosisteinin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
2.44×10^{-5}	0.4153
4.88×10^{-5}	0.8348
7.32×10^{-5}	1.2134
9.76×10^{-5}	1.6277

Doğru Denklemi : $A = 1.64 \times 10^4 c + 0.02$ $r=0.9998$

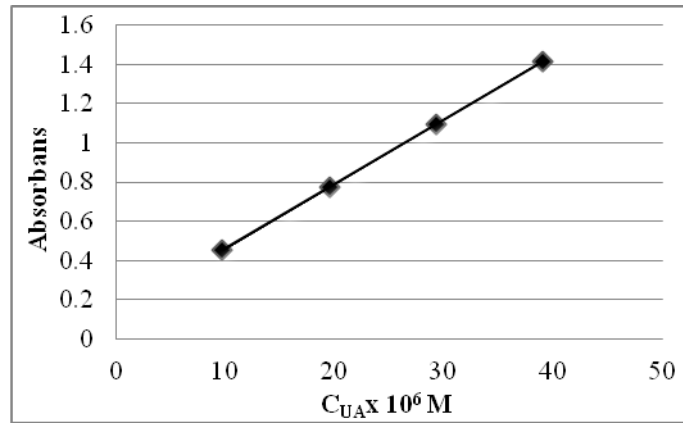
**Şekil 4.21:** Homosistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.17. Ürik asit

Tablo 4.17: Ürik asitin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemleri.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
9.76×10^{-6}	0.4511
19.52×10^{-6}	0.7732
29.28×10^{-6}	1.0922
39.04×10^{-6}	1.4173

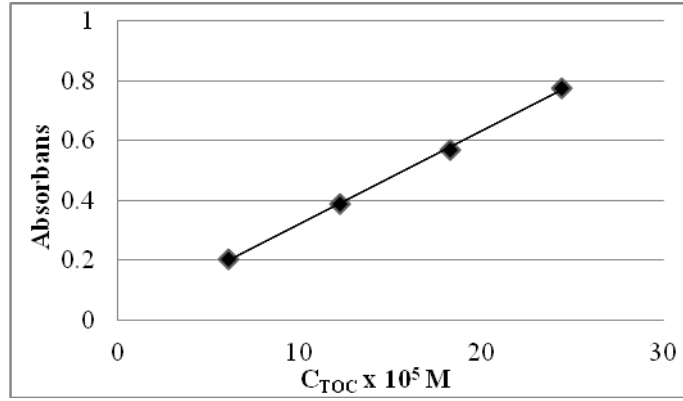
Doğru Denklemi : $A = 3.30 \times 10^4 c + 0.13$ $r=0.9999$

**Şekil 4.22:** Ürik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.18. *α*-tokoferol**Tablo 4.18:** *α*-tokoferolün konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
6.10×10^{-6}	0.2053
12.20×10^{-6}	0.3875
18.30×10^{-6}	0.5704
24.40×10^{-6}	0.7771

Doğru Denklemi : $A = 3.11 \times 10^4 c - 0.01$ $r=0.9995$

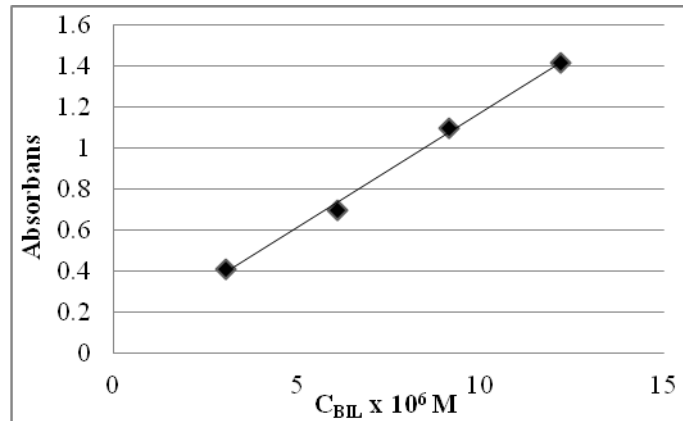
**Şekil 4.23:** *α*-tokoferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.1.3.19. Bilirubin

Tablo 4.19: Bilirubin konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Absorbans
3.05×10^{-6}	0.4115
6.10×10^{-6}	0.6950
9.15×10^{-6}	1.1001
12.20×10^{-6}	1.4180

Doğru Denklemi : $A = 1.10 \times 10^5 c + 0.08$ $r=0.9979$

**Şekil 4.24:** Bilirubin bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

Çalışılan antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ϵ), TEAC değerleri ve lineer çalışma aralıkları optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri bileşiklerin molar absorplama katsayılarının troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısına oranıdır (Tablo 4.20 ve 4.21).

Tablo 4.20: Gıda antioksidanlarının optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.

Gıda Antioksidanları	Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	TEAC (Sensör Esaslı CUPRAC)	TEAC (CUPRAC Yöntemi)
Kuersetin (QR)	$A = 9.88 \times 10^4 c + 0.02$ $r = 0.9989$	$3.52 \times 10^{-7} - 1.30 \times 10^{-5}$	4.12	4.38
Kateşin (CT)	$A = 4.61 \times 10^4 c + 0.05$ $r = 0.9999$	$1.30 \times 10^{-7} - 2.70 \times 10^{-5}$	1.92	3.09
Rutin (RT)	$A = 4.88 \times 10^4 c - 0.01$ $r = 0.9995$	$1.15 \times 10^{-6} - 2.72 \times 10^{-5}$	2.03	2.56
Kafeik Asit (CFA)	$A = 4.96 \times 10^4 c + 0.07$ $r = 0.9957$	$6.12 \times 10^{-8} - 2.51 \times 10^{-5}$	2.07	2.89
Fisetin (FS)	$A = 7.44 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9989$	$6.20 \times 10^{-8} - 2.05 \times 10^{-5}$	3.10	3.90
Morin (MR)	$A = 4.61 \times 10^4 c + 0.02$ $r = 0.9962$	$6.95 \times 10^{-7} - 2.77 \times 10^{-5}$	1.92	1.88
Naringin (N)	$A = 8.88 \times 10^3 c - 0.01$ $r = 0.9999$	$6.25 \times 10^{-6} - 1.48 \times 10^{-4}$	0.37	0.02
Kaemferol (KA)	$A = 2.95 \times 10^4 c + 0.11$ $r = 0.9998$	$1.35 \times 10^{-7} - 4.04 \times 10^{-5}$	1.23	1.58
Naringenin (NG)	$A = 1.46 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9999$	$3.05 \times 10^{-6} - 8.86 \times 10^{-5}$	0.61	0.05
Rozmarinik asit (RA)	$A = 9.19 \times 10^4 c - 0.02$ $r = 0.9997$	$7.14 \times 10^{-7} - 1.43 \times 10^{-5}$	3.83	5.30
Gallik asit (GA)	$A = 5.06 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9990$	$9.44 \times 10^{-7} - 2.56 \times 10^{-5}$	2.11	2.62
Delfinidin (DP)	$A = 5.22 \times 10^4 c + 0.04$ $r = 0.9987$	$1.34 \times 10^{-7} - 2.22 \times 10^{-5}$	2.18	2.38

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 4.37, F_{\text{kritik (tablo)}} = 4.84, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

Tablo 4.21: Plazma antioksidanlarının optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.

Plazma Antioksidanları	Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	TEAC (Sensör Esaslı CUPRAC)	TEAC (CUPRAC Yöntemi)
Glutasyon (GSH)	$A = 2.61 \times 10^4 c - 0.07$ $r = 0.9993$	$4.44 \times 10^{-6} - 5.23 \times 10^{-5}$	1.09	0.57
Askorbik asit (AA)	$A = 1.71 \times 10^4 c - 0.06$ $r = 0.9989$	$6.36 \times 10^{-6} - 7.93 \times 10^{-5}$	0.71	0.96
Sistein (CYS)	$A = 1.18 \times 10^4 c + 0.09$ $r = 0.9996$	$6,78 \times 10^{-7} - 1.02 \times 10^{-4}$	0.75	0.39
Homosistein (HCYS)	$A = 1.64 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9998$	$1.95 \times 10^{-6} - 7.82 \times 10^{-5}$	0.81	0.47
Ürik asit (UA)	$A = 3.30 \times 10^4 c + 0.13$ $r = 0.9999$	$1.51 \times 10^{-7} - 3.54 \times 10^{-5}$	1.38	0.96
α-tokoferol (TOC)	$A = 3.11 \times 10^4 c - 0.01$ $r = 0.9995$	$1.94 \times 10^{-6} - 4.21 \times 10^{-5}$	1.29	1.10
Bilirubin (BIL)	$A = 1.10 \times 10^5 c + 0.08$ $r = 0.9979$	$2.20 \times 10^{-8} - 1.11 \times 10^{-6}$	4.58	3.18

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 5.14$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 5.99$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

4.1.4. Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yönteminin Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımı

Yeşil çay özütüne yapılan antioksidan katkıları ve bu çözeltilerle optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile yapılan denemelerin sonuçları ışığında yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemelerde kullanılan antioksidan bileşiklerin yüzde geri kazanımları ve yüzde bağıl standart sapma (% RSD) verileri Tablo 4.22’de özetlenmiştir. Katkı yapılan standart antioksidan bileşiklerin optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak bireysel % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.22: Yeşil çay özütüne antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3).

Antioksidan		
Yeşil Çay Özütüne Kuersetin Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	3.05
	Bulunan Kons. (μM)	2.83
	SD	0.08
	RSD, %	3.16
	Geri Kazanım, %	92.79
Yeşil Çay Özütüne Askorbik Asit Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	24.23
	Bulunan Kons. (μM)	24.20
	SD	0.53
	RSD, %	2.19
	Geri Kazanım, %	99.87
Yeşil Çay Özütüne α -tokoferol Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	6.09
	Bulunan Kons. (μM)	6.08
	SD	0.39
	RSD, %	6.54
	Geri Kazanım, %	99.83

4.1.5. Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması ve Optik Sensör Esaslı CUPRAC Yöntemi Uygulanarak Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan TEAC Değerlerinin Karşılaştırılması

Belirli konsantrasyonlarda (1 mM) hazırlanan standart antioksidan bileşik çözeltilerinden farklı hacimlerde alınarak farklı kombinasyonlarda üçlü sentetik karışımlar oluşturulup optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve bulunan antioksidan kapasiteleri 4.2 ve 4.3 denklemleri kullanılarak hesaplanmış ve kapasite değerleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.23).

$$\text{Beklenen Kapasite} = \text{TEAC}_1 \cdot C_1 + \text{TEAC}_2 \cdot C_2 + \text{TEAC}_3 \cdot C_3 \quad (4.2)$$

$$\text{Bulunan Kapasite} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\epsilon_{\text{troloks}}} \times 10^3 \quad (4.3)$$

Tablo 4.23: Sentetik antioksidan karışımlarının beklenen ve bulunan troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri.

Sentetik Karışım	Beklenen Kapasite (mM TR)	Bulunan Kapasite (mM TR)
25µL 1 mM QR 50µL 1 mM GA 50µL 1 mM KA	4.25 x 10 ⁻²	(4.07 ± 0.30) x 10 ⁻²
60µL 1 mM MOR 50µL 1 mM TR 25µL 1 mM RA	3.18 x 10 ⁻²	(3.22 ± 0.19) x 10 ⁻²
25µL 1 mM QR 60µL 1 mM MOR 25µL 1 mM RA	3.82 x 10 ⁻²	(4.08 ± 0.13) x 10 ⁻²
50µL 1 mM GA 50µL 1 mM TR 50µL 1 mM KA	3.61 x 10 ⁻²	(3.50 ± 0.13) x 10 ⁻²

(i) Beklenen ve bulunan kapasite değerleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 0.01, F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, t₉₅ = 4.303).

4.2. OPTİK SENSÖR ESASLI CUPRAC YÖNTEMİNİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

4.2.1. Meyve Suyu Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi

Membran filtrelerden geçirilerek hazırlanmış meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mM TR) olarak, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.24 ve Şekil 4.25).

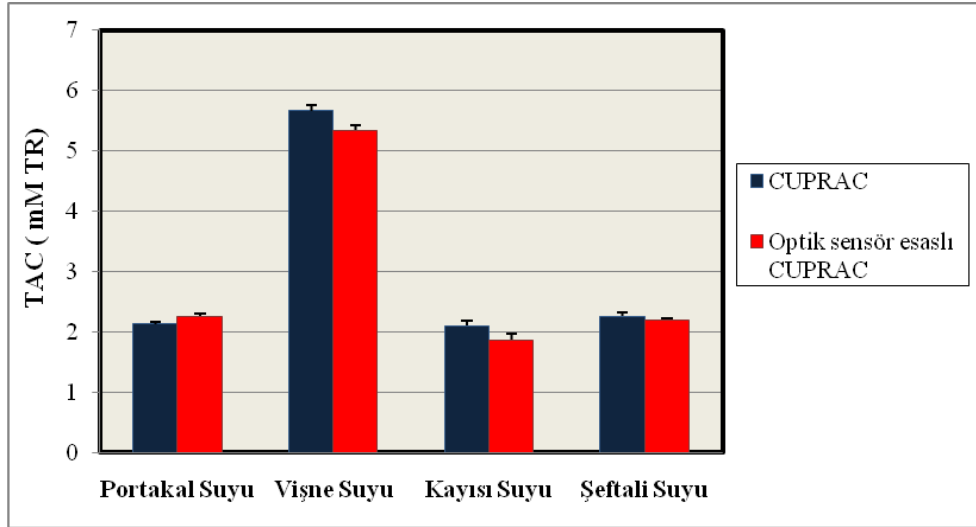
Tablo 4.24: Bazı meyve suyu örneklerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.

Meyve Suyu Örnekleri	CUPRAC (mM TR)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mM TR)
Portakal Suyu	2.13 ± 0.04	2.26 ± 0.04
Vişne Suyu	5.66 ± 0.10	5.34 ± 0.09
Kayısı Suyu	2.10 ± 0.08	1.87 ± 0.09
Şeftali Suyu	2.26 ± 0.07	2.20 ± 0.03

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 1.46, F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.71, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{95} = 4.303$).



Şekil 4.25: Bazı meyve suyu örneklerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.2.1. Meyve Posası Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi

4.2.1.1. Üzüm ve Yaban Mersini Posalarının Farklı pH'larda Hazırlanan Hidrolizatlarının Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Farklı pH'larda (pH 1, 4 ve 7) hazırlanan meyve posası hidrolizatlarının toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) olarak orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Üzüm Posası: Tablo 4.25 ve Şekil 4.26; Yaban Mersini Posası: Tablo 4.26 ve Şekil 4.27).

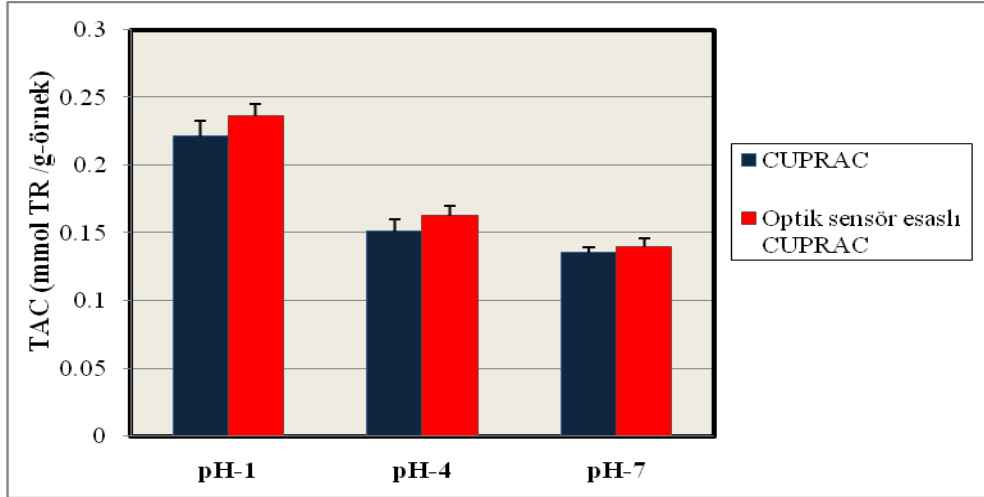
Tablo 4.25: Üzüm posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.

