T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İÇİN MİKROPLAKA ESASLI OPTİK SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

İrem Zehra KUBLAY

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mustafa BENER

Ocak, 2026

İSTANBUL

Bu çalışma, 13.01.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Prof. Dr. Sezgin BAKIRDERE
Yıldız Teknik Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakütesi

Dr. Öğr. Üyesi Furkan Burak ŞEN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2025-41825 numaralı projesi ile desteklenmiştir.
Bu tez, 224Z035 numaralı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında zengin bilimsel donanımı, yol gösterici yorumları ve değerli deneyimleriyle bana rehberlik eden, akademik gelişimime büyük katkılar sunan değerli danışmanım Doç. Dr. Mustafa Bener'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans sürecim boyunca sergilediği her daim ilgili, içten ve destekleyici yaklaşımı sayesinde çalışmalarımı daha verimli, düzenli ve azimle yürütmemi sağladığı için kendisine şükranlarımı sunuyorum.

Lisans eğitimimden bu yana bana bilim sevgisini ve kültürünü aşılayarak akademik yolculuğuma yön veren, engin bilgi birikimi ve değerli tecrübeleriyle bilimsel bakış açımı ve yeteneklerimi şekillendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Sezgin Bakırdere'ye en derin teşekkürlerimi sunarım. Beni her daim araştırmaya yönlendirerek ufkumu genişleten, karşılaştığım zorluklarda inancı ve sabrıyla bana güç vererek bilim yolunda sağlam ve hevesli adımlar atmamı sağlayan hocama, bugün geldiğim noktadaki katkılarından dolayı minnettarım.

Değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yol gösteren, laboratuvarda karşılaştığımız zorlukları sakinliği, çözüm odaklı yaklaşımı ve esprileriyle keyifli hale getiren Dr. Öğr. Üyesi Furkan Burak Şen'e teşekkür ederim. Kısa sürede kurduğumuz yakınlık sayesinde en stresli dönemleri paylaştığımız kahkahalarla hafifleten, laboratuvarın yoğun temposunu benim için keyifli bir serüvene dönüştüren Arş. Gör. Müge Yermeydan Peker ve Arş. Gör. Ervanur Elmas'a gönülden teşekkür ederim. Sadece birer mesai arkadaşı değil, karşılaştığım her zorlukta yanımda hissettiğim en büyük destekçilerimden oldukları için kendilerine minnettarım. Ayrıca, tüm Bener Araştırma Grubu üyelerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Akademik hayatımın önemli bir bölümünde koşulsuz desteğiyle yanımda olan, kendimi yetersiz hissettiğimde dürüst yaklaşımıyla yolumu bulmamı sağlayan Ayça Girgin'e ve motivasyonumun düşmesine asla izin vermeyip bana bir mentor gibi yol gösteren Tülay Borahan Kustanto'ya kalpten teşekkür ederim. Zorlandığım her anda beni sabırla dinleyip en stresli zamanları bile keyifli anlara dönüştüren Efe Sinan Aydın, Selim Gürsoy ve Nagehan Kübra Zeytinci'ye, dostluklarını ve sevgilerini her daim hissettiğim Miray Öner, Cansu Demir Yılmaz, Hilal Akbıyık ve Meltem Şaylan'a, laboratuvarda ilk mentorum olarak tüm sorularımı sabırla cevaplayıp bana çok şey öğreten Dr. Öğr. Üyesi Buse Tuğba Zaman'a teşekkür ederim.

Ve son olarak, varlıklarıyla her zaman güç veren, ne olursa olsun bana inanmaktan hiç vazgeçmeyen sevgili aileme yürekten teşekkür ederim. Bugüne kadar attığım her adımda yanımda olan, her başarımı benimle kutlayan ve beni koşulsuzca destekleyen aileme, bugün bu noktaya gelebilmemdeki en büyük güç kaynağım oldukları için sonsuz minnettarım. Her anıma şahit olan, en kötü günleri bile gülerek atlatmamı sağlayan, her duyguyu birlikte yaşadığım, maddi ve manevi tüm zorluklarda ailemden farksız bir şekilde yanımda duran sevgili ev arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim. Kendimi asla yalnız hissettirmeyen ve bu sürecin her anını daha anlamlı kılan tüm dostlarıma içtenlikle minnettarım.

Ocak 2026 İrem Zehra KUBLAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **4**
2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE OKSİDATİF STRES 4
2.2. ANTİOKSİDANLAR 6
2.3. ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI 8
2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar 9
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar 10
2.3.2.1. Vitaminler 10
2.3.2.2. Karotenoidler 12
2.3.2.3. Polifenoller 12
2.4. SENSÖRLER 16
2.4.1. Kimyasal Sensörler 17
2.4.1.1. Optik Sensörler 18
2.5. MİKROPLAKA ESASLI YÖNTEMLER 19
2.6. TAC YÖNTEMLERİ 20
2.6.1. Hidrojen Atom Transferi Esaslı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri 21
2.6.1.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi 21
2.6.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi 23
2.6.1.3. Luminol Yöntemi 23
2.6.1.4. Krosin Beyezlatma Yöntemi 23
2.6.2. Elektron Transferi Esaslı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri 24

2.6.2.1. Folin-Ciocalteu Yöntemi 24
2.6.2.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) /ABTS Yöntem 25
2.6.2.3. DPPH Radikal Süpürme Yöntemi 26
2.6.2.4. FRAP Yöntemi 27
2.6.2.5. CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite) Yöntemi 27
2.7. LİTERATÜR ÖRNEKLERİ 29
3. MALZEME VE YÖNTEM 30
3.1. KİMYASALLAR 30
3.2. CİHAZLAR 30
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 30
3.3.1. Geleneksel CUPRAC Yöntemi için Çözeltilerin Hazırlanması 30
3.3.2. Geliştirilen CUPRAC Yöntemi için Çözeltilerin Hazırlanması 31
3.3.3. Standart Antioksidan Bileşiklerin Hazırlanması 31
3.3.4. Çay ve Serum Örneklerinin Hazırlanması 31
3.3.5. İnterferans Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması 32
3.4. YÖNTEMLERİN UYGULANMASI 32
3.4.1. Geleneksel CUPRAC Yöntemi 32
3.4.2. Geliştirilen Mikroplaka Esaslı Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi 32
4. BULGULAR 34
4.1. CUPRAC REAKTİFLERİNİN OPTİMİZASYONU 34
4.2. KARIŞTIRMA SÜRESİ OPTİMİZASYONU 40
4.3. KİNETİK ÇALIŞMALARI 41
4.4. KARARLILIK ÇALIŞMALARI 42
4.5. ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KALİBRASYON GRAFİKLERİ 43
4.6. GERİ KAZANIM ÇALIŞMALARI 50
4.7. İNTERFERANS ÇALIŞMALARI 50
4.8. GERÇEK ÖRNEK UYGULAMALARI 51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 53
6. KAYNAKLAR 57
7. EKLER 70
8. ÖZGEÇMİŞ 71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 Serbest radikaller oluşumuna sebep olan çevresel faktörler ve sebep oldukları hastalıklar. 5