Üzüm Posası Hidrolizatları	CUPRAC (mmol TR /g-örnek)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mmol TR /g-örnek)
pH-1	0.222 ± 0.011	0.237 ± 0.009
pH-4	0.151 ± 0.009	0.163 ± 0.007
pH-7	0.135 ± 0.004	0.140 ± 0.006

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 0.52, F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



Şekil 4.26: Üzüm posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

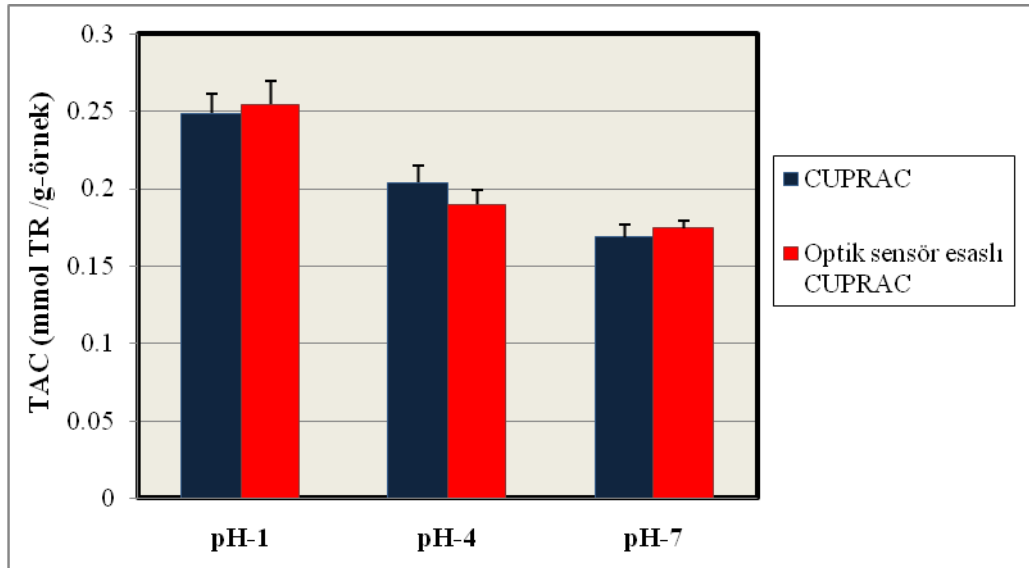
Tablo 4.26: Yaban mersini posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Yaban Mersini Posası Hidrolizatları	CUPRAC (mmol TR /g-örnek)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mmol TR /g-örnek)
pH-1	0.249 ± 0.013	0.255 ± 0.015
pH-4	0.204 ± 0.011	0.190 ± 0.009
pH-7	0.169 ± 0.008	0.175 ± 0.005

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 0.01, F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



Şekil 4.27: Yaban mersini posası hidrolizatlarının orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.2.1.2. Üzüm ve Yaban Mersini Posası Özütlerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Hazırlanan üzüm ve yaban mersini posası özütlerinin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) cinsinden orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.27 ve Şekil 4.28).

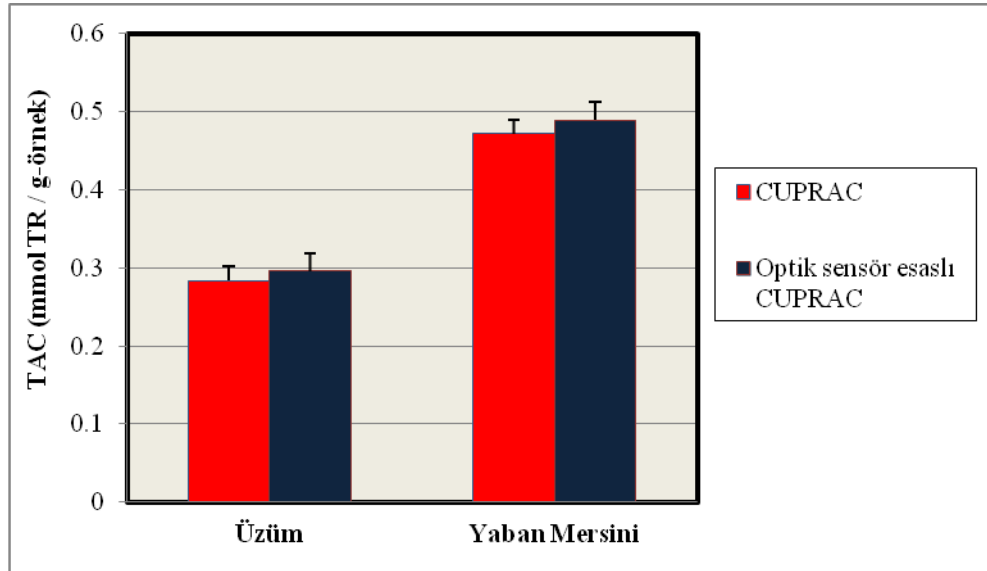
Tablo 4.27: Meyve posası özütlerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Meyve Posası Özütleri	CUPRAC (mmol TR /g-örnek)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mmol TR /g-örnek)
Üzüm	0.284 ± 0.019	0.296 ± 0.022
Yaban Mersini	0.472 ± 0.017	0.489 ± 0.024

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 33.64, F_{\text{kritik (tablo)}} = 161.40, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



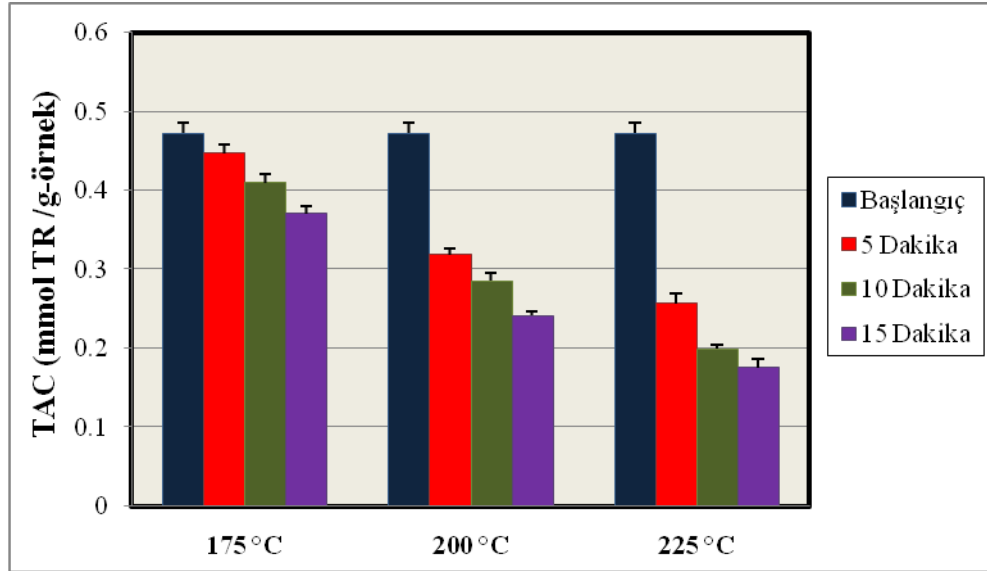
Şekil 4.28: Meyve posası özütlerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.2.1.3. Yaban Mersini Posasına Uygulanan Fırınlama İşleminin Toplam Antioksidan Kapasite Üzerine Etkisi

Yaban mersini posasından alınan örnekler üç farklı sıcaklıkta (175, 200 ve 225 °C) fırınlama işlemine tabi tutuldu. 5, 10 ve 15 dakika aralıklar ile fırında bekletilen posa örneklerinin özütleri hazırlandı ve TAC değerleri troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) cinsinden orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri uygulanarak belirlendi (orijinal CUPRAC yöntemi: Tablo 4.28 ve Şekil 4.29; optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi: Tablo 4.29 ve Şekil 4.30).

Tablo 4.28: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde orijinal CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerleri (N=3).

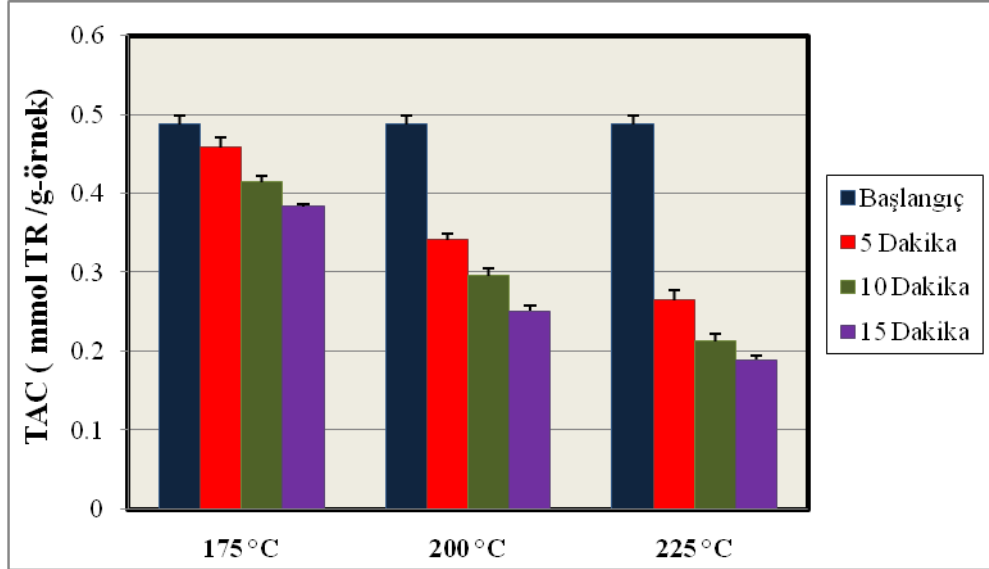
Fırınlama Süresi	CUPRAC Yöntemi (mmol TR /g-örnek)		
	175 °C	200 °C	225 °C
Başlangıç	0.472 ± 0.014	0.472 ± 0.014	0.472 ± 0.014
5 Dakika	0.447 ± 0.011	0.318 ± 0.009	0.257 ± 0.012
10 Dakika	0.409 ± 0.012	0.285 ± 0.010	0.199 ± 0.005
15 Dakika	0.371 ± 0.009	0.241 ± 0.005	0.175 ± 0.012



Şekil 4.29: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde orijinal CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi (N=3).

Tablo 4.29: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Fırınlama Süresi	Optik sensör esaslı CUPRAC Yöntemi (mmol TR /g-örnek)		
	175 °C	200 °C	225 °C
Başlangıç	0.488 ± 0.011	0.488 ± 0.011	0.488 ± 0.011
5 Dakika	0.459 ± 0.013	0.341 ± 0.008	0.265 ± 0.013
10 Dakika	0.414 ± 0.008	0.296 ± 0.010	0.213 ± 0.010
15 Dakika	0.384 ± 0.003	0.251 ± 0.007	0.189 ± 0.006



Şekil 4.30: Yaban mersini posasına uygulanan farklı fırınlama sıcaklıkları ve sürelerinde optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.2.3. Baharat Örneklerinin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi

Mikrodalga ekstraksiyon sistemi ile ekstrakte edilen baharat örnekleri membran filtrelerden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Baharat örneklerinin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) cinsinden belirlenmiştir (Tablo 4.30 ve Şekil 4.31).

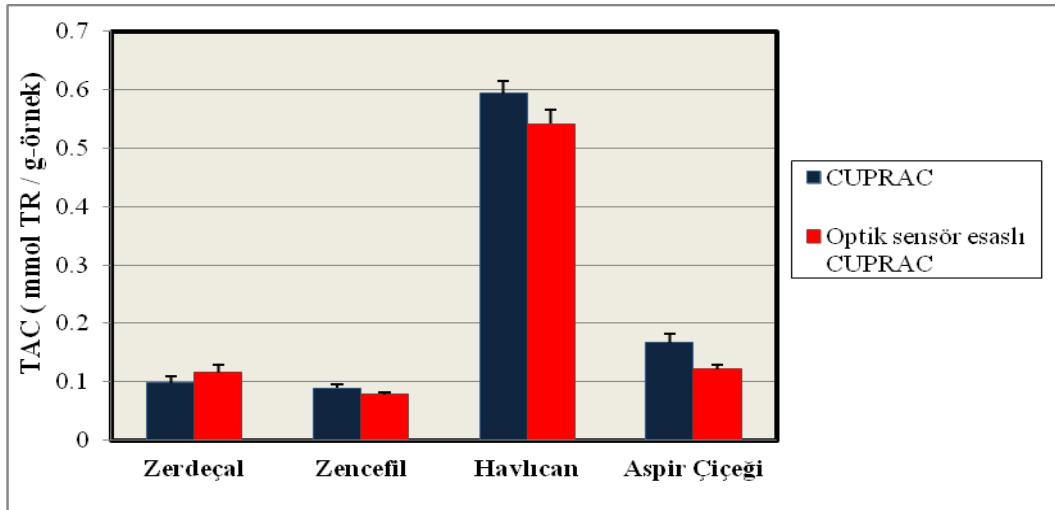
Tablo 4.30: Orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Baharat Örnekleri	CUPRAC (mmol TR / g-örnek)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mmol TR / g-örnek)
Zerdeçal	0.098 ± 0.011	0.116 ± 0.013
Zencefil	0.090 ± 0.007	0.079 ± 0.002
Havlıcan	0.593 ± 0.021	0.541 ± 0.024
Aspir Çiçeği	0.167 ± 0.015	0.121 ± 0.008

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

(P = 0.05 için $F_{\text{deneysel}} = 1.94$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} S}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{95} = 4.303$).



Şekil 4.31: Orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.2.4. Biyolojik Örneklerin Antioksidan Kapasitelerinin CUPRAC Antioksidan Sensörü ile Belirlenmesi

Hazırlanan biyolojik örneklerin (sıçan böbrek dokusu, sıçan karaciğer dokusu ve inek serumu) toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) cinsinden, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.31 ve Şekil 4.32).