Şekil 2.2 Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki ilişki. 6

Şekil 2.3 Antioksidanların sınıflandırılması. 8

Şekil 2.4 α-tokoferolün kimyasal yapısı. 10

Şekil 2.5 Troloksun kimyasal yapısı. 11

Şekil 2.6 C vitaminin kimyasal yapısı. 11

Şekil 2.7 β-karotenin yapısı 12

Şekil 2.8 Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı. 13

Şekil 2.9 Flavonoidlerin kimyasal yapıları. 14

Şekil 2.10 Antosiyaninlerin pH'a bağlı değişimleri. 15

Şekil 2.11 Yaygın kullanılan fenolik asitlerin yapıları. 16

Şekil 2.12 Sensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi. 16

Şekil 2.13 96 kuyucuk içeren mikroplaka. 20

Şekil 2.14 Bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alan (AUC) grafiği. 22

Şekil 2.15 Folin-Ciocalteu yönteminin şematik gösterimi. 25

Şekil 2.16 ABTS$^{\bullet+}$ katyonunun yapısı. 26

Şekil 2.17 DPPH yönteminin şematik gösterimi. 26

Şekil 2.18 CUPRAC yönteminin şematik gösterimi. 27

Şekil 3.1 Geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensörün şematik gösterimi. 33

Şekil 4.1 TR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 35

Şekil 4.2 QR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 36

Şekil 4.3 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 36

Şekil 4.4 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 37

Şekil 4.5 TR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 38

Şekil 4.6 QR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 38

Şekil 4.7 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 39

Şekil 4.8 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki doğru denklemi. 40

Şekil 4.9 Karıştırma süresi optimizasyonu..... 40

Şekil 4.10 Kinetik çalışmaları absorbans değerleri grafiği. 41

Şekil 4.11 Stabilite çalışmasının 1. ve 90. gün görünümleri..... 42

Şekil 4.12 Kararlılık çalışmaları absorbans değerleri grafiği..... 43

Şekil 4.13 Troloksun geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 44

Şekil 4.14 Kuersetinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 45

Şekil 4.15 Gallik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 45

Şekil 4.16 Rutinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 46

Şekil 4.17 Askorbik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 47

Şekil 4.18 α-tokoferolün geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 47

Şekil 4.19 Bilirubinin optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 48

Şekil 4.20 Kateşinin optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği. 49

Şekil 4.21 Geliştirilen mikroplaka esaslı sensörün troloks tayini sırasında girişim yapıcı maddelerin absorbans üzerine etkisi. 51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1 TR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 35

Tablo 4.2 QR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 35

Tablo 4.3 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 36

Tablo 4.4 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 37

Tablo 4.5 TR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 37

Tablo 4.6 QR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 38

Tablo 4.7 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 39

Tablo 4.8 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki absorbans değerleri. 39

Tablo 4.9 Geliştirilen mikroplaka esaslı sensörün optimum parametreleri. 43

Tablo 4.10 Troloksun geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 44

Tablo 4.11 Kuersetinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 44

Tablo 4.12 Gallik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 45

Tablo 4.13 Rutinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 46

Tablo 4.14 Askorbik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 46

Tablo 4.15 α-tokoferolün geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 47

Tablo 4.16 Bilirubinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 48

Tablo 4.17 Kateşinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri. 48

Tablo 4.18 Antioksidan bileşiklerin geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör ile elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri. 49

Tablo 4.19 Siyah çay infüzyonunda antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3) 50

Tablo 4.20 Çay örneklerinin mikroplaka esaslı optik sensör ve geleneksel CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri. 51

Tablo 4.21 Serum örneklerinin mikroplaka esaslı optik sensör ve geleneksel CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri. 52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

A : Absorbans
°C : Derece santigrat
dk : Dakika
g : Gram
mg : Miligram
V : Hacim
% : Yüzde
α : Alfa
β : Beta
ε : Molar absorptivite
µL : Mikrolitre
e^- : Elektron

Kısaltmalar **Açıklama**

AA : Askorbik Asit
AAPH : 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidin) Dihidroklorür
ABTS : 2,2'-Azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat
ATP : Adenozin Trifosfat
AUC : İntegre Edilmiş Net Alan
BIL : Bilirubin
CAT : Katalaz
CUPRAC : Bakır (II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite
CT : Kateşin
GA : Gallik Asit
GSH : Glutatyon
GST : Glutatyon S-Transferaz

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DPPH : 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil

ET : Elektron Transferi

EtOH : Etanol

FC : Folin-Ciocalteu

HAT : Hidrojen Atomu Transferi

FRAP : Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç Yöntemi

mM : Milimolar

mmol : Milimol

NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit

Nc : Neokuproin

ORAC : Oksijen Radikali Absorbsiyon Kapasite Yöntemi

Prx : Peroksidoksin

QR : Kuersetin

RNS : Reaktif Azot Türleri

ROS : Reaktif Oksijen Türleri

RT : Rutin

SOD : Süperoksit Dismutaz

TAC : Toplam Antioksidan Kapasitesi

TEAC : Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite

TPTZ : Tripiridiltriazin

TR : Troloks

TRAP : Toplam Radikal Tutma Parametresi

TOC : α-tokoferol

UV : Ultraviyole

ÖZET

ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ İÇİN MİKROPLAKA ESASLI OPTİK SENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İrem Zehra Kublay