Tablo 4.31: Bazı biyolojik örneklerin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Biyolojik Örnekler	CUPRAC (mM TR)	Optik sensör esaslı CUPRAC (mM TR)
SBD ^a	1.08 ± 0.02	0.96 ± 0.05
SKD ^b	1.44 ± 0.03	1.40 ± 0.02
İS ^c	0.97 ± 0.02	0.75 ± 0.01

^aSBD: Sıçan böbrek dokusu

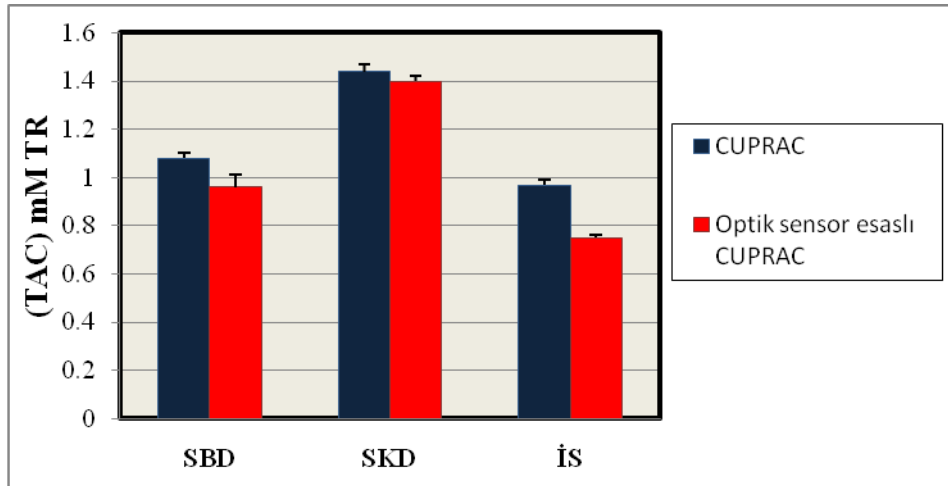
^bSKD: Sıçan karaciğer dokusu

^cİS: İnek serumu

(i) CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

(P = 0.05 için $F_{\text{deneysel}} = 5.92$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



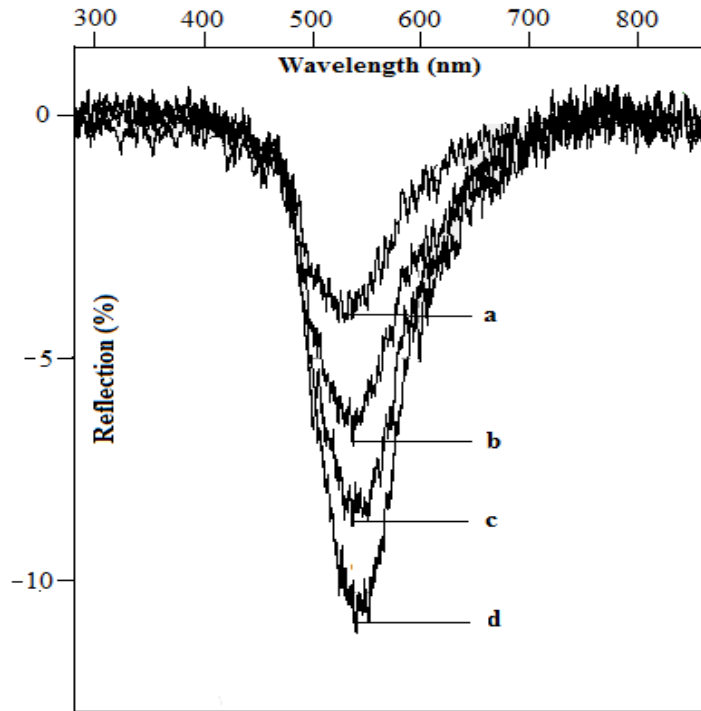
Şekil 4.32: Bazı biyolojik örneklerin orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.3. FİBER-OPTİK REFLEKTOMETRİK CUPRAC SENSÖRÜNÜN STANDART ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI

Tez kapsamında geliştirilen CUPRAC sensörünün reflektans özelliği araştırılarak fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü geliştirilmiştir. Sensörlerin reflektans (R_f) okumaları minyatür fiber-optik spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

4.3.1. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörünün Troloks Antioksidan Bileşiğine Uygulanması

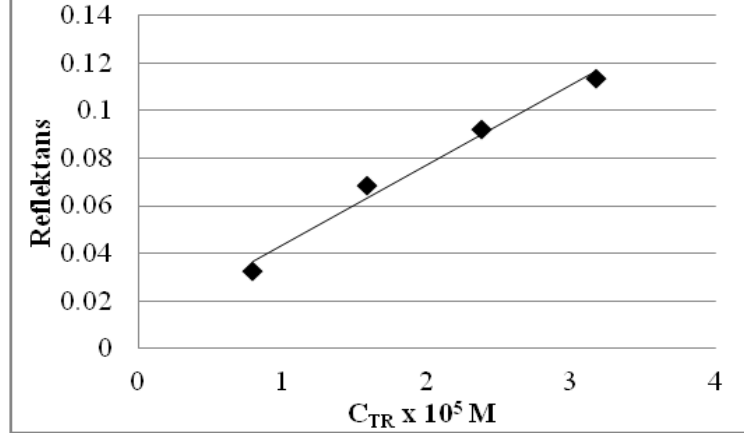
Geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü yönteminde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun 1.0×10^{-3} M standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile denemeler yapıldı. Yapılan denemeler sonucunda Şekil 4.33'te verilen reflektans spektrumunda görüldüğü gibi maksimum reflektans elde edilen dalgaboyu 530 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.33: Çeşitli konsantrasyonlarda (son konsantrasyon) troloks varlığında reflektometrik sensör üzerinde oluşan Cu(I)-Nc kelatininin görünür alan reflektans spektrumu ((a) 7.9 μ M (b) 15.8 μ M (c) 23.7 μ M (d) 31.6 μ M).

Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü farklı konsantrasyonlarda troloks çözeltilerine uygulanmıştır ve troloks bileşiğinin kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

Troloks bileşiminin kalibrasyon doğrusu oluşturularak elde edilen doğru denklemi $R_f = 3.40 \times 10^{-3} c + 0.01$ şeklindedir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34: Troloks bileşiminin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.

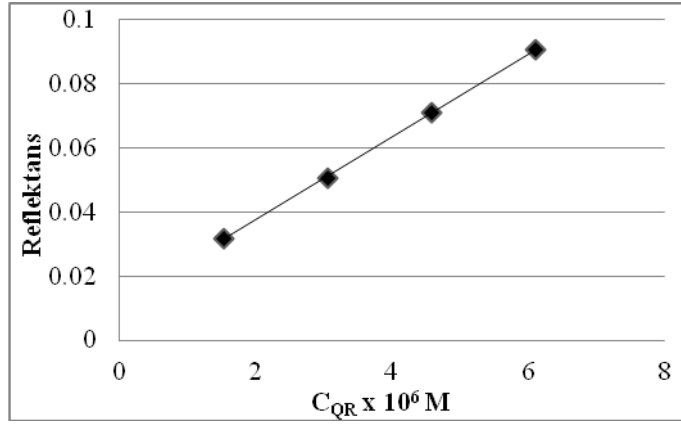
4.3.2. Standart Antioksidan Bileşiklerin Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması ve Doğru Denklemlerinin, Lineer Çalışma Aralıklarının ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

Gıda ve plazma örneklerinde zengince bulunan antioksidan bileşiklerinin (kuersetin, kateşin, rutin, kafeik asit, fisetin, morin, naringin, kaemferol, naringenin, rozmarinik asit, gallik asit, delfinidin, glutatyon, askorbik asit, sistein, homosistein, ürik asit, α -tokoferol, bilirubin) fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak molar konsantrasyon-reflektans değerleri arasında çizilen grafikler yardımıyla kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir.

4.3.2.1. Kuersetin

Tablo 4.32: Kuersetinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.52×10^{-6}	0.0317
3.04×10^{-6}	0.0506
4.56×10^{-6}	0.0709
6.08×10^{-6}	0.0907
Doğru Denklemi : $R_f=1.29 \times 10^4 c + 0.01$ $r=0.9999$	

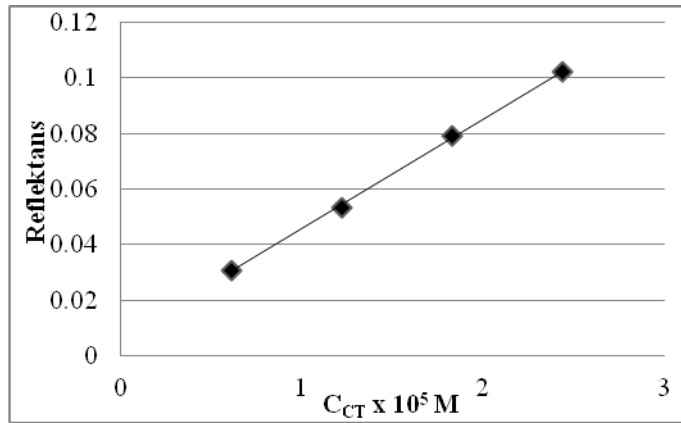


Şekil 4.35: Kuersetin bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.2. Kateşin

Tablo 4.33: Kateşinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
6.1×10^{-5}	0.0317
12.2×10^{-5}	0.0506
18.3×10^{-5}	0.0709
24.4×10^{-5}	0.0907
Doğru Denklemi : $R_f=3.94 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9998$	

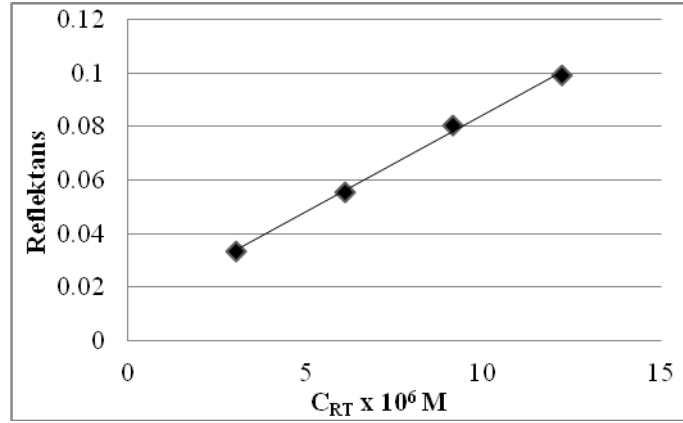


Şekil 4.36: Kateşin bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.3. Rutin

Tablo 4.34: Rutinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

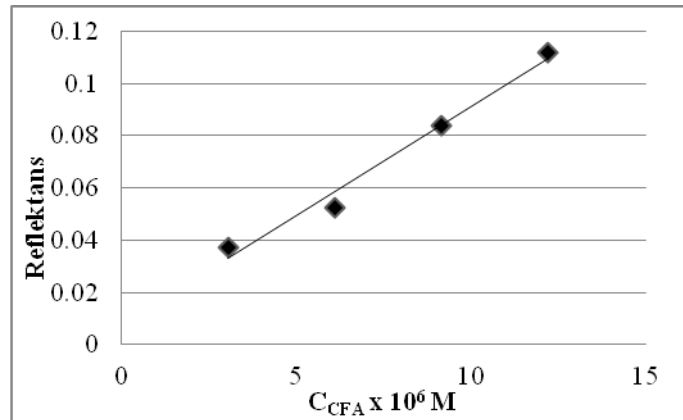
Konsantrasyon (M)	Reflektans
3.05×10^{-6}	0.0334
6.10×10^{-6}	0.0556
9.15×10^{-6}	0.0807
12.20×10^{-6}	0.0991
Doğru Denklemi : $R_t=7.28 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9983$	

**Şekil 4.37:** Rutin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.4. Kafeik asit

Tablo 4.35: Kafeik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

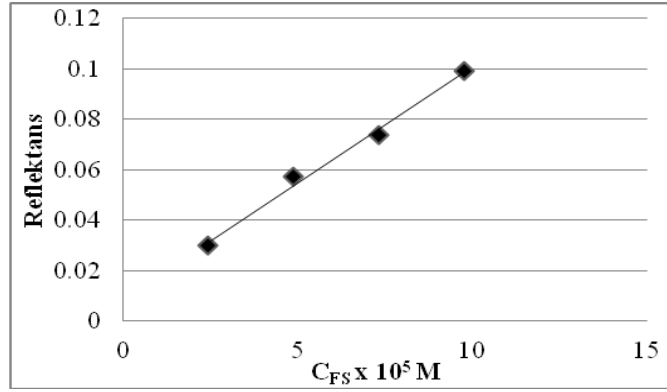
Konsantrasyon (M)	Reflektans
3.05×10^{-6}	0.0373
6.10×10^{-6}	0.0527
9.15×10^{-6}	0.0841
12.20×10^{-6}	0.1118
Doğru Denklemi : $R_t=8.36 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9914$	

**Şekil 4.38:** Kafeik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.5. Fisetin

Tablo 4.36: Fisetinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

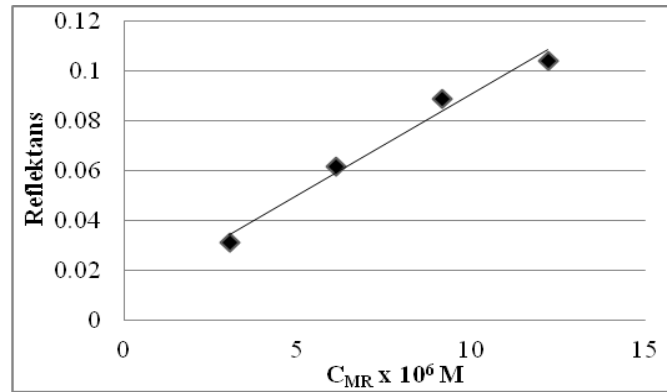
Konsantrasyon (M)	Reflektans
2.44×10^{-5}	0.0298
4.88×10^{-5}	0.0571
7.32×10^{-5}	0.0735
9.76×10^{-5}	0.0991
Doğru Denklemi : $R_f=9.19 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9979$	

**Şekil 4.39:** Fisetin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.6. Morin

Tablo 4.37: Morinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
3.05×10^{-5}	0.0310
6.10×10^{-5}	0.0615
9.15×10^{-5}	0.0888
12.20×10^{-5}	0.1042
Doğru Denklemi : $R_M=8.09 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9914$	

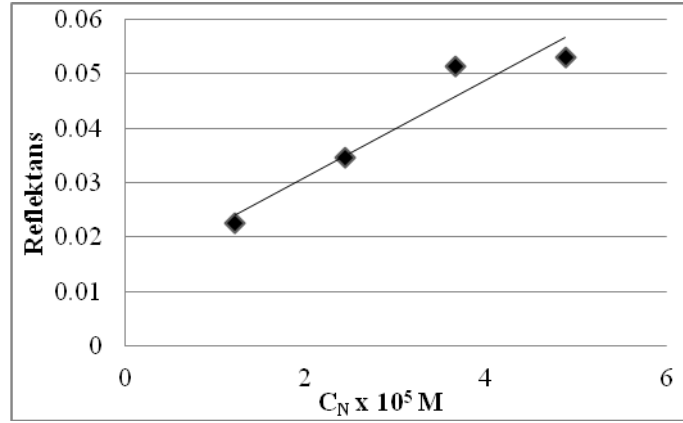
**Şekil 4.40:** Morin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.7. Naringin

Tablo 4.38: Naringinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0225
2.44×10^{-5}	0.0345
3.66×10^{-5}	0.0515
4.88×10^{-5}	0.0531

Doğru Denklemi : $R_f=0.81 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9619$

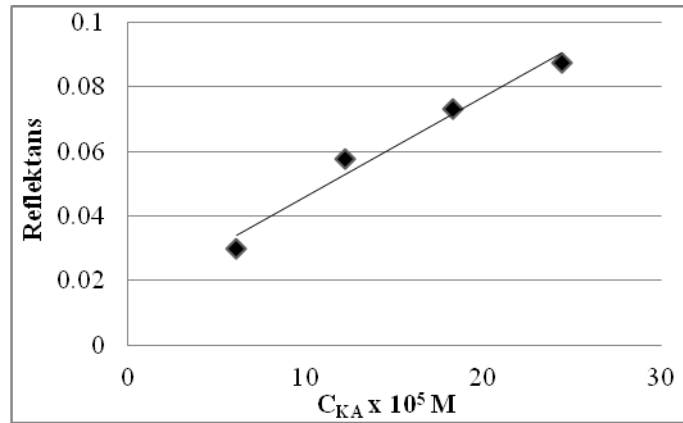
**Şekil 4.41:** Naringin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.8. Kaemferol

Tablo 4.39: Kaemferolün konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
6.10×10^{-5}	0.0299
12.20×10^{-5}	0.0579
18.30×10^{-5}	0.0733
24.40×10^{-5}	0.0875

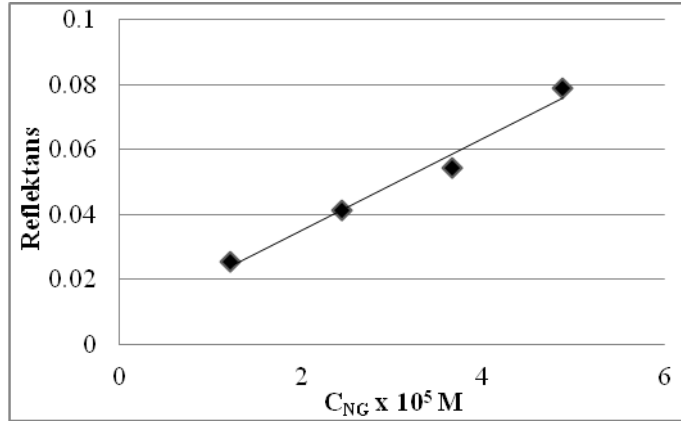
Doğru Denklemi : $R_f=3.10 \times 10^3 c + 0.02$ $r=0.9851$

**Şekil 4.42:** Kaemferol bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.9. Naringenin

Tablo 4.40: Naringenin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0252
2.44×10^{-5}	0.0414
3.66×10^{-5}	0.0543
4.88×10^{-5}	0.0788
Doğru Denklemi : $R_f=1.42 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9908$	

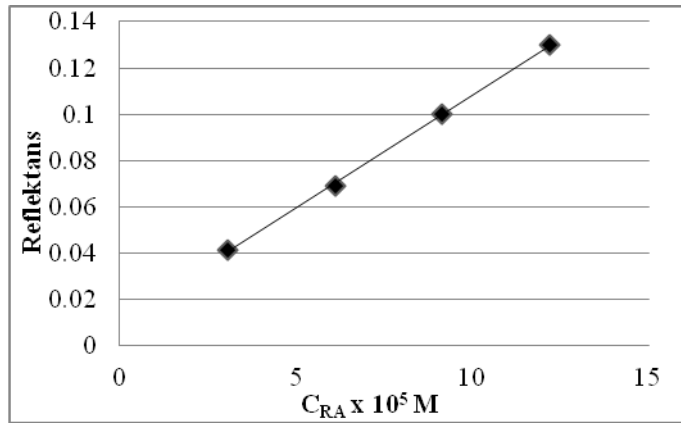


Şekil 4.43: Naringenin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.10. Rozmarinik asit

Tablo 4.41: Rozmarinik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
3.05×10^{-5}	0.0412
6.10×10^{-5}	0.0692
9.15×10^{-5}	0.0998
12.20×10^{-5}	0.1299
Doğru Denklemi : $R_f=9.73 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9998$	

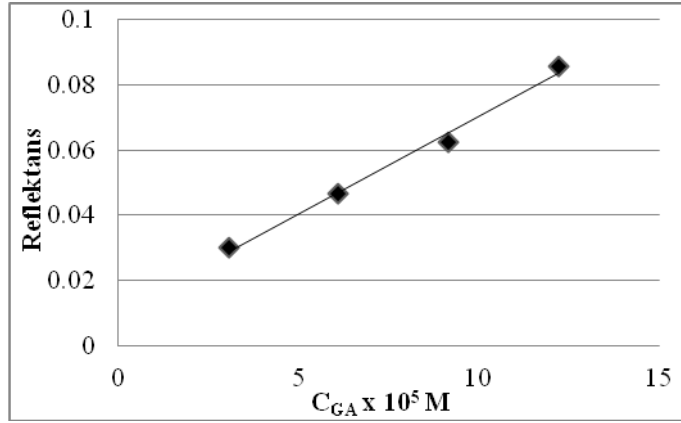


Şekil 4.44: Rosmarinik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.11. Gallik asit

Tablo 4.42: Gallik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

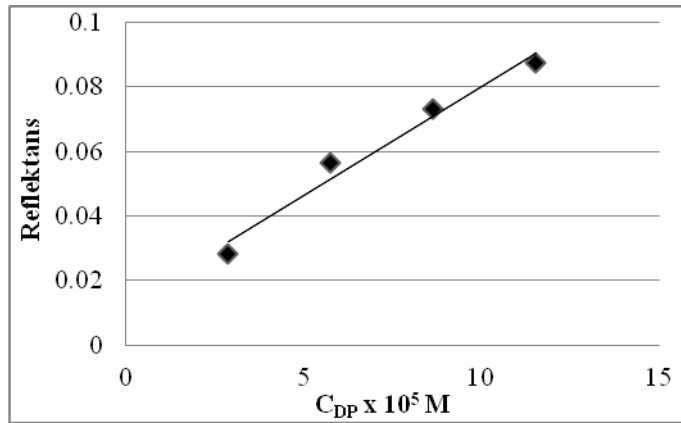
Konsantrasyon (M)	Reflektans
3.05×10^{-5}	0.0301
6.10×10^{-5}	0.0466
9.15×10^{-5}	0.0623
12.20×10^{-5}	0.0857
Doğru Denklemi : $R_f=5.99 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9953$	

**Şekil 4.45:** Gallik asit bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.12. Delfinidin

Tablo 4.43: Delfinidin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

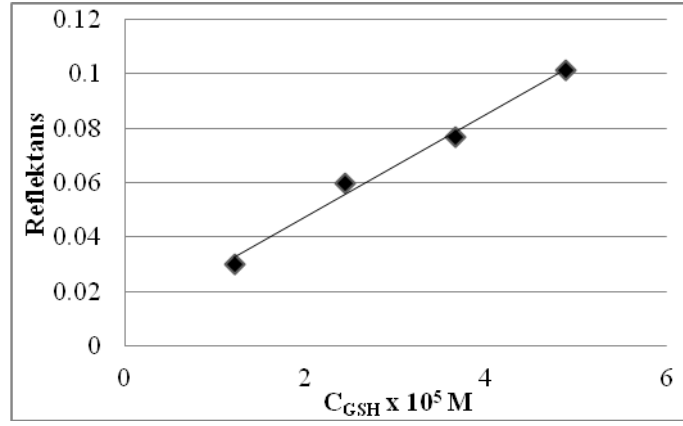
Konsantrasyon (M)	Reflektans
2.88×10^{-5}	0.0282
5.76×10^{-5}	0.0564
8.64×10^{-5}	0.0733
11.52×10^{-5}	0.0885
Doğru Denklemi : $R_f=6.9 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9882$	

**Şekil 4.46:** Delfinidin bileşinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.13. Glutasyon

Tablo 4.44: Glutasyonun konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemleri.

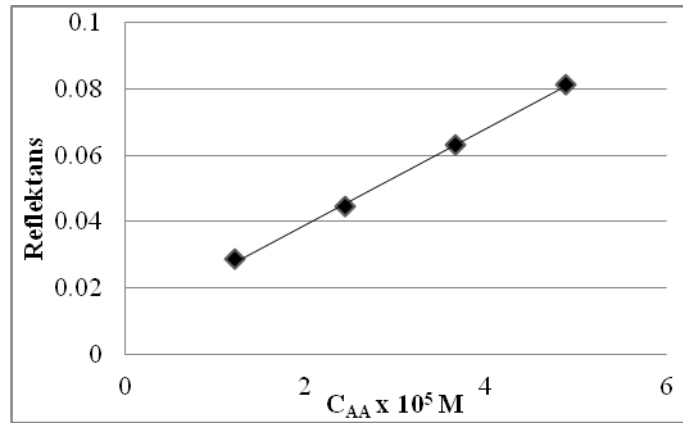
Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0301
2.44×10^{-5}	0.0597
3.66×10^{-5}	0.0767
4.88×10^{-5}	0.1012
Doğru Denklemi : $R_f=1.89 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9950$	

**Şekil 4.47:** Glutasyon bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.14. Askorbik asit

Tablo 4.45: Askorbik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemleri.

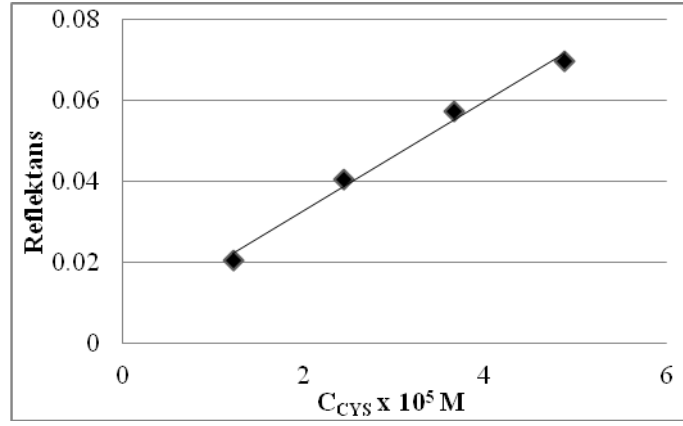
Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0286
2.44×10^{-5}	0.0447
3.66×10^{-5}	0.0630
4.88×10^{-5}	0.0812
Doğru Denklemi : $R_f=1.44 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9995$	

**Şekil 4.48:** Askorbik asit bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.15. Sistein

Tablo 4.46: Sisteinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

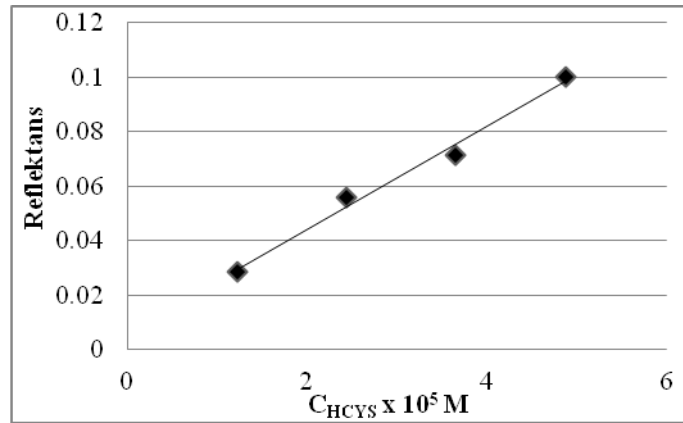
Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0204
2.44×10^{-5}	0.0406
3.66×10^{-5}	0.0573
4.88×10^{-5}	0.0698
Doğru Denklemi : $R_f=1.35 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9946$	

**Şekil 4.49:** Sistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.16. Homosistein

Tablo 4.47: Homosisteinin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

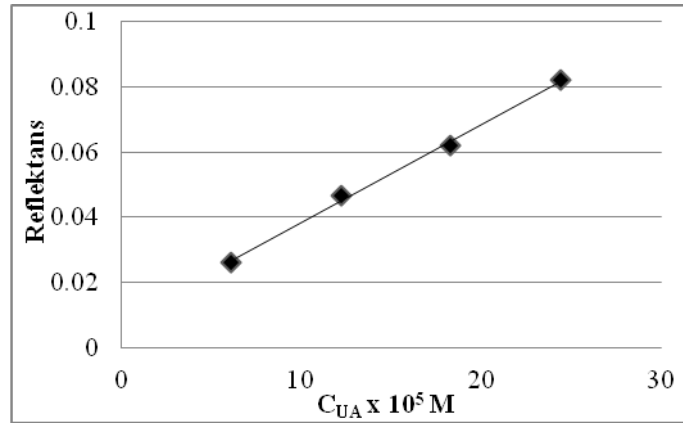
Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.22×10^{-5}	0.0285
2.44×10^{-5}	0.0558
3.66×10^{-5}	0.0712
4.88×10^{-5}	0.1001
Doğru Denklemi : $R_f=1.89 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9938$	

**Şekil 4.50:** Homosistein bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

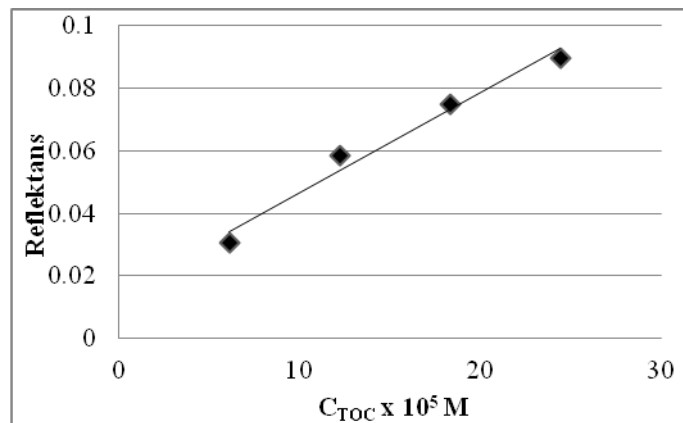
4.3.2.17. Ürik asit

Tablo 4.48: Ürik asitin konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
6.10×10^{-5}	0.0262
12.20×10^{-5}	0.0468
18.30×10^{-5}	0.0620
24.40×10^{-5}	0.0821
Doğru Denklemi : $R_f=3.00 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9984$	

**Şekil 4.51:** Ürik asit bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.4.3.2.18. α -tokoferol**Tablo 4.49:** α -tokoferolün konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
6.10×10^{-5}	0.0305
12.20×10^{-5}	0.0584
18.30×10^{-5}	0.0750
24.40×10^{-5}	0.0898
Doğru Denklemi : $R_f=3.19 \times 10^3 c + 0.01$ $r=0.9877$	

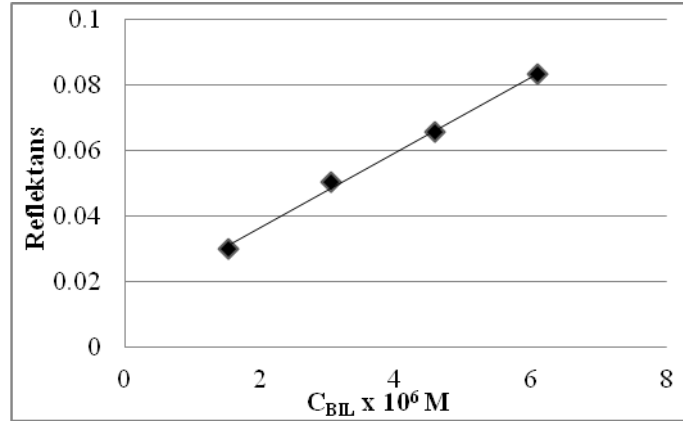
**Şekil 4.52:** α -tokoferol bileşiğinin kalibrasyon eğrisi.

4.3.2.19. Bilirubin

Tablo 4.50: Bilirubinün konsantrasyon-reflektans değerleri ve doğru denklemi.

Konsantrasyon (M)	Reflektans
1.52×10^{-6}	0.0301
3.04×10^{-6}	0.0506
4.56×10^{-6}	0.0656
6.08×10^{-6}	0.0834

Doğru Denklemi : $R_f = 1.15 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9982$

**Şekil 4.53:** Bilirubin bileşiminin kalibrasyon eğrisi.

Çalışılan antioksidan bileşiklerin eğim değerleri (m), TEAC değerleri ve lineer çalışma aralıkları fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör yöntemine göre molar konsantrasyon-reflektans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri bileşiklerin kalibrasyon doğru denklemlerinden elde edilen eğim değerlerinin troloks bileşiminin eğim değerine oranıdır (Tablo 4.51 ve 4.52).

Tablo 4.51: Gıda antioksidanlarının fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.