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Mustafa BENER

Biyolojik hücreler, oksijeni metabolize ederek potansiyel olarak zararlı olan reaktif oksijen/azot türleri (ROS/RNS) oluşturmaktadır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin sağlandığı durumlarda, oksidan oluşumunun hızı ve şiddeti, bu türlerin uzaklaştırılma hızı tarafından dengelenmektedir. Ancak, pro-oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge kaybı, oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres, hücrelerin işlevlerinde büyük etkiye sahiptir ve bunun sonucunda da yetersiz hücre işleyişine, diyabete, yüksek kan basıncına, çeşitli kalp hastalıklarına, Alzheimer ve Parkinson gibi birçok hastalığın gelişmesinde aktif rol oynamaktadır. Buna karşılık antioksidanlar, serbest radikalleri inhibe ederek veya onları kontrol altında tutarak hücrelere ve dokulara ciddi şekilde zarar veren oksidatif stresi azaltabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü antioksidan kapasite tayini, özellikle hem sağlık hem de gıda endüstrisi açısından büyük öneme sahiptir. Gıdalardaki antioksidan seviyelerinin tayini, bu ürünlerin besin değerlerini ve sağlık açısından faydalarını belirlemede kritik rol oynamaktadır. Ayrıca, antioksidan içeriğinin izlenmesi, gıdaların raf ömrünü uzatmak ve kalitesini korumak açısından da büyük öneme sahiptir. Antioksidanların kimyasal çeşitliliği, antioksidanları tek tek numune matriksinden ayırmayı ve miktarını belirlemeyi zorlaştırmaktadır. Bu doğrultuda, toplam antioksidan kapasiteyi yüksek doğruluk ve kesinlik gibi birçok avantaja sahip CUPRAC metodu esas alınarak doğrudan ölçüm yapılabilen optik bir sensörün geliştirilmesi gereklilik haline gelmiştir.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen toplam antioksidan kapasite ölçümü için düşük reaktif gerektiren, uygun maliyetli, kolay, yüksek verimli ve yenilikçi olan mikroplaka esaslı optik sensör geliştirilmiştir. Cu(II)-Nc kromojenik reaktifi bir mikroplaka içerisinde liyofilize edilerek optik sensör için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonrasında CUPRAC reaktifi birçok kuyucukta hazır şekilde bulunarak hızlı ve çoklu analizlere olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte antioksidan kapasitesini/aktivitesini belirlemek isteyen kullanıcıların reaktifleri tek tek hazırlama gereksinimi ortadan kalkmıştır. Önerilen optik sensör ile laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan mikroplaka okuyucularla kısa süreli, yüksek seçicilikte ve yüksek örnek sayılarına sahip analizlerin yapılmasına olanak sağlanmaktadır.

Ocak 2026, 87 sayfa.

Anahtar kelimeler: Antioksidan Kapasite, Optik Sensör, Mikroplaka, Pratik Ölçüm, CUPRAC

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A MICROPLATE BASED OPTICAL SENSOR FOR ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION

M.Sc. THESIS

İrem Zehra Kublay

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa BENER

Biological cells metabolize oxygen and, as a result, produce potentially harmful reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS). Under physiological conditions, the rate and extent of oxidant formation are balanced by their removal. However, disruption of the equilibrium between pro-oxidants and antioxidants leads to oxidative stress. Oxidative stress has a profound effect on cellular functions and is implicated in impaired cell functioning, as well as in the pathogenesis of diseases such as diabetes, hypertension, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. Antioxidants can reduce oxidative stress, which damages cells and tissues, by inhibiting free radicals or keeping them under control. The determination of antioxidant capacity is of great importance for both human health and food quality. Measuring antioxidant levels in foods is critical for evaluating their nutritional value and potential health benefits. Furthermore, monitoring antioxidant content is essential for extending the shelf life and preserving product quality. For these reasons, antioxidant capacity determination methods are highly important, particularly in health-related research and in the food industry. Moreover, the chemical diversity of antioxidants makes it difficult to isolate and quantify each antioxidant individually from a sample matrix. Therefore, the development of methods capable of directly measuring total antioxidant capacity is of significant importance. Antioxidant capacity/activity

values obtained using the CUPRAC method, which offers major advantages over existing techniques, provide high precision and accuracy.

Within this framework, an optical sensor based on a microplate platform was developed in this thesis for the measurement of total antioxidant capacity. The proposed method requires only minimal amounts of reagents, is cost-effective, rapid, high-throughput, and allows the simultaneous analysis of multiple samples. The Cu(II)-Nc chromogenic reagent was lyophilized within a microplate and prepared in a ready-to-use form for the optical sensor. Following lyophilization, the CUPRAC reagent remained preloaded in multiple wells, enabling fast and parallel analyses. With the developed method, users no longer need to individually prepare reagents for antioxidant capacity/activity determination. The optical sensor allows analyses to be performed using microplate readers, which are widely used in laboratories, offering short analysis times, low costs, and the ability to process large numbers of samples.

January 2026, 87 pages.

Keywords: Antioxidant Capacity, Optical Sensor, Microplate, Practical Measurement, CUPRAC

1. GİRİŞ

Yaşam döngüsünde önemli bir yeri olan oksijen elementinin insan metabolizması üzerine negatif etkilere sebep olduğu durumlar mevcuttur. Süperoksit anyon radikali ($O_2\bullet^-$), singlet oksijen (O_2), ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) insan vücudunda oksijen ile oluşmaktadır. Bunlara ek olarak, azot dioksit radikali ($NO_2\bullet$) ve nitrik oksit radikali ($NO\bullet$) gibi bazı reaktif azot türleri (RNS) de vücut için zararlı etkilere sahiptir [1]. Serbest radikaller, vücudumuzda metabolik süreçler sonucunda oluşabileceği gibi hava kirliliği, ultraviyole ışınlar, alkol tüketimi, sigara dumanına maruz kalma ve bazı ilaçların kullanımı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak da meydana gelmektedir [2]. Bu reaktif türlerin oluşumu ile organizmanın antioksidatif savunmaları arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres (gerilim) olarak adlandırılan durum meydana gelmektedir [3]. Hücrelerin işlevlerinde büyük etkiye sahip olan oksidatif stres, canlılar için kilit rol oynayan DNA, protein, lipit ve hücre zarları gibi biyolojik yapılara zarar vererek birçok hastalığın gelişmesinde aktif rol oynamaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson ve Alzheimer), kanser ve diyabet bunların arasında sayılmaktadır [1].

Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidatif stresin hücresel ve doku düzeyindeki zararlarını azaltan bileşiklerdir. Oksidatif süreçleri kontrol etme mekanizmalarına göre toplayıcı etki, bastırıcı etki, zincir kırıcı etki ve onarıcı etki olarak dört kategoride incelenmektedir [2]. Toplayıcı etki, serbest radikal oluşumunu veya serbest radikallerin dahil olduğu reaksiyonları etkileyerek daha az reaktif moleküle dönüştürmektedirler. Enzimatik antioksidanlar (SOD, GSH-Px, katalaz) bu kategoride bulunmaktadır [4]. Bastırıcı etki, radikal türlerin oluşumunu bloke ederek diğer radikallerin üretimine neden olabilecek veya serbest radikale dönüşme potansiyeli taşıyan herhangi bir kimyasal türü nötralize ederek oksidatif süreçleri önleyen antioksidanlardan oluşmaktadır. Askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu kategoriye dahildir [5]. Zincir kırıcı etki, radikal süpürücü antioksidanlar, yeni oluşan radikallere elektron vererek nötralize etmektedirler. Bu kategoriye hidrofobik antioksidanlar (askorbik asit, glutatyon, ürik asit) ve lipofilik antioksidanlar (α-tokoferol ve ubiquinol) dahildir [6]. Son olarak onarıcı etki, serbest

radikal hasarının meydana gelmesinden sonra harekete geçen türlerdir. Bu grup oksitlenmiş/hasar görmüş proteinleri, lipidleri ve DNA'yı parçalayarak hücresel birikimlerini önleyen ya da onaran enzimlerden oluşmaktadır. Bu türün en yaygın örnekleri arasında DNA onaran enzimler (polimeraz, glikozilazlar ve nükleazlar), proteolitik enzimler (peptidazlar, proteazlar ve proteinazlar) bulunmaktadır [7]. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar, reaktif türlerin zarar verici etkilerini karşılamaktadır.

Oksidatif stresin canlı organizmalara verebileceği zararlar ve hastalık riskleri göz önünde bulundurulduğunda antioksidanların tayinine yönelik önem ve ilgi artmaktadır. Literatürde buna yönelik birçok çalışma ve yöntem bulunmaktadır. Antioksidan kapasite/aktivite tayinine yönelik metotlar iki temel grupta incelenmektedir. Hidrojen Atom Transferi (HAT) yöntemleri, bir antioksidanın serbest radikalleri hidrojen atomu transferi yoluyla sönümleme kapasitesini ölçmektedir. Antioksidan kapasitesini ölçmek için HAT mekanizması genellikle radikal başlatıcılarla (peroksitler veya azo boyar maddeler) birlikte kullanılmaktadır. Antioksidanın etkisi incelenirken, oluşan serbest radikaller için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmalı kinetik reaksiyonları kullanılmaktadır [12]. HAT yöntemlerinin en yaygın kullanılanları ORAC [8] (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) ve TRAP [9] (Toplam Radikal Tutma Parametresi) tayin yöntemleridir. Elektron transferine (ET) dayalı toplam antioksidan kapasitesi (TAC) yöntemleri ise, çeşitli radikal ve radikal katyonların indirgenmesi yoluyla antioksidanların elektron verme kapasitesi ile değerlendirilmektedir. ET temelli TAC analizleri iyi bir hassasiyete sahiptir, çünkü indirgenmiş ve orijinal probların absorpsiyon veya floresans yoğunlukları arasındaki fark doğrudan ölçülmektedir [10]. Kullanılan başlıca tayin yöntemleri; ABTS/TEAC [11] (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat/Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite), DPPH [12] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), FRAP [12] (Demir(III) İndirgeme Antioksidan Gücü), CUPRAC [13] (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite), Folin-Ciocalteu [14] toplam fenolik içerik tayini yöntemleridir. Tüm bu yöntemlerin avantajları olduğu kadar birtakım sınırlamaları da vardır. Bu sebeple literatüre yeni antioksidan tayin yöntemlerinin kazandırılması kadar mevcut yöntemlerin iyileştirilmesi ve geliştirilmesi üzerine yapılan modifikasyon, kit ya da sensör çalışmaları son yıllarda önem kazanmıştır [15].

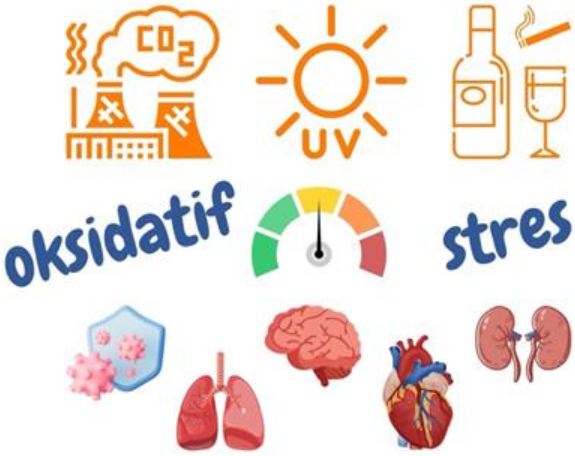
Bu tezin amacı, toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde düşük reaktif ve solvent gerektiren, hızlı, maliyet açısından avantajlı, yeşil kimya ilkelerini önceleyen, yüksek verimli ve çoklu analize imkân tanıyan mikroplaka tabanlı bir optik sensör geliştirilmesidir. Bu

kapsamda mevcut antioksidan tayin yöntemlerine birçok üstünlüğü olan ulusal ve özgün bir yöntem olan CUPRAC yöntemi seçilmiştir. Yöntemin antioksidanlara yanıt verme seçimliliği ve yüksek duyarlılığı, geniş çalışma aralığı hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilirliği, diğer analitik tekniklerle uyumlu bir şekilde çalışılabilmesi ve modifiye edilebilir olması gibi birçok avantajı mevcuttur. Bu kapsamda, denemelerin ilk aşamasında Cu(II)-Nc kromojenik reaktifinin liyofilize edilerek optik sensör uygulamalarında kullanılması için hazır forma dönüştürülmesi hedeflenmiştir. İlk optimizasyonda reaktifin, örnek çözeltilerdeki antioksidanların verimli ve hassas tayini için uygun konsantrasyon ve hacimde kuyucuklara sabitlenmesi çalışılmıştır. Sonraki aşamalarda hazır hale getiren CUPRAC reaktifi immobilize mikroplakalar antioksidan çözeltileri ile muamele edilmiştir ve çözeltinin mikroplaka okuyucu ile verdiği absorbans değerleri incelenmiştir. Geliştirilen yöntem için mikroplaka okuyucu içinde karıştırma süresi ve inkübasyon süresi optimize edilmiştir. Yöntemin analitik performansının değerlendirilebilmesi adına standart antioksidan bileşiklerin (gıdalarda ve biyolojik örneklerde yaygın olarak bulunan) kalibrasyon doğruları oluşturulup sentetik bir antioksidan olan troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) belirlenmiştir. Analizi yapılan her bir antioksidan bileşiği için kalibrasyon eğrisi kullanılarak doğru denklemleri, lineer çalışma aralıkları ve molar absorplama katsayıları hesaplanmıştır. Elde edilen TEAC değerleri ile geleneksel CUPRAC yöntemi ile elde edilmiş değerler karşılaştırılmıştır. Bir diğer aşamada geliştirilen sensörün tekrarlanabilirlik ve doğruluk parametrelerinin incelenmesi amacıyla çay preparatları hazırlanmıştır. Preparatların içerisinde bulunan antioksidan bileşenlerden bazılarının katkısı yapılarak mikroplaka esaslı CUPRAC yönteminin doğruluğu ve kesinliğinin araştırılması için yüzde geri kazanım, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, geliştirilen yöntem ile yapılacak antioksidan tayinlerinde gerçek örneklerde yaygın olarak bulunan ama antioksidan kategorisinde bulunmayan çeşitli kimyasal bileşiklerin (oksalat, tartarat, sitrat, indirgen şekerler vb.) girişim etkileri incelenmiştir. Tez çalışmasının son aşamasında ise, gerçek örnek çalışmaları kapsamında çay örnekleri ve sentetik serum örnekleri kullanılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE OKSİDATİF STRES

Redoks reaksiyonları, canlı organizmada oksidasyon için havadan oksijen kullanan ve ATP formunda enerji sağlayan bir kimyasal reaksiyon zincirinin gerçekleştiği sistemlerdeki ana reaksiyonlardır. Oksijen, diğer elementlerle ve bileşiklerle kolaylıkla etkileşime girerek oksitler oluşturabilen oldukça reaktif bir ametaldir. Yaşam döngüsünde önemli bir yeri olan oksijen elementinin insan metabolizması üzerine negatif etkilere sebep olduğu durumlar mevcuttur. Temel haldeki moleküler oksijenin iki ayrı antibağ orbitalinde paralel spinlere sahip iki eşleşmemiş elektronu spin kısıtlamasına neden olur. Bu sebeple bir elektron vericisinden bir elektron çifti kabul edebilir. Ayrıca, elektronları bir atomdan diğerine aktarabilir ve ATP formunda enerji sağlayan elektron akış sistemindeki nihai elektron alıcısı olduğundan aerobik yaşamın ve metabolizmamızın temel bir parçasını temsil etmektedir. Ancak bu elektron akışı/transferi bozulduğunda serbest radikaller meydana gelir ve oksijen, azot ve kükürt kaynaklı olabilirler. Değerlik kabuklarında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip serbest radikaller, diğer moleküllerle kimyasal reaksiyona girmeye oldukça istekli ve aktif moleküllerdir/iyonlardır [16–18]. Başlıca serbest radikaller; hidroksil radikali (•OH), süperoksit anyon radikali ($O_2\bullet^-$), peroksil radikali (ROO•), hidrojen peroksit (H_2O_2). Bunlara ek olarak, azot dioksit radikali ($NO_2\bullet$) ve nitrik oksit radikali (NO•) gibi bazı reaktif azot türleri (RNS) de vücutta zararlı etkilere sahiptir. Serbest radikaller, vücudumuzda metabolik süreçler sonucu oluşabileceği gibi hava kirliliği, ultraviyole ışınlar, alkol tüketimi, sigara dumanına maruz kalma ve bazı ilaçların kullanımı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak meydana gelmektedir [19]. Bu reaktif türlerin oluşumu ile organizmanın karşı koyan antioksidatif savunmaları arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres olarak adlandırılan durum meydana gelir. Hücrelerin işlevlerinde büyük etkiye sahip olan oksidatif stres, canlılar için kilit rol oynayan DNA, protein, lipit ve hücre zarları gibi biyolojik yapılara zarar vererek birçok hastalığın gelişiminde aktif rol oynamaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar [20], bağışıklık sistemi hastalıkları [21,22], nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson ve Alzheimer) [23,24], kanser [25] ve diyabet [26] bunların arasında sayılmaktadır.

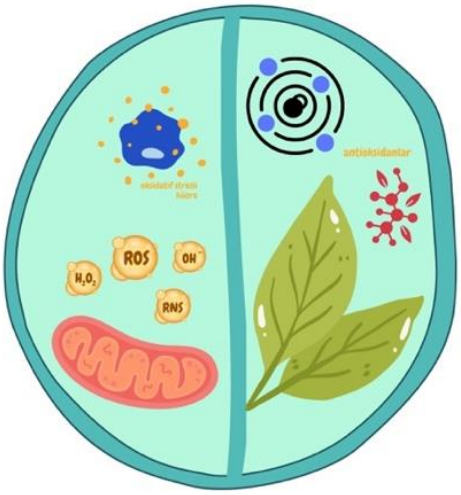


Şekil 2.1 Serbest radikaller oluşumuna sebep olan çevresel faktörler ve sebep oldukları hastalıklar.

Bazı serbest radikal türlerinin önemli fizyolojik rolleri olduğundan antioksidan savunma sistemleri bunları tamamen ortadan kaldıramaz ve bu nedenle biyomoleküllerde belirli bir düzeyde oksidatif hasar sürekli meydana gelir. Bu noktada antioksidanların farklı etki mekanizmaları ve savunma düzeyleri etkin rol oynamaktadır [27]. Antioksidan savunma düzeyi kişiden kişiye, dokudan dokuya, hücre tipinden hücre tipine, hatta dokudaki hücreler arasında (örneğin O_2 konsantrasyonundaki farklılıklara bağlı olarak) değişiklik gösterebilmektedir. Hatta mitokondri gibi farklı hücre altı organeller içinde bile farklılıklar bulunur, buna bağlı olarak bazı araştırmalar kadınların erkeklerden daha uzun ömürlü olmasının artmış antioksidan enzim düzeyleri ve daha düşük vücut demir depolarıyla (adet döngüsü sonucu) ilişkili olabileceğini öne sürmektedir [28]. Biyolojik ortamlarda ROS kimyasının son derece karmaşık/kompleks mekanizmasını ve çeşitli etkilerini incelemek ve anlamlandırmak disiplinler arası yaklaşımlar gerektirmektedir. Kısa ömürleri (kararsızlıkları) sebebiyle ROS miktarının doğrudan ölçümleri zor olduğu için literatürdeki çalışmaların çoğunda oksidatif stres seviyesinin değerlendirilmesi DNA hasarı, membran peroksidasyonu ve protein modifikasyonu seviyelerinin dolaylı ölçümlerine dayanmaktadır. Geliştirilen analitik yöntemler, kanser, nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik ve ciddi hastalıkların kökeni ve tedavisine yönelik yapılan çalışmalara öncülük etmiştir [29,30].