Gıda Antioksidanları	Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	TEAC (Reflektometrik CUPRAC)	TEAC (CUPRAC Yöntemi)
Kuersetin (QR)	$R_f = 1.29 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9999$	$3.10 \times 10^{-7} - 1.46 \times 10^{-5}$	3.79	4.38
Kateşin (CT)	$R_f = 3.94 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9998$	$2.28 \times 10^{-6} - 4.92 \times 10^{-5}$	1.16	3.09
Rutin (RT)	$R_f = 7.28 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9983$	$5.49 \times 10^{-7} - 2.60 \times 10^{-5}$	2.14	2.56
Kafeik Asit (CFA)	$R_f = 8.36 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9914$	$9.57 \times 10^{-7} - 2.31 \times 10^{-5}$	2.46	2.89
Fisetin (FS)	$R_f = 9.19 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9979$	$7.62 \times 10^{-7} - 2.09 \times 10^{-5}$	2.70	3.90
Morin (MR)	$R_f = 8.09 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9914$	$7.42 \times 10^{-7} - 2.36 \times 10^{-5}$	2.38	1.88
Naringin (N)	$R_f = 0.81 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9619$	$2.47 \times 10^{-6} - 2.31 \times 10^{-4}$	0.24	0.02
Kaemferol (KA)	$R_f = 3.10 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9851$	$3.23 \times 10^{-7} - 5.97 \times 10^{-5}$	0.91	1.58
Naringenin (NG)	$R_f = 1.42 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9908$	$6.34 \times 10^{-8} - 1.37 \times 10^{-4}$	0.42	0.05
Rozmarinik asit (RA)	$R_f = 9.73 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9998$	$5.14 \times 10^{-7} - 1.95 \times 10^{-5}$	2.86	5.30
Gallik asit (GA)	$R_f = 5.99 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9953$	$8.35 \times 10^{-7} - 3.17 \times 10^{-5}$	1.76	2.62
Delfinidin (DP)	$R_f = 6.90 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9882$	$2.94 \times 10^{-7} - 1.57 \times 10^{-5}$	2.03	2.38

(i) CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır. ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 4.52$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 4.84$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

Tablo 4.52: Plazma antioksidanlarının fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen doğru denklemleri, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.

Plazma Antioksidanları	Doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları	Lineer Aralıklar (M)	TEAC (Reflektometrik CUPRAC)	TEAC (CUPRAC Yöntemi)
Glutasyon (GSH)	$R_f = 1.89 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9950$	$3.17 \times 10^{-6} - 1.01 \times 10^{-4}$	0.56	0.58
Askorbik asit (AA)	$R_f = 1.44 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9995$	$3.47 \times 10^{-6} - 1.32 \times 10^{-4}$	0.42	0.96
Sistein (CYS)	$R_f = 1.35 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9946$	$7.41 \times 10^{-6} - 1.44 \times 10^{-4}$	0.40	0.39
Homosistein (HCYS)	$R_f = 1.89 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9938$	$4.76 \times 10^{-6} - 1.06 \times 10^{-5}$	0.56	0.47
Ürik asit (UA)	$R_f = 3.00 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9984$	$2.33 \times 10^{-6} - 6.40 \times 10^{-5}$	0.88	0.96
α -tokoferol (TOC)	$R_f = 3.19 \times 10^3 c + 0.01$ $r = 0.9877$	$3.13 \times 10^{-7} - 5.83 \times 10^{-5}$	0.94	1.10
Bilirubin (BIL)	$R_f = 1.15 \times 10^4 c + 0.01$ $r = 0.9982$	$1.74 \times 10^{-6} - 1.63 \times 10^{-4}$	3.38	3.18

(i) CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır. ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 0.64$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 5.99$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

4.3.3. Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörünün Tekrarlanabilirliği ve Geri Kazanımı

Yeşil çay özütüne yapılan antioksidan katkıları ve bu çözeltilerin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile yapılan denemelerin sonuçları ışığında yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemelerde kullanılan antioksidan bileşiklerin yüzde geri kazanımları ve yüzde bağıl standart sapma (% RSD) verileri Tablo 4.53'te özetlenmektedir. Katkı yapılan standart antioksidan bileşiklerin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak bireysel % geri kazanımları hesaplanmıştır.

Tablo 4.53: Yeşil çay özütüne antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3).

Antioksidan		
Yeşil Çay Özütüne Kuersetin Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	2.44
	Bulunan Kons. (μM)	2.28
	SD	0.05
	RSD, %	2.21
	Geri Kazanım, %	93.40
Yeşil Çay Özütüne Askorbik Asit Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	12.20
	Bulunan Kons. (μM)	11.20
	SD	0.56
	RSD, %	4.97
	Geri Kazanım, %	91.83
Yeşil Çay Özütüne α -tokoferol Katkısı	Eklenen Kons. (μM)	6.10
	Bulunan Kons. (μM)	5.58
	SD	0.26
	RSD, %	4.58
	Geri Kazanım, %	91.47

4.3.4. Üçlü Sentetik Karışımların Hazırlanması ve Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Teorik Olarak Beklenen ve Deneysel Olarak Bulunan TEAC Değerlerinin Karşılaştırılması

Belirli konsantrasyonlarda (1 veya 2 mM) hazırlanan standart antioksidan bileşik çözeltilerinden değişik hacimlerde alınarak farklı kombinasyonlarda üçlü sentetik karışımlar oluşturulup fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü yöntemine göre mM troloks (TR) cinsinden beklenen ve bulunan antioksidan kapasiteleri 4.4 ve 4.5 denklemleri kullanılarak hesaplanmış ve kapasite değerleri birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.54).

$$\text{Beklenen Kapasite} = \text{TEAC}_1 \cdot C_1 + \text{TEAC}_2 \cdot C_2 + \text{TEAC}_3 \cdot C_3 \quad (4.4)$$

$$\text{Bulunan Kapasite} = \frac{\text{Reflektans (toplam)} \pm \text{kayım}}{m_{\text{troloks}}} \times 10^3 \quad (4.5)$$

Tablo 4.54: Sentetik karışımların beklenen ve bulunan troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri.

Sentetik Karışım	Beklenen Kapasite (mM TR)	Bulunan Kapasite (mM TR)
50µL 1mM TOC 25µL 1mM RA 20µL 1mM QR	2.37 x 10 ⁻²	(2.20 ± 0.15) x 10 ⁻²
50µL 1mM UA 25µL 2mM GA 20µL 1mM QR	2.54 x 10 ⁻²	(2.45 ± 0.11) x 10 ⁻²
50µL 1mM UA 25µL 1mM BIL 100µL 1mM AA	2.08 x 10 ⁻²	(2.04 ± 0.27) x 10 ⁻²
25µL 2mM GA 100µL 1mM AA 25µL 1mM RA	2.46 x 10 ⁻²	(2.40 ± 0.17) x 10 ⁻²

(i) Beklenen ve bulunan kapasite değerleri ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır.

$$(P = 0.05 \text{ için } F_{\text{deneysel}} = 2.35, F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13, F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}})$$

(ii) Bulgular $\mu = \bar{X} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, t₉₅ = 4.303).

4.4. FİBER-OPTİK REFLEKTOMETRİK CUPRAC SENSÖRÜNÜN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

4.4.1. Meyve Suyu Örneklerinin Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

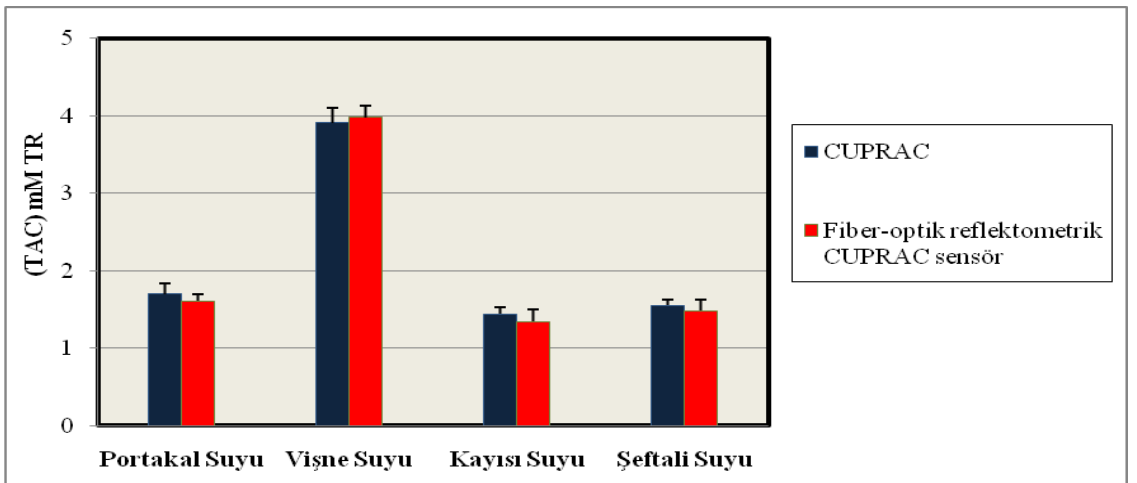
Membran filtrelerden geçirilerek hazırlanmış meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mM TR) cinsinden orijinal CUPRAC ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.55 ve Şekil 4.54).

Tablo 4.55: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı meyve suyu örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Meyve Suyu Örnekleri	CUPRAC (mM TR)	Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör (mM TR)
Portakal Suyu	1.70 ± 0.09	1.61 ± 0.13
Vişne Suyu	3.91 ± 0.14	3.98 ± 0.19
Kayısı Suyu	1.44 ± 0.16	1.34 ± 0.19
Şeftali Suyu	1.55 ± 0.14	1.48 ± 0.08

(i) CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır. (P = 0.05 için $F_{\text{deneysel}} = 1.43$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



Şekil 4.54: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı meyve suyu örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.4.2. Baharat Örneklerinin Fiber-Optik Reflektans CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

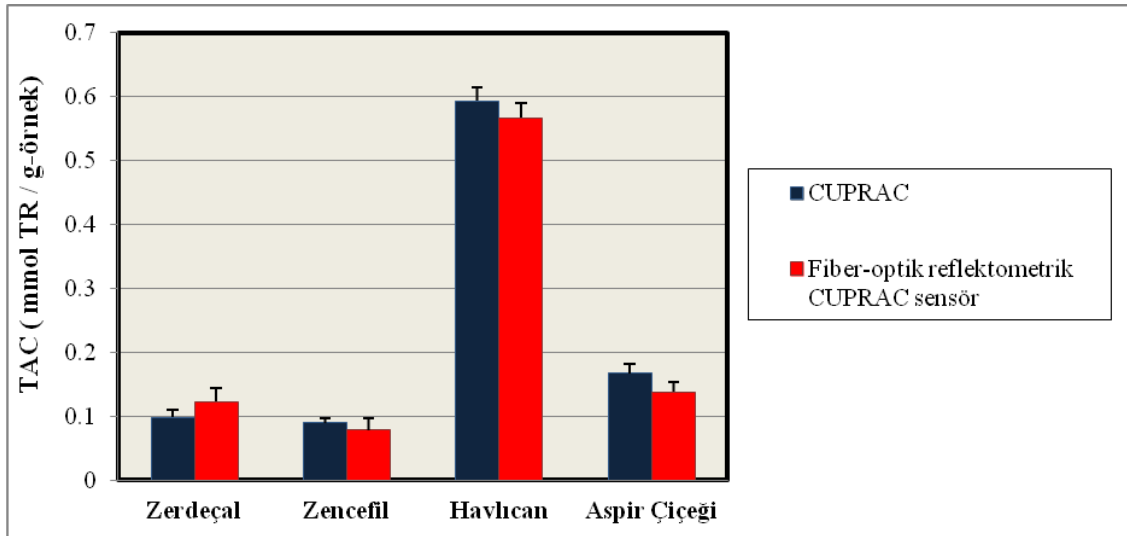
Mikrodalga ekstraksiyon sistemi ile ekstrakte edilen baharat örnekleri membran filtrelerden geçirilerek analize hazır hale getirilmiştir. Baharat örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mmol TR/g-örnek) cinsinden orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.56 ve Şekil 4.55).

Tablo 4.56: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Baharat Örnekleri	CUPRAC (mmol TR / g-örnek)	Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör (mmol TR / g-örnek)
Zerdeçal	0.098 ± 0.011	0.123 ± 0.022
Zencefil	0.090 ± 0.007	0.079 ± 0.017
Havlıcan	0.593 ± 0.021	0.567 ± 0.023
Aspir Çiçeği	0.167 ± 0.015	0.138 ± 0.016

(i) CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır. ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 0.06$., $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

(ii) Bulgular $\mu = \bar{X} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).



Şekil 4.55: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı baharat örneklerinin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi.

4.4.3. Biyolojik Örneklerin Fiber-Optik Reflektans CUPRAC Sensörü ile Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Hazırlanan biyolojik örneklerin (sıçan böbrek dokusu, sıçan karaciğer dokusu ve inek serumu) toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri (mM TR) cinsinden orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.57 ve Şekil 4.56).

Tablo 4.57: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı biyolojik örneklerin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri (N=3).

Biyolojik Örnekler	CUPRAC (mM TR)	Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör (mM TR)
SBD ^a	1.11 ± 0.03	0.91 ± 0.06
SKD ^b	1.28 ± 0.01	1.30 ± 0.01
İS ^c	1.01 ± 0.02	0.82 ± 0.04

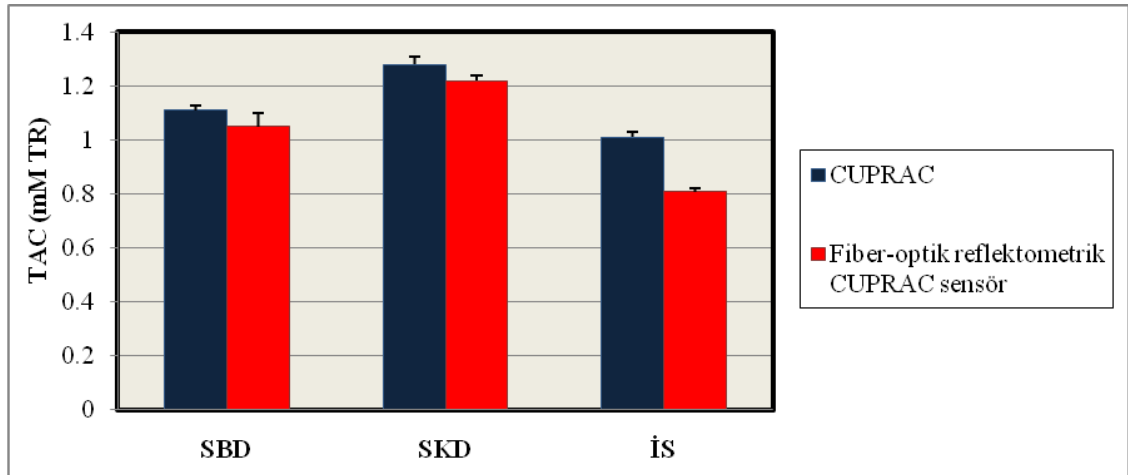
^aSBD: Sıçan böbrek dokusu

^bSKD: Sıçan karaciğer dokusu

^cİS: İnek serumu

(i) CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör ANOVA testine göre karşılaştırılmıştır. (P = 0.05 için $F_{\text{deneysel}} = 2.96$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$)

(ii) Bulgular $\mu = \bar{x} \pm \frac{t_{\alpha} s}{\sqrt{N}}$ denkleminde hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).

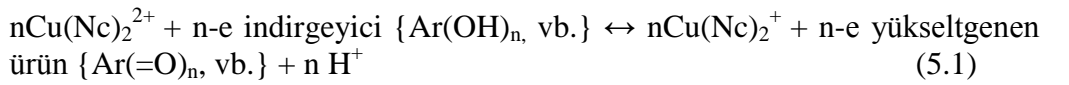


Şekil 4.56: Orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile bazı biyolojik örneklerin belirlenen toplam antioksidan kapasite değerlerinin bar diyagram ile gösterimi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda daha önce 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' olarak adlandırılmış ve kısaca CUPRAC Yöntemi [8] olarak dünya literatürüne kazandırılmış olan antioksidan kapasite tayin yöntemi, spektrofotometrik yolla antioksidan bileşiklerin kapasitelerinin tayin edilmesinde kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında, besin özütlerinde ve serum, doku homojenizatı gibi biyolojik örneklerde toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için CUPRAC yöntemi temel alınarak yeni moleküler spektroskopik sensörler geliştirilmiştir. Günümüzde antioksidanların sensörler kullanılarak hızlı ve düşük maliyetli tayinleri büyük önem kazanmaktadır. Optik sensörler minyatürize edilebilmeleri ve esneklikleri gibi birçok avantajları nedeniyle yerinde tayin amacıyla elverişli materyaller olarak kullanılmaktadırlar. Optik sensörler arasında görünür alanda ışık absorpsiyonuna dayanan kolorimetrik sensörler en basit ve hızlı tayine elverişli türlerdir. Elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde çalışan optik sensörler UV alanda bitki pigmentlerinden gelebilecek olası interferanslardan etkilenmezler. Tez çalışması kapsamında geliştirilen optik sensörler ile elde edilen sonuçlar referans yöntem olarak seçilen orijinal CUPRAC yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi, polifenollerle (Ar(OH)_n) aşağıdaki reaksiyonu vermektedir:



Bu reaksiyonda, polifenollerin uygun konumlanmış reaktif Ar-OH grupları karşılık olan kinon bileşiklerine dönüşürken, Cu(II)-Nc ise 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren Cu(I)-Nc kelatına dönüşmektedir. Cu(I)-Nc, yüksek molar absorbtiviteli bir yük-transfer kompleksidir.