2.2.ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar, serbest radikalleri inhibe ederek veya onları kontrol altında tutarak hücrelere ve dokulara verilen zararı önleyen moleküllerdir. İnsan vücudu tarafından üretilebilir, diyet yoluyla alınabilir veya hastalıkların tedavisi için tasarlanmış/geliştirilmiş sentetik bileşikler şeklinde bulunmaktadırlar [31].



Şekil 2.2 Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki ilişki.

İşlevsel mekanizmalarına göre birincil ve ikincil olarak iki ana gruba ayrılan antioksidanlar organik veya inorganik yapıda olabilirler [32]. Birincil antioksidanlar, hidrojen verici ya da alıcıları olarak oksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek radikal türleri daha kararlı hale veya radikal olmayan türlere dönüştürerek etki etmektedirler [33]. İkincil antioksidanlar ise tekli oksijeni etkisiz hale getirir, peroksitleri parçalayarak radikal olmayan türlere dönüştürür, pro-oksidatif metal kelatları oluşturur, oksidatif enzimleri inhibe eder veya UV radyasyonunu absorplarlar. Birincil antioksidanlarla birlikte sinerjik etki gösterebilirler. Asidik bir ortam yaratarak birincil antioksidanları stabilize etme, hidrojen atomu vererek birincil antioksidanları yenileme, moleküler oksijeni etkisiz hale getirme gibi katkıları mevcuttur [34,35].

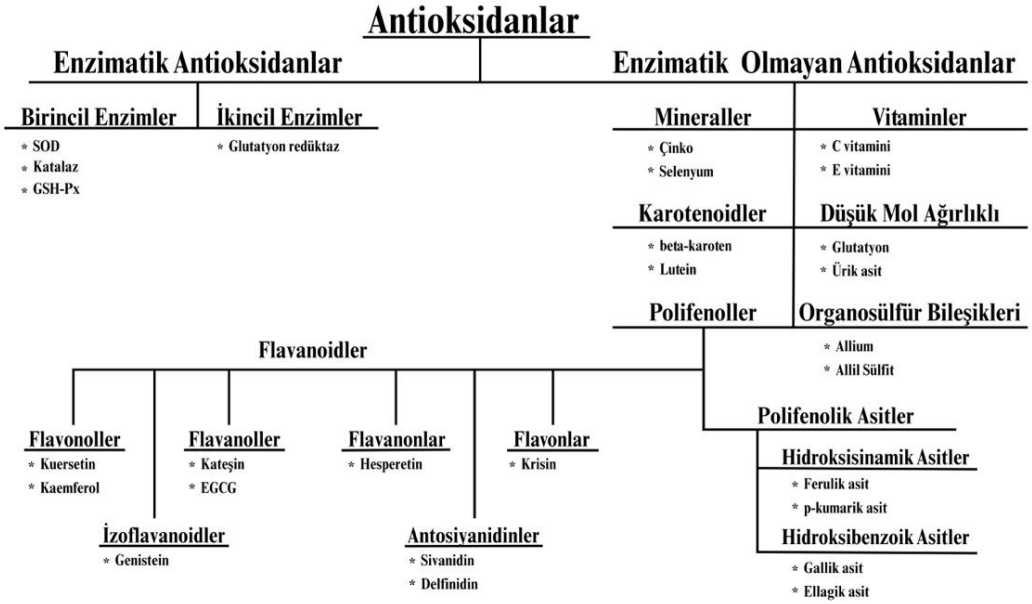
Antioksidanlar, oksidatif strese karşı savunma sistemindeki rolleri temel alınarak toplayıcı etki, bastırıcı etki, zincir kırıcı etki ve onarıcı etki olarak dört kategoride incelenmektedir [2]. Toplayıcı etki, serbest radikal oluşumunu veya serbest radikallerin dahil olduğu reaksiyonları etkileyerek daha az reaktif moleküle dönüştürmektedir. Enzimatik antioksidanlar (SOD, GSH-

Px, katalaz) bu kategoride incelenmektedir [4]. Bastırıcı etki, radikal türlerin oluşumunu baskılayarak diğer radikallerin üretimine neden olabilecek veya serbest radikale dönüşme potansiyeli taşıyan herhangi bir kimyasal türü nötralize ederek oksidatif süreçleri önleyen antioksidanlardan oluşmaktadır. Askorbik asit (C vitamini), α-tokoferol (E vitamini) ve flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu kategoriye dahildir [5]. Zincir kırıcı etki, radikal süpürücü antioksidanlar, yeni oluşan radikallere elektron vererek nötralize ederler. Bu kategoriye hidrofobik antioksidanlar (askorbik asit, glutatyon, ürik asit) ve lipofilik antioksidanlar (α-tokoferol ve ubiquinol) dahildir [6]. Son olarak onarıcı etki, serbest radikal hasarının meydana gelmesinden sonra harekete geçen türlerdir. Bu grup oksitlenmiş/hasar görmüş proteinleri, lipidleri ve DNA'yı parçalayarak hücresel birikimlerini önleyen ya da onaran enzimlerden oluşmaktadır. Bu türün en yaygın örnekleri arasında DNA onaran enzimler (polimeraz, glikozilazlar ve nükleazlar) ve proteolitik enzimler (peptidazlar, proteazlar ve proteinazlar) bulunmaktadır [7]. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar, reaktif türlerin zarar verici etkilerini karşılayabilir. Antioksidanlar, yükseltgenebilir bileşikler olduğu için zincir reaksiyonlarını sonlandırırken kendileri de yükseltgenerek yapısal bütünlüklerini kaybederler. Bu nedenle, antioksidanlar yükseltgenebilir bileşikleri (örneğin biyolojik makromolekülleri) yalnızca sınırlı bir süre koruyabilir ve belirli bir süre sonra ise ortamda bulunmuyormuş gibi oksidatif süreçler devam edebilir [15].