Tez çalışmasında CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifi Nafyon (C₇HF₁₃O₅S. C₂F₄) olarak bilinen tetrafloroetilenin sülfolanmasıyla oluşturulmuş kopolimer üzerine tutturularak yeni moleküler spektroskopik sensörler

geliştirilmiştir. Sensör üretiminde sıklıkla kullanılan Nafyon, iyonomer olarak adlandırılan iyonik özelliğe sahip ilk sentetik polimerdir. Nafyonun benzersiz iyonik özellikleri sülfonat grubuyla sona eren perflorovinil eter gruplarının tetrafloroetilen (Teflon) iskeletine birleştirilmesinin sonucudur [68]. Nafyon, hem lipofilik ligandların tutturulmasında hem de iyonik türlerin değiştirilmesinde hidrofobik ve hidrofilik yapısından dolayı uygun şartları sağlamaktadır. Nafyon membranlar UV-Vis-NR bölgesinde oldukça saydamdır ve florokarbon zincir iskeletinden dolayı oldukça iyi kimyasal, termal ve mekanik kararlılığa sahiptir. Sülfonat grupları ise iyon değişimini ve şişme yeteneğini sağlamaktadır [64].

Yeni geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin (CUPRAC Antioksidan Sensörü) esası, Nafyon katyon değiştirici membran üzerine tutturulmuş olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidan varlığında Cu(I)-Nc kompleksine indirgenmesi ve sensör üzerinde oluşan sarı-turuncu rengin 450 nm dalga boyunda Cu(II)-Nc tutturulmuş referans sensöre karşı spektrofotometre ile absorbansının ölçümüne dayalıdır. Cu(II)-Nc kompleksini Nafyon katyon değiştirici membran üzerine tutturmak amacıyla uygun boyutlarda kesilen membran (4.5x0.5 cm) CUPRAC çözeltisi içerisine eklendikten sonra reaktifin membran üzerinde kararlı olarak kaldığı karıştırma süresi belirlenmesi amacıyla içerisine membran eklenen CUPRAC çözeltilerine karıştırma işlemi uygulanmış ve optimum karıştırma süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). 30 dakikalık karıştırma süresi sonucunda reaktif tutturulmuş membranlar referans sensör olarak adlandırılmış ve kullanılmıştır. Referans sensörler ağzı kapalı tüpler içerisinde bekletilerek kararlılıkları günler arası suya karşı absorbans değerleri ölçülerek incelenmiş ve 10 gün sonunda absorbansta belirgin bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Örnek tayini için optimum karıştırma süresini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, referans bileşik olarak seçilen troloks bileşiğinin etanolik çözeltisine Cu(II)-Nc tutturulmuş referans sensör eklenmiş ve optimum karıştırma süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Optik sensör esaslı CUPRAC yönteminde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun 1.0×10^{-3} M standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak yöntem uygulanmıştır. Denemeler sonucunda Şekil 4.4'teki spektrumda görüldüğü gibi maksimum absorpsiyon elde edilen

dalgaboyu 450 nm olarak belirlenmiştir. Troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve doğru denklemi $A=2.40 \times 10^4 c + 0.054$ şeklinde elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısını (ϵ) vermektedir. Troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı $2.40 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. TR bileşiğinin optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1.01 ve 3.33 μM 'dir.

$$\text{LOD} = 3s_{bl}/m \quad (5.2)$$

$$\text{LOQ} = 10 s_{bl}/m \quad (5.3)$$

LOD ve LOQ değerleri denklem (5.2) ve (5.3) kullanılarak hesaplanmıştır. s_{bl} : blank'in standart sapması ($N=3$), m : kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. Kalibrasyon doğrusunun elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) %5.2 olarak hesaplanmıştır. Troloks için lineer çalışma aralığı 4.11×10^{-8} - 5.18×10^{-5} M olup geliştirilen sensör esaslı yeni yöntem katı sensörlerde sıklıkla görülmeyecek şekilde kusursuza yakın lineerliğe sahiptir ($r = 0.9992$).

Geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi kullanılarak troloks dahil toplam 20 antioksidan bileşiğin (gıda ve plazma antioksidanları) molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4.20 ve 4.21'de standart antioksidan bileşiklerin lineer doğru denklemleri ($A = mc + n$), korelasyon katsayıları (r), lineer konsantrasyon aralıkları ve TEAC değerleri özetlenmiştir. Optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC katsayıları orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen değerlerle iyi bir korelasyon göstermiştir ($r = 0.898$). Standart antioksidan bileşikler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri %95 güvenilirlik düzeyinde benzerlik göstermektedir.

Yeşil çay özütüne yapılan standart antioksidan bileşik katkıları (askorbik asit, kuersetin ve α -tokoferol) ve bu çözeltilerde optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile yapılan tayinler sonucunda yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemelerin yapıldığı konsantrasyon aralığında absorbans ölçümlerinin bağıl standart sapma (% RSD) değeri yöntemin tekrarlanabilirliğini temsil etmektedir ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi için en yüksek değer %6.54 bulunmuştur (Tablo 4.22). Her bir antioksidan bileşiğin geri kazanım değerleri optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile oluşturulan bireysel kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.22 incelendiğinde geri kazanım değerlerinin % 92.79 ile %99.87 arasında olduğu görülmektedir.

Standart antioksidan bileşiklerin üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımlar hazırlanmış ve etil alkol çözeltisi ile seyreltme işleminin ardından antioksidan kapasiteleri, optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.23). Sentetik karışımlar için teorik olarak beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite (mM TR) değerlerinin birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve sapmanın yalnızca \pm %6.8 olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ışığında Beer kanunundan kimyasal sapmaların olmadığı ve antioksidan karışımının içerdiği antioksidanların bireysel kapasitelerinin toplamının karışımın toplam antioksidan kapasitesini belirlediği anlaşılmaktadır. Sentetik karışımlar için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 0.01$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem sentetik karışımlar için valide edilmiştir.

Meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri (mM TR) denklem (5.4) 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 göstermektedir. Meyve suyu örnekleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.24'te özetlenmiştir. Optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve karşılaştırma yöntemi olarak seçilen orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine çok yakındır. Çalışılan meyve suları optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerlerine göre şöyle sıralanmaktadır: vişne suyu > portakal suyu > şeftali suyu > kayısı suyu. Meyve suyu örnekleri için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 1.46$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.71$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem meyve suları için valide edilmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mM TR)} = (A / \varepsilon_{\text{TR}}) \cdot (V_f / V_s) \cdot r \quad (5.4)$$

Farklı pH'larda (pH 1.0, 4.0 ve 7.0) hazırlanan meyve posası hidrolizatlarının toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mmol TR/g-örnek) 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, V_i ekstraksiyon için alınan solvent hacmini, m alınan örnek miktarını ve r seyrelme faktörünü göstermektedir. Üzüm posası ve yaban mersini posası hidrolizatları için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.25 ve 4.26'da özetlenmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mmol TR/g-örnek)} = (A / \varepsilon_{\text{TR}}) \cdot (V_f / V_s) \cdot (V_i / m) \cdot r \quad (5.5)$$

Optik sensör esaslı CUPRAC ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine çok yakındır. Meyve posalarının hidrolizatları optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan

kapasitelerine göre şöyle sıralanmaktadır: pH 1 hidrolizati > pH 4 hidrolizati > pH 7 hidrolizati. Bunun nedeni asitlik arttıkça meyve posası ile fenolik bileşikler arasındaki bağların kırılarak fenoliklerin serbest kalması olarak açıklanabilir. Meyve posası hidrolizatları için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir. Sonuçta, önerilen yöntem meyve posası hidrolizatları için valide edilmiştir.

Hazırlanan üzüm ve yaban mersini posa özütlerinin toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mmol TR/g-örnek) cinsinden belirlenmiştir (Tablo 4.27). Her iki yöntem ile bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri birbiri ile uyum içerisindedir ve yaban mersini posasının toplam antioksidan kapasitesi üzüm posasına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Meyve posası özütleri için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{deneyse} = 33.64$, $F_{kritik (tablo)} = 161.40$, $F_{deneyse} < F_{kritik (tablo)}$). Sonuçta, önerilen yöntem meyve posası özütleri için valide edilmiştir.

Yaban mersini posasının toplam antioksidan kapasitesine farklı fırınlama sıcaklıkları (175, 200, 225 °C) ve farklı fırınlama sürelerinin etkisi (5, 10, 15 dakika) incelenmiştir. Farklı sıcaklık ve sürelerde fırınlama işleminin ardından yaban mersini posalarının özütleri hazırlanmış ve toplam antioksidan kapasite değerleri hem orijinal CUPRAC hem de optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ile belirlenmiştir (Tablo 4.28 ve 4.29). Her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbiri ile oldukça uyumludur. Artan fırınlama sıcaklıkları ve fırınlama süreleri antioksidan kapasiteyi azaltacak yönde etki yapmıştır.

Yaban mersini posasının optik sensör esaslı CUPRAC yöntemine göre toplam antioksidan kapasitesi 15 dakikalık fırınlama süreleri sonucunda 175, 200, 225 °C fırınlama sıcaklıkları için sırasıyla % 21.3, 48.6 ve 61.3 oranlarında düşüş göstermiştir.

Baharat örneklerinin mikrodalga ekstraksiyon sistemi kullanılarak elde edilen özütlerinin toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri (mM TR) denklem (5.4) kullanılarak belirlenmiştir. Baharat özütleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.30'da özetlenmiştir. Optik sensör esaslı CUPRAC ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri oldukça uyumlu bulunmuştur. Çalışılan baharat özütleri optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasitelerine göre şöyle sıralanmaktadır: havlıcan > aspir çiçeği > zerdeçal > zencefil. Baharat özütleri için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 1.94$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem baharat özütleri için valide edilmiştir.

Hazırlanan biyolojik örneklerinin (sıçan böbrek dokusu, sıçan karaciğer dokusu, inek serumu) toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC ve optik sensör esaslı CUPRAC yöntemleri kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri (mM TR) belirlenmiştir (Tablo 4.31). Biyolojik örneklerin toplam antioksidan kapasite değerleri her iki yöntem sonuçları karşılaştırıldığında birbirleriyle uyumlu olarak bulunmuştur. Sıçan karaciğer dokusu ve böbrek dokusu arasında antioksidan kapasite açısından karşılaştırma yapıldığında karaciğer dokusunun toplam antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Biyolojik örnekler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 5.92$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem biyolojik örnekler için valide edilmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında, geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin reflektans özelliği incelenmiş ve toplam antioksidan kapasite tayini için fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü geliştirilmiştir. Reflektans ölçümleri minyatür taşınabilir fiber-optik reflektans spektrometre kullanılarak yapılmıştır. Optik sensör esaslı CUPRAC yönteminin prosedürüne bağlı kalınarak hazırlanan sensörler Şekil 3.2'deki sistemde örnek bölmesine yerleştirilerek % reflektans değerleri ölçülmüştür. Reflektans ölçümleri şu şekilde yapılmaktadır; antioksidan çözeltisine eklenmemiş olan referans sensör örnek bölmesine yerleştirilerek reflektans değeri sıfırlanır ve ardından antioksidan çözeltisinden alınan sensörün fiber-optik spektrometre kullanılarak uygun dalga boyunda % reflektans değeri ölçülür.

Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile yapılan denemelerde sonuçlar troloks bileşiği referans alınarak inceleneceğinden troloksun 1.0×10^{-3} M standart çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerden farklı hacimler alınarak fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile tayinler yapılmıştır. Denemeler sonucunda Şekil 4.33'te verilen reflektans spektrumunda görüldüğü gibi maksimum reflektans elde edilen dalgaboyu 530 nm olarak belirlenmiştir. Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve doğru denklemi $R_f = 3.40 \times 10^3 c + 0.004$ şeklinde elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunun eğim değeri (m) 2.40×10^4 olarak bulunmuştur. TR bileşiğinin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.53 ve 1.76 μM 'dir. Kalibrasyon doğrusunun elde edildiği konsantrasyon aralığında tekrarlanabilirliği temsil eden bağıl standart sapma (% RSD) %4.80 olarak hesaplanmıştır. Troloks için lineer çalışma aralığı $3.24 \times 10^{-6} - 5.76 \times 10^{-5}$ M olup yöntem katı sensörler ile karşılaştırıldığında yüksek lineerliğe sahiptir ($r = 0.9936$).

Geliştirilen fiber-optik reflektometrik sensör kullanılarak troloks dahil toplam 20 antioksidan bileşiğin (gıda ve plazma antioksidanları) molar konsantrasyon-reflektans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri elde edilmiştir. Tablo 4.51 ve 4.52’de saf antioksidan bileşiklerin lineer doğru denklemleri ($R_f = mc + n$), korelasyon katsayıları (r), lineer konsantrasyon aralıkları ve TEAC değerleri özetlenmiştir. Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen TEAC katsayıları orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen değerlerle iyi bir korelasyon göstermiştir ($r = 0.8823$). Standart antioksidan bileşikler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir.

Yeşil çay özütüne yapılan antioksidan bileşik katkıları (askorbik asit, kuersetin ve α -tokoferol) ve bu çözeltilerin fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensör ile yapılan denemeler sonucunda yöntemin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımının araştırılması yapılmıştır. Denemelerin yapıldığı konsantrasyon aralığında reflektans ölçümlerinin bağıl standart sapma (% RSD) değeri yöntemin tekrarlanabilirliğini temsil etmektedir ve yeni geliştirilen fiber-optik reflektometrik sensör ile en yüksek değer %4.97 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.53). Her bir antioksidan bileşiğin geri kazanım değerleri fiber-optik reflektometrik sensör ile oluşturulan bireysel kalibrasyon grafiklerinden hesaplanmıştır. Tablo 4.53 incelendiğinde geri kazanım değerlerinin % 91.47 ile %93.40 arasında olduğu görülmektedir.

Standart antioksidan bileşiklerin üçlü kombinasyonlarından oluşan sentetik karışımları hazırlanmış ve etil alkol ile seyrelmelerinin ardından antioksidan kapasiteleri, fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.54). Sentetik karışımlar için teorik olarak elde edilen beklenen kapasite değerleri ile deneysel olarak bulunan kapasite değerlerinin (mM TR) birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve sapmanın yalnızca $\pm\%7$ olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları ışığında antioksidan karışımının içerdiği antioksidanların bireysel kapasitelerinin

toplamlarının karışımın antioksidan kapasitesini belirlediği anlaşılmaktadır. Sentetik karışımlar için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 2.35$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem sentetik karışımlar için valide edilmiştir.

Meyve suyu örneklerinin toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri (mM TR) cinsinden denklem (5.6) kullanılarak belirlenmiştir. Denklemden; R_f ölçülen reflektans değerini, m_{TR} troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusunun eğim değerini, V_f toplam hacmi, V_s analiz için alınan örnek hacmini ve r seyrelme faktörünü göstermektedir. Meyve suyu örnekleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.55'te özetlenmiştir. Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine çok yakındır. Çalışılan meyve suları fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen toplam antioksidan kapasitelerine göre şöyle sıralanmaktadır: vişne suyu > portakal suyu > şeftali suyu > kayısı suyu. Meyve suları için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 1.43$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 10.13$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem meyve suları için valide edilmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mM TR)} = (R_f/m_{TR}) \cdot (V_f/V_s) \cdot r \quad (5.6)$$

Baharat örneklerinin mikrodalga ekstraksiyon sistemi kullanılarak elde edilen özütlerinin toplam antioksidan kapasiteleri, orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite değerleri (mmol TR/g-örnek) cinsinden denklem (5.7) kullanılarak belirlenmiştir. Denklemde; R_f ölçülen absorbans değerini, m_{TR} troloks bileşiğinin kalibrasyon doğrusunun eğim değerini, V_f toplam hacmi, V_s analiz için alınan örnek hacmini, V_i ekstraksiyon için alınan solvent hacmini, m alınan örnek miktarını ve r seyrelme faktörünü göstermektedir. Baharat özütleri için elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri Tablo 4.56'da özetlenmiştir. Fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri birbirlerine oldukça uyumlu bulunmuştur. Çalışılan baharat özütleri fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ile elde edilen toplam antioksidan kapasitelerine göre şöyle sıralanmaktadır: havlıcan > aspir çiçeği > zerdeçal > zencefil. Baharat özütleri için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 0.06.$, $F_{kritik (tablo)} = 10.13$, $F_{deneysel} < F_{kritik (tablo)}$). Sonuçta, önerilen yöntem baharat özütleri için valide edilmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (mmol TR/g-örnek)} = (R_f / m_{TR}) \cdot (V_f / V_s) \cdot (V_i / m) \cdot r \quad (5.7)$$

Hazırlanan biyolojik örneklerin (sıçan böbrek dokusu, sıçan karaciğer dokusu, inek serumu) toplam antioksidan kapasiteleri troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (mM TR) cinsinden, orijinal CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak belirlenmiştir (Tablo 4.56). Biyolojik örneklerin toplam antioksidan kapasite değerleri her iki yöntem sonuçları karşılaştırıldığında birbirleriyle uyumlu olarak bulunmuştur. Sıçan karaciğer dokusu ve böbrek dokusu arasında antioksidan kapasite açısından karşılaştırma yapıldığında karaciğer dokusunun toplam antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Biyolojik örnekler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [113] (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. Diğer taraftan, geliştirilen fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü ve orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen bulgular %95 güvenirlilik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($P = 0.05$ için $F_{\text{deneysel}} = 2.96$, $F_{\text{kritik (tablo)}} = 18.51$, $F_{\text{deneysel}} < F_{\text{kritik (tablo)}}$). Sonuçta, önerilen yöntem biyolojik örnekler için valide edilmiştir.

Antioksidanların tez kapsamında yeni geliştirilen optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ve fiber-optik reflektometrik CUPRAC sensörü kullanılarak elde edilen TEAC değerleri ile orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri arasındaki farkların nedenlerini tartışmak gerekirse, örneğin, sulu çözeltilerdekinden farklı olarak katı polimer matriksi içerisinde yük transferi ve temel haldeki redoks merkezleri çeşitli mekanizmalar içerebilmektedir [114]. Antioksidan bileşiklerin Nafyon membranda tutturulmuş Cu(II)-Nc reaktifi ile redoks reaksiyonundan önce membran yüzeyine fiziksel difüzyonu gerekir bu nedenle de sulu çözeltilerdeki nazaran reaksiyon hızı azalmaktadır. Polifenollerin büyük boyutlu süstitüentlerinden kaynaklanan sterik engelleme nedeniyle membranda tutturulmuş reaktif ile yük transferi zorlaşacağından reaksiyon hızı azalır. Buna karşın çözelti ile karşılaştırıldığında reaktifin membran yüzeyindeki yerel zenginleşmesi membran yüzeyine difüzlenen antioksidanlar ile reaksiyon hızını artırır. Bu faktörler sensör esaslı yöntemler ile elde edilen TEAC değerlerinin orijinal CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC değerleri ile bire bire örtüşmemesinin nedenlerindedir. Bilirubin sensör esaslı yöntemler ile bulunan yüksek TEAC değerleri 450 nm dalgaboyunda bilirubin oksidasyon ürünü olan biliverdinin interferans absorbansından kaynaklanabilir [115]. Standart redoks potansiyelleri ≤ 0.2 V olan flavonoidler kolay oksidasyona uğrarlar buna karşın naringenin redoks potansiyeli Cu(Nc)_2^{2+} - Cu(Nc)_2^+ çiftinin redoks potansiyeline yakın olduğundan reaksiyon yavaş gerçekleşir [8]. Naringenin oksidasyonu ancak 50 °C inkübasyonlu CUPRAC yöntemi ile gerçekleştirilirken sensör esaslı CUPRAC yöntemleri ile naringenin inkübasyona gerek duyulmaksızın tayin edilebilmektedir. Naringenin TEAC_{CUPRAC} katsayıları saf etanol ve metanol içerisinde sırasıyla 0.05 ve 0.57 olarak bulunmuştur [116]. Anyonik solvasyon yeteneğine sahip metanolün alkoller arasında en iyi iyonizasyon destekleyicisi olması [117] ve bu tip çözücülerde

elektron transferinin daha kolay oluşu yüksek TEAC değerinin nedenini açıklayabilir. Çözelti ortamı ile karşılaştırıldığında sensör membranı metanol gibi düşük hidrofilik ortamı oluşturur ve elektron transferini artırır. Buna ek olarak, katyonik redoks aktif metal kompleksinin ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$), suda çözünmeyen Nafyon gibi anyonik polimere emdirilmesi sayesinde moleküler agregat oluşabilir ve redoks davranışı çok daha aktif bir hale gelebilir. Buna karşın homojen çözeltilerde veya düzenli katalizörlerle bu durumun elde edilmesi olanaksızdır [118]. Redoks aktif reaktifin membran üzerinde lokal konsantrasyonu artabilir ve dolayısıyla redoks reaksiyonunun hızı çözelti ortamı ile karşılaştırıldığında naringeninde olduğu gibi artış gösterir. Orijinal CUPRAC yöntemi ile karşılaştırıldığında sensör esaslı yöntemler ile naringenin için elde edilen yüksek antioksidan kapasiteye karşın kateşin ve rozmarinik asit için düşük TEAC katsayıları elde edilmiştir. Kateşin 2,3-çifte bağı içermemektedir oysa ki elektron delokalizasyonundan sorumlu olan 2,3-çifte bağı 4-okso grubu ile konjugasyon halindedir ve yüksek antioksidan kapasite için ön şartlardan biri sayılır. Kuersetinin yüksek antioksidan kapasitesi kararlı ariloksil radikalinin oluşumu sonucudur. Kateşinde bulunan A ve B halkalı yapıları birbirilerine dik şekilde bulunmalarına karşın, kuersetinin C2-C3 çifte bağı ve düzlemsel geometrisi [80] nedeniyle radikal tüm molekül boyunca delokalize olur. Flavonoidin bir elektron oksidasyonu ile üretilen ariloksil radikali konjugasyon ile kararlı hal alır ve bunun sonucunda flavonoidin redoks potansiyeli düşürülerek antioksidan gücü artar. Sensör üzerinde düzlemsel geometriye zorlanan bakır-neokuproin düşünüldüğünde, kateşininin düzlemsel yapıda olmaması antioksidan kapasitesinin azalmasında rol oynayan önemli bir engeldir. Diğer yandan dört adet fenolik -OH grubuna ve kusursuz konjuge yapısına karşın rozmarinik asitin TEAC katsayısı sensör esaslı yöntemlerle düşük bulunmuştur. Bunun nedeni optik sensörün cevabı için en önemli parametrelerden biri olan ve cevabı düşürecek nitelikte rozmarinik asitin büyük moleküler boyutta olması ve 2.8 gibi düşük bir pKa değerine sahip olması olarak açıklanabilir. Benzer şekilde, çözelti ortamında orijinal CUPRAC yöntemi ile karşılaştırıldığında askorbik asitin TEAC kapasitesindeki düşüşün nedeni çalışılan pH'ta (pH=7) askorbik asitin negatif yüklü monohidrojen askorbat formunda olması ($\text{pK}_{a1}=4.2$ ve $\text{pK}_{a2}=11.6$) [119] ve bunun sonucu olarak negatif yüklü Nafyon membran tarafından itilerek diffüzyonunun azalmasıdır. Tiyol grubu antioksidanlardan glutatyon, sistein ve homosistein bileşikleri için optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile bulunan TEAC değerleri orijinal CUPRAC yöntemine

kıyasla oldukça yüksektir. Optik sensör esaslı CUPRAC yöntemi ile elde edilen yüksek TEAC değerlerinin nedeni tiyol grubu antioksidanlarının (GSH, CYS ve HCYS) geri dönüşümsüz ileri oksidasyon ürünleri olan sülfirik (-SO₂H) veya sülfonik (-SO₃H) asitlere dönüşmeleri olarak açıklanabilir [15,120].

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, orijinal CUPRAC yönteminin reaktifi, Cu(II)-Nc, elektrostatik olarak katyon değiştirici Nafyon membrana tutturulmuş ve reaktifin çeşitli antioksidan bileşiklere karşı aktivitesini kaybetmediği ortaya konularak yeni moleküler spektroskopik sensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen yeni moleküler spektroskopik sensörler, çeşitli antioksidanların geniş konsantrasyon aralıklarında orijinal CUPRAC yöntemine karşı valide edilmiştir. Geliştirilen sensörler (CUPRAC Antioksidan Sensörü ve Fiber-Optik Reflektometrik CUPRAC Sensörü) sentetik karışımlar ve çeşitli kompleks örnekler içerisinde (meyve suları, meyve posaları, baharat örnekleri, doku ve serum homojenizatları) toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi açısından iyi bir duyarlılık sergilemişlerdir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen moleküler spektroskopik sensörler kullanılarak elde edilen doğru veriler doğrultusunda toplumun gıda tüketimi ve beslenme konusunda bilgilendirilmesine olanak sağlanabilecektir. Geliştirilen moleküler spektroskopik sensörler, besin özütleri ve biyolojik örnekler ve farklı pekçok matriks içinde toplam antioksidan kapasite tayininin daha duyarlı, daha doğru, daha hızlı, düşük maliyetli, daha basit ve laboratuvar dışında da yapılabilmesi gibi bir çok özelliği ile orijinal CUPRAC yöntemine karşı avantaj sağlamaktadır. Ayrıca geliştirilen moleküler spektroskopik sensörler, yakın gelecekte kit formatına dönüştürülerek daha yaygın kullanım potansiyeline de sahip olabileceklerdir.

KAYNAKLAR

1. MAGALHÃES, L.M., SEGUNDO, M.A., REIS, S., LIMA, J.L.F.C., ESTELA, J.M., CERDÁ, V., 2007, Automatic in Vitro Determination of Hypochlorous Acid Scavenging Capacity Exploiting Multisyringe Flow Injection Analysis and Chemiluminescence. *Analytical Chemistry*. 79, 3933-3939.
2. CAO, G., ALESSIO, H.M., CUTLER, R.G., 1993, Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*. 14, 303-311.
3. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., 1985, Quantitative Measurement of the Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human Blood Plasma by Controlled Peroxidation. *FEBS Letters*. 187, 33-37.
4. 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.
5. SANCHEZ, M.C., LARRAURI, J.A., CALIXTO, S.F., 1998, A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76, 270-276.
6. 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.
7. 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.
8. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, 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.
9. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., 2008, Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*. 160, 413-419.
10. APAK, R., GÜÇLÜ, K., DEMİRATA, B., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, 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.

11. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ERÇAĞ, E., 2006, The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Some Herbal Teas. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 57, 292-304.
12. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K.I., BERKER, K., ÖZGÖKÇE, F., APAK, R., 2008, Antioxidant Capacities of Herbal Plants Used in the Manufacture of Van Herby Cheese: 'Otlu Peynir'. *International Journal of Food Properties*. 11, 747-761.
13. ALPINAR, K., ÖZYÜREK, M., KOLAK, U., GÜÇLÜ, K., ARAS, Ç., ALTUN, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2009, Antioxidant Capacities of Some Food Plants Wildly Grown in Ayvalik of Turkey. *Food Science and Technology Research*. 15, 59-64.
14. GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., APAK, R., 2006, Antioxidant Capacity of Fresh, Sun- and Sulfited-Dried Malatya Apricot (*Prunus Armeniaca*) Assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods. *International Journal of Food Science & Technology*. 41, 76-85.
15. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ALTUN, M., 2005, Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper(II)-Neocuproine As Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method. *Free Radical Research*. 39, 949-961.
16. ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2007, Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid by the Modified CUPRAC Method with Extractive Separation of Flavonoids-La(III) Complexes. *Analytica Chimica Acta*. 588, 88-95.
17. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2008, 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. *Analytica Chimica Acta*. 630, 28-39.
18. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2007, CUPRAC Total Antioxidant Capacity Assay of Lipophilic Antioxidants in Combination with Hydrophilic Antioxidants Using the Macrocyclic Oligosaccharide Methyl β -Cyclodextrine As the Solubility Enhancer. *Reactive and Functional Polymers*. 67, 1548-1560.
19. ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., GÜÇLÜ, K., TOR, İ., APAK, R., 2007, Sensitivity Enhancement of CUPRAC and Iron(III)-Phenanthroline Antioxidant Assays by Preconcentration of Colored Reaction Products on a Weakly Acidic Cation Exchanger. *Reactive and Functional Polymers*. 67, 1478-1486.

20. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Novel Hydroxyl Radical Scavenging Antioxidant Activity Assay for Water-Soluble Antioxidants Using a Modified CUPRAC Method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345, 1194-1200.
21. BENER, M., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Polyphenolic Contents of Natural Dyes Produced From Industrial Plants Assayed by HPLC and Novel Spectrophotometric Methods. *Industrial Crops & Products*. 32, 499-506.
22. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl Radical Scavenging Assay of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method Using Catalase for Hydrogen Peroxide Degradation. *Analytica Chimica Acta*. 616, 196-206.
23. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2009, Measurement of Xanthine Oxidase Inhibition Activity of Phenolics and Flavonoids with a Modified Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Method. *Analytica Chimica Acta*. 636, 42-50.
24. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2010, A Novel Hydrogen Peroxide Scavenging Assay of Phenolics and Flavonoids Using Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 689-698.
25. HALLIWELL, B., ARUOMA O.I., 1991, DNA Damage by Oxygen-Derived Species: Its Mechanisms and Measurement in Mammalian Systems. *FEBS Letters*. 281, 9-19.
26. CAO, G., PRIOR R.L., 1999, *In Vivo* Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods. *Free Radical Biology & Medicine*. 27, 1173-1181.
27. 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.
28. SROKA, Z., CISOWSKI, W., 2003, Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-Radical Activity of Some Phenolic Acids. *Food and Chemical Toxicology*. 41, 753-758.
29. CAO, G., PRIOR, R.L., 1998, Comparison of Different Analytical Methods for Assesing Total Antioxidant Capacity of Human Serum. *Clinical Chemistry*. 44, 1309-1315.
30. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant Properties of Phenolic Compounds. *Trends in Plant Science*. 2, 152-159.
31. SHAHIDI, F., 1996, Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications, *AOCS Press*, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.