Antioksidanların elektron ya da hidrojen donörü olarak indirgeme potansiyelleri, kimyasal aktiviteleri, sıklıkla serbest radikal süpürme kapasiteleri ile tanımlanmaktadır. Zincir kırıcı antioksidanların etkinliğinin değerlendirilmesi reaksiyon gerçekleşme hızı ve antioksidanın her bir molekül için verebildiği elektron ya da etkisiz hale getirilebilen serbest radikal sayısına bağlıdır. Antioksidan aktivite, belirli bir oksidan ile belirli bir antioksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini temsil eder ve bazı temel faktörlere bağlıdır. Bu faktörler; serbest radikal süpürme kapasitesi, elektron ya da hidrojen donörü olarak gösterdiği reaktivite (genellikle redüksiyon potansiyeliyle ilişkilidir), metal iyonlarını kelatlama potansiyeli, diğer antioksidan bileşikler ile olan sinerjik etkisi olarak sıralanmaktadır [36].

2.3.ANTİOKSİDANLARIN SINIFLANDIRILMASI

Antioksidanlar etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve kaynaklarına göre farklı sınıflandırılmalara sahiptir. Temel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar.



Şekil 2.3 Antioksidanların sınıflandırılması.

Ekzojen antioksidanlar, beslenme yoluyla dışarıdan alınanlardır ve bu grubun büyük bir kısmını polifenol bileşikler oluşturmaktadır. Antioksidanların bir kısmı enzimler ve enzim ko-faktör gibi endojen olarak hücreler tarafından sentezlenir ve genellikle ekzojen antioksidanlardan çok daha güçlüdürler. Sonuç olarak endojen antioksidanlar hücresel metabolizmanın ürünleridir ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksiredoksin (Prx) gibi enzimatik, ya da glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanları içermektedir. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan endojen antioksidanlar, hücresel antioksidan savunmayı güçlendirmek ve ROS düzeylerini azaltarak oksidatif stresi önlemek için birbirleriyle etkileşen karmaşık bir sistem oluşturmaktadırlar [37].

2.3.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini azaltmak için sinerjik bir biçimde çalışan kompleks bir sistemden oluşurlar. Bu antioksidan enzimlerin her biri hücresel oksidatif dengeyi korumak adına kendine özgü roller üstlenir [18,38].

SOD, O_2 varlığında yaşayan tüm organizmalarda bulunan ve iki süperoksit radikal anyonunu ($O_2\bullet^-$) hidrojen peroksit ve oksijene dönüştüren metalloenzim grubudur. Bu reaksiyon, SOD enzimlerinin aktif bölgelerinde bulunan metal iyonlarının (Cu, Zn veya Mn) yükseltgenme/indirgenme döngüleriyle gerçekleşmektedir [38]. Bu enzimdeki metal iyonları, katalitik aktiviteyi sağlayan ko-faktör olarak görev yaparlar. SOD'lar, ($O_2\bullet^-$)'nun uzaklaştırılmasıyla bu zararlı türlerin oluşumunu engeller ve oksidatif stresi azaltırlar. Oksidatif stresin kanser gelişiminde rol oynaması nedeniyle, SOD aktivitesindeki azalma kanser oluşumunu tetikleyen temel faktörlerden biridir [39].

$$2O_2\bullet^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

CAT, hidrojen peroksitin indirgenmesinde son derece etkili bir enzimdir, iki H_2O_2 molekülünü bir O_2 ve iki H_2O molekülüne ayırır [40]. Bu enzim, peroksizomlar ve mitokondriler gibi hücresel bölgelerde bulunur ve ROS seviyelerini azaltır. H_2O_2 seviyelerinin düzenlenmesi, redoks dengesinin ve hücresel sinyallemenin korunması, bu süreçlerle ilişkili hastalıkların önlenmesi açısından önemlidir [41].

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½\ O_2$$

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), mitokondri ve sitozolde bulunan hücrelerdeki peroksitin detoksifikasyonundan sorumlu son derece önemli bir enzimdir. Hücrelerdeki indirgenmiş GSH yükseltgenmiş glutatyona (GSSG) dönüştürülerek peroksitlerin indirgenmesi katalizlenir. GSH-Px oluşan hidrojen peroksiti gidermek için glutatyonu hidrojen donör olarak kullanmaktadır. Hücrede gerçekleşen bu reaksiyonlar, hücresel membranları koruyarak oksidatif stresin canlı organizmalara verdiği zararı önlemektedirler [42].

$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$

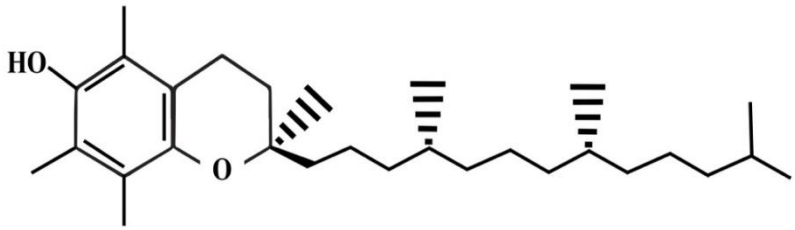
Glutatyon S-Transferaz (GST), antibiyotikler gibi ksenobiyotiklerin ve endojen bileşiklerin metabolizmasıyla ilişkili bir enzimdir. GST karaciğerde bol miktarda bulunur ve bilirubin taşınması ile ilişkilidir. Metabolizmanın ikinci aşamasında yer alır ve toksik elektrofilik bileşiklerin elimine edilmesi için GSH ile konjuge bir şekilde çalışır. Bu şekilde, hücresel biyomolekülleri hem endojen hem de eksojen reaktif bileşiklerin saldırısından korumuş olur [43,44].

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan biyolojik antioksidanlar genellikle serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak görev yaparlar. Bu antioksidanların bir kısmı sitoplazma ya da hücre matriksinde bulunarak suda çözünürken bir kısmı hücre zarında yer alarak yağda çözünürler [45].