32. TÜZÜN, Y., GARİP, F., 2005, E Vitaminin Dermatolojideki Yeri, *Dermatose*, 96-98.
33. DURMAZ, G., 2002. Kayısı Meyvesinin ve Kavrulmuş Kayısı Çekirdeğinin Antioksidan Özellikleri, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 95 s., Malatya.
34. HUDSON, B.J.F., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, Amsterdam, 1-85166-440-8.
35. HALLIWELL, B., 2001, Food-Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and in Vivo, *Handbook of Antioxidants*, 690 p., Los Angeles.
36. HELLE, R.A., JESPER, B.N., FLEMING, N., 1997, Antioxidative Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry*. 43, 562-568.
37. 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.
38. KESKİN, H., ERKMEN G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
39. 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.
40. HALLIWELL, B., 1990, How to Characterise a Biological Antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
41. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J., 1992, Phenolic Antioxidants. *Critical Review of Food Science and Nutritional*. 32, 67-103.
42. 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.
43. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, (Marcel Dekker, ed.), New York-Basel, 0-8247-0547-5.
44. TRAVACIO, M., POLO, J.M., LLESUY, S., 2000, Chromium (VI) Induces Oxidative Stress in the Mouse Brain. *Toxicology*. 150, 137-146.
45. ULAKOĞLU, Z.E.M., GÜMÜŞTAŞ, K.M., BELCE, A., ALTUĞ, T., KÖKOĞLU, E., 1998, Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutasyon Tükenişinin Enerji Metabolizması ile İlişkisi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*. 29, 127-131.

46. CURELLO, S., CECONI, C., CARGNONI, A., CORNACCHIARI, A., FERRARI, R., ALBERTINI, A., 1987, Improved Procedure for Determining Glutathione in Plasma as an Index of Myocardial Oxidative Stress. *Clinical Chemistry*. 33, 1448-1449.
47. NATH, K.A., SALAHUDEEN, A.K., 1993, Autooxidation of Cysteine Generates Hydrogen Peroxide: Cytotoxicity and Attenuation by Pyruvate. *American Journal of Physiology*. 264, 306-314.
48. HOUSE, J.D., JACOBS, R.L., STEAD, L.M., BROSNAN, M.E., BROSNAN, J.T., 1999, Regulation of Homocysteine Metabolism. *Advances in Enzyme Regulation*. 39, 69-91.
49. MOLDEUS, P., COTGREAVE, I. A., BERGGREN, M., 1986, Lung Protection by a Thiol-Containing Antioxidant: N-Acetylcysteine. *Respiration*. 50, 31-42.
50. 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 Radical Biology & Medicine*. 6, 593-597.
51. COTGREAVE, I.A., 1997, N-Acetylcysteine: Pharmacological Considerations and Experimental and Clinical Applications. *Advances in Pharmacology*. 38, 205-227.
52. ATMACA, G., 2004, Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids. *Yonsei Medical Journal*. 45, 776-788.
53. NIMNI, M.E., HAN, B., CORDOBA, F., 2007, Are We Getting Enough Sulfur in Our Diet?. *Nutrition & Metabolism*. 24, 1743-1765.
54. PETTIT, F.H., YEAMAN, S.J., REED, L.J., 1978, Purification and Characterization of Branched Chain Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complex of Bovine Kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 75, 4881-4885.
55. 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. *Journal of Applied Nutrition*. 49, 3-11.
56. BAST, A., HAENEN, G.R., 1988, Interplay Between Lipoic Acid and Glutathione in the Protection Against Microsomal Lipid Peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 963, 558-561.
57. CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L., 1997, Antioxidant and Prooxidant Behaviour of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*. 22, 749-760.

58. BURDA, S., OLESZEK, W., 2001, Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 2774-2779.
59. 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.
60. 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.
61. WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or Signaling Molecules. *Free Radical Biology and Medicine*. 36, 838-849.
62. DIAMOND, D., 1998, Principles of Chemical and Biological Sensors, Wiley Interscience, New York, 0-471-54619-4.
63. CATTRALL, W. R. 1997. Chemical Sensors, Oxford University Press, Oxford, 71.
64. AMINI, M.K., MOMENI-ISFAHANI, T., KHOROSANI, J.H., POURHOSSEIN, M., 2004, Development of an Optical Chemical Sensor Based on 2-(5-Bromo-2-Pyridylazo)-5-(Diethylamino) Phenol in Nafion for Determination of Nickel Ion. *Talanta*. 63, 713-20.
65. HULANICKI, A., GLAB S., INGMAN F., 1991, Chemical Sensors Definitions and Classification, *Pure and Applied Chemistry*, 63, 1247-1250.
66. WANG, J. 1999. Electroanalysis and Biosensors. *Analytical Chemistry*. 12, 328-332.
67. 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, 137-44.
68. KAWALEC, A., JASEK, K., PASTERNAK, M., 2008, Measurements Results of SAW Humidity Sensor with Nafion Layer. *European Physical Journal-Special Topics*. 154, 123-6.
69. MacCRAITH, B.D., 1998, Principles of chemical and biological sensors, (Diamond, ed.), A Wiley Interscience publication, New York, 0-471-54619-4.
70. YAPPERT, M.C., 1996, A Tutorial on Fiber- Optic Chemical Sensors, the Chemical Educator. *Springer-Verlag*. 1, 1430 – 4171.
71. 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.

72. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, The Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples. *Methods in Enzymology*. 299, 50-62.
73. GLAZER, A.N., 1990, Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. *Methods in Enzymology*. 186, 161-168.
74. 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.
75. 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.
76. MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A., 1994, Total Antioxidant Status in Plasma and Body Fluids. *Methods of Enzymology*. 234, 279-293.
77. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total Antioxidant Activity Measured by Chemiluminescence Methods. *Methods of Enzymology*. 299, 3-14.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. GIROTTI, S., FERRI, E., MACCAGNANI, L., BUDINI, R., BIANCHI, G., 2002, Plasma Antioxidant Capacity Determination: Comparative Evaluation of Chemiluminescent and Spectrophotometric Assays. *Talanta*. 56, 407-414.
82. PELLEGRINI, RE, 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.
83. ASPLUND, K., 2002, Antioxidant Vitamins in the Prevention of Cardiovascular Disease: a Systematic Review. *Journal of Internal Medicine*. 251, 372-392.
84. HANG, V. and WROLSTAD, R. E. 1990, Characterization of Anthocyanin-Containing Colorants and Fruit Juices by HPLC/Photodiode Array Detection. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 38, 698-708.

85. KIM, D.O., HEO, H.J., KIM, Y.J., Yang, H.S. and Lee, C.Y., 2005, Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 9921-9927.
86. MOZETIC, B., TREBSE, P., HRIBAR, J., 2002, Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus Avium* L.) From Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*. 40, 207-212.
87. CHAOVANALIKIT, A., WROLSTAD, R.E., 2004, Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*. 69, 67-72.
88. Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC (2000), China Food Composition, Peking University Medical Press, Beijing, China.
89. BYRNE, D., VIZZOTTO, M., CISNEROS-ZEVALLOS, L., RAMMING, D.W., OKIE, W.R., 2004, Antioxidant Content of Peach and Plum Genotypes. *Hortscience*. 39, 798.
90. LUQUE-RODRIGUES, J.M., CASTRO, M.D.L., PÉREZ-JUAN, P., 2007, Dynamic Superheated Liquid Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics From Red Grape Skins of Winemaking Residues. *Bioresource Technology*. 98, 2705-2713.
91. MURGA, R., RUIZ, R., BELTRÁN, S., CABEZAS, J.L., 2000, Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins From Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 3408-3412.
92. JU, Z.Y., HOWARD, L.R., 2003, Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total Phenolics From Dried Red Grape Skin. *Journal of Agricultural and food Chemistry*. 51, 5207-5213.
93. PRIOR, R.L., CAO, G., MARTIN, A., SOFIC, E., McEWEN, J., O'BRIEN, C., LISCHNER, N., EHLENFELDT, M., KALT, W., KREWER, G., MAINLEND, C.M., 1998, Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolics and Anthocyanin Content, Maturity and Variety of Vaccinium Species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46, 2868-2693.
94. KHANAL, R.C., HOWARD, L.R., PRIOR, R.L., 2010, Effect of Heating on the Stability of Grape and Blueberry Pomace Procyanidins and Total Anthocyanins. *Food Research International*. 43, 1464-1469.
95. DELGADO-VARGAS, F., PAREDES-LÓPEZ, O., 2003, Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses, CRC Press LLC., Boca Raton, Florida, 1-58716-076-5.

96. CAO, Z.F., CHEN, Z.G., GUO, P., ZHANG, S.M., LIAN, L.X., LUO, L., HU, W.M., 1993, Scavenging Effects of Ginger on Superoxide Anion and Hydroxyl Radical, *Journal of Chinese Materia Medica*, 18,750-751.
97. CHRUBASIK, S., PITTLER, M.H., ROUFOGALIS, B.D., 2005, Zingiberis Rhizoma: A Comprehensive Review on the Ginger Effect and Afficacy Profiles. *Phytomedicine*. 12, 684-701.
98. LEE, J.Y., CHANG, J.Y., KIM, H.J., PARK, J.H., CHOI, S.W., 2002, Antioxidative Flavonoids From Leaves of *Carthamus Tinctorius*. *Archives of Pharmacal Research*. 25, 313-319.
99. STEINBERG, I.M., MILARDOVIC, S., 2007, Chromogenic Radical Based Optical Sensor Membrane for Screening of Antioxidant Activity. *Talanta*. 71, 1782-1787.
100. PALAROAN, W.S., BERGANTIN, J., SEVILLA, F., 2000, Optical Fiber Chemiluminescence Biosensor for Antioxidants Based on an Immobilized Luminol/Hematin Reagent Phase. *Analytical Letters*. 33, 1797-1810.
101. BUTTRY, D.A., ANSON, F.C., 1982, Effects of Electron Exchange and Single-File Diffusion on Charge Propagation in Nafion Films Containing Redox Couples, *Journal of American Chemical Society*. 104, 4824-4829.
102. ZHANG, J., ZHAO, F., ABE, T., KANEKO, M., 1999, Effect of Applied Potentials on Electron Transfer in Oxidation and Reduction of the Ru(Bpy)₃^{2+/3+} Couple in Nafion Film As Studied by Potential-Step Chronoamperometry. *Electrochimical Acta*. 45, 399-407.
103. TANG, Y., HE, F., YU, M., WANG, S., LI, Y., ZHU, D, 2006, Radical Scavenging Mediating Reversible Fluorescence Quenching of an Anionic Conjugated Polymer: Highly Sensitive Probe For Antioxidants. *Chemistry Materials*. 18, 3605-3610.
104. WANG, X., AMATATONGCHAI, M., NACAPRICHA, D., HOFMANN, O., DE MELLO, J.C., BRADLEY, D.D.C., DE MELLO, A.J., 2009, Thin-Film Organic Photodiodes for Integrated On-Chip Chemiluminescence Detection–Application to Antioxidant Capacity Screening. *Sens. Actuators B*. 140, 643-648.
105. LEE, P.M., ARSAD, M.S., YUSSOFF, A.C., HUNG, L.K., 2010 December, Colored Thin Film for Screening and Evaluation of Antioxidants, In Science and Social Research (CSSR), 2010 International Conference on , 717-720, IEEE.
106. GUO, Q., JI, S., YUE, Q., WANG, L., LIU, J., 2009, Antioxidant Sensors Based on Iron Diethylenetriaminepentaacetic Acid, Hematin, and Hemoglobin Modified TiO₂ Nanoparticle Printed Electrodes. *Analytical Chemistry*. 81, 5381-5389.

107. LIU, J., SU, B., LAGGER, G., TACCHINI, P., GIRAULT, H.H., 2006, Antioxidant Redox Sensors Based on DNA Modified Carbon Screen-Printed Electrodes. *Analytical Chemistry*. 78, 6879-6884.
108. JAYASRI, D., NARAYANAN, S.S., 2007, Manganese(II) Hexacyanoferrate Based Renewable Amperometric Sensor for the Determination of Butylated Hydroxyanisole in Food Products, *Food Chemistry*. 101, 607-614.
109. LIU, J., ROUSSEL, C., LAGGER, G., TACCHINI, P., GIRAULT, H.H., 2005, Antioxidant Sensors Based on DNA-Modified Electrodes, *Analytical Chemistry*. 77, 7687-7694.
110. ALIA, M., HORCAJO, C., BRAVO, L., GOYA, L., 2003, Effect of Grape Antioxidant Dietary Fiber on the Total Antioxidant Capacity and the Activity of Liver Antioxidant Enzymes in Rats. *Nutrition Research*. 23, 1251-1267.
111. YAMAMOTO, T., OHKUWA, T., ITOH, H., SATO, Y., NAOI, M., 2002, Effect of Gender Differences and Voluntary Exercise on Antioxidant Capacity in Rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 132, 437-444.
112. YAZDANPARAST, R., BAHRAMIKIA, S., ARDESTANI, A., 2008, *Nasturtium Officinale* Reduces Oxidative Stress and Enhances Antioxidant Capacity in Hypercholesterolaemic Rats. *Chemico-Biological Interactions*. 172, 176-184.
113. MILLER, J.C., MILLER, J.N., *Statistics for Analytical Chemists*, 3rd ed., Ellis Horwood and Prentice Hall, New York and London, 1993.
114. KANEKO, M., 2001, Charge Transport in Solid Polymer Matrixes with Redox Centers. *Progress In Polymer Science*. 26, 1101-1137.
115. STOCKER, R., GLAZER, A.N., AMES, B.N., 1987, Antioxidant Activity of Albumin-Bound Bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Science*. 84, 5918-5922.
116. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Solvent Effects on the Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants Measured by CUPRAC, ABTS/Persulphate and FRAP Methods. *Talanta*. 81, 1300-1309.
117. LITWINIENKO, G., INGOLD, K.U., 2003, Abnormal Solvent Effects On Hydrogen Atom Abstractions. The Reactions of Phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) in Alcohols. *Journal of Organic Chemistry*. 68, 3433-3438.
118. ABE, T., KANEKO, M., 2003, Reduction Catalysis by Metal Complexes Confined in a Polymer Matrix. *Progress In Polymer Science*. 28, 1441-1488.

119. FURBEE Jr, J.W., THOMAS, C.R., KELLY, R.S., MALACHOWSKI, M.R., 1993, Mediated Electrochemical Reduction of Cytochrome C and Tyrosinase at Perfluorosulfonated Ionomer Coated Electrodes, *Analytical Chemistry*. 65, 1654-1657.
120. DICKINSON, D.A., FORMAN, H.J., 2002, Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochememical Pharmacology*. 64, 1019-1026.

ÖZGEÇMİŞ

25.09.1983 tarihinde İstanbul'da doğdu. 1989 yılında Mecidiye İlkokulunda başladığı ilköğrenimini Mahmut Erseven İlköğretim ve Nilüfer Hatun İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra, Lise öğrenimine başladığı Beşiktaş Lisesi'nden 2000 yılında mezun oldu. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. Ekim 2005 tarihinde İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümüne bağlı Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Şubat 2009 tarihinde "Bitki Özütleri ve Tekstil Boyalarındaki Flavonoidler için Spektrofotometrik Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi" başlıklı tezini tamamlayarak Yüksek Kimyager ünvanını aldı. 2009 Şubat ayında aynı anabilim dalında Doktora Programına başladı. 2010 yılında yeterlilik sınavını vererek "Besin Özütleri ve Serumda Antioksidan Kapasite Ölçümü için Moleküler Spektroskopik Sensörler Geliştirilmesi" başlıklı tezinin çalışmalarına başladı. 2 Ocak 2010 tarihinde İ.Ü. Mühendislik Fakültesi'nde Araştırma Görevlisi olarak atandı. TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) tarafından yurt dışı doktora sırası burs programı (2214) kapsamında kazandığı burs ile ABD Louisiana State Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümünde 6 ay süre ile ziyaretçi araştırmacı olarak görev aldı. Halen Anorganik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.