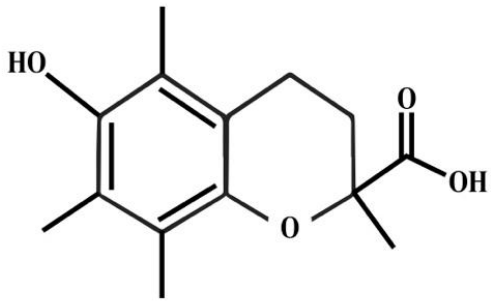
2.3.2.1.Vitaminler

E vitamini, tokoferoller ve tokotrienoller olarak adlandırılan 8 farklı moleküler formda bulunan yağda çözünen doğal bir antioksidandır. Tokoferoller, yapılarında yer alan hidroksil grubundan lipid peroksil radikaline hidrojen transferi gerçekleştirerek lipid peroksidasyon zincirini kırar ve hücre membranlarını oksidatif hasara karşı korur. Bu yapılar arasında α-tokoferol (Şekil 2.4), en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan form olup insan vücudunda en yaygın olarak bulunan türdür [46].



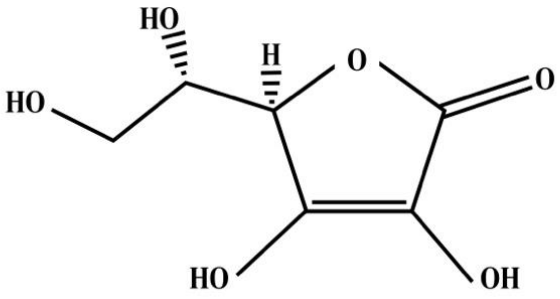
Şekil 2.4 α-tokoferolün kimyasal yapısı.

Yağda çözünebilen tokoferollerden farklı olarak sentetik bir antioksidan olan troloks (TR) suda çözünme özelliğine sahiptir. Hem hidrofilik hem de lipofilik hücresel bölgelere geçiş yapabilme yeteneği sayesinde çeşitli hücre yapılarında etkili olabilmektedir. Hücrelerin H_2O_2 alımını azaltarak antioksidan savunma sisteminin etkinliğini arttırmakta ve endojen antioksidan enzimlerin aktivitesini desteklemektedir [47]. Ayrıca TR, plazma ya da serumda bulunan tüm antioksidan bileşiklerin toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde referans madde olarak yaygın şekilde kullanılmakta olup sonuçlar genellikle TR eşdeğeri cinsinden ifade edilir [48].



Şekil 2.5 Troloksun kimyasal yapısı.

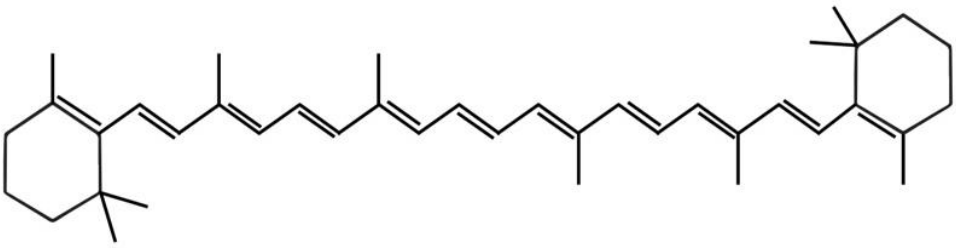
Askorbik asit, C vitamini, suda iyi çözünebilen doğal bir antioksidandır. İnsan vücudunda önemli olan hidroksilasyon reaksiyonunda görev almaktadır. C vitamininin biyokimyasal aktivitesi, kimyasal kelatlama (metal iyonlarını bağlama) ve indirgeme özelliklerinden kaynaklanmaktadır [49]. Askorbik asit, serbest radikalleri temizleme sürecinde indirgenen E vitaminini yeniden aktif forma (indirgenmiş forma) dönüştürür. E ve C vitamini radikalleri arasındaki etkileşim yalnızca homojen çözeltilerde değil aynı zamanda liposomal zarlar içinde de gerçekleşebilir [50].



Şekil 2.6 C vitaminin kimyasal yapısı.

2.3.2.2.Karotenoidler

Karotenoidler, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan yağlarda çözünen pigmentlerdir. Bitkiler tarafından sentezlenirler ve hayvansal hücreler için de büyük öneme sahiptirler. Doğada 600'den fazla farklı türü vardır [51]. En bilinen türleri β-karoten, lutein, zeaksantin ve likopen yapılarıdır. Konjuge çifte bağları sayesinde açık sarıdan kırmızıya kadar geniş bir spektrumda gözlemlenebilirler. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin spesifik renklerde olmasına olanak sağlarlar. β-karotenin sahip olduğu antioksidan aktivitesi sayesinde A-provitamini olarak bilinir [36].



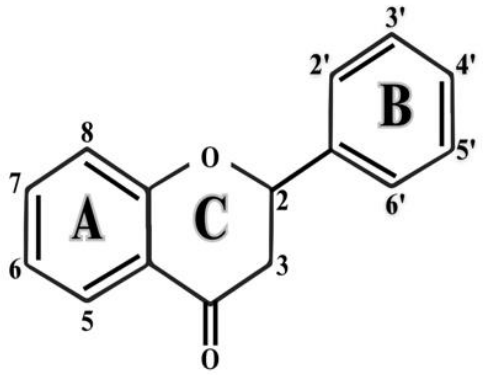
Şekil 2.7 β-karotenin yapısı.

2.3.2.3.Polifenoller

Polifenoller, bitkisel kökenli gıdalarda yaygın olarak bulunan fitokimyasalların en geniş kategorisini oluşturan bileşiklerdir. Bitkiler bu bileşikleri ikincil metabolit mekanizmasının bir ürünü olarak sentezlemektedir. Bunların bir kısmı bitkinin fizyolojik işlevleri için kullanılırken bir kısmı da stres ve çevresel uyarıcılara karşı savunma işlevinde rol oynamaktadır. Polifenollerin başlıca grupları flavonoidler, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar ve fenolik alkollerdir [18]. Bu bileşikler antioksidan aktiviteye sahip olduklarından doğal eksojen antioksidanlar olarak kabul edilirler. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi yapısal özelliklerine (benzen halkası ve hidroksil gruplarının sayısı ve konumu) bağlıdır. Bu özellikleri onların metabolik redoks reaksiyonlarına katılmasını sağlamaktadır [52]. Fenoliklerin yapısı, serbest radikal substratlara proton transferi yoluyla elektron veya hidrojen atomu aktararak çoğu oksitleyici türü etkisiz hale getirmelerine olanak tanır, böylece radikal olmayan ürünler oluşmaktadır. Yapılarındaki çoklu hidroksil grupları sayesinde metal iyonlarıyla kompleks oluşturarak iyonları bağlayabilirler. Ayrıca ROS üreten enzimlerin (örneğin; ksantin oksidaz ve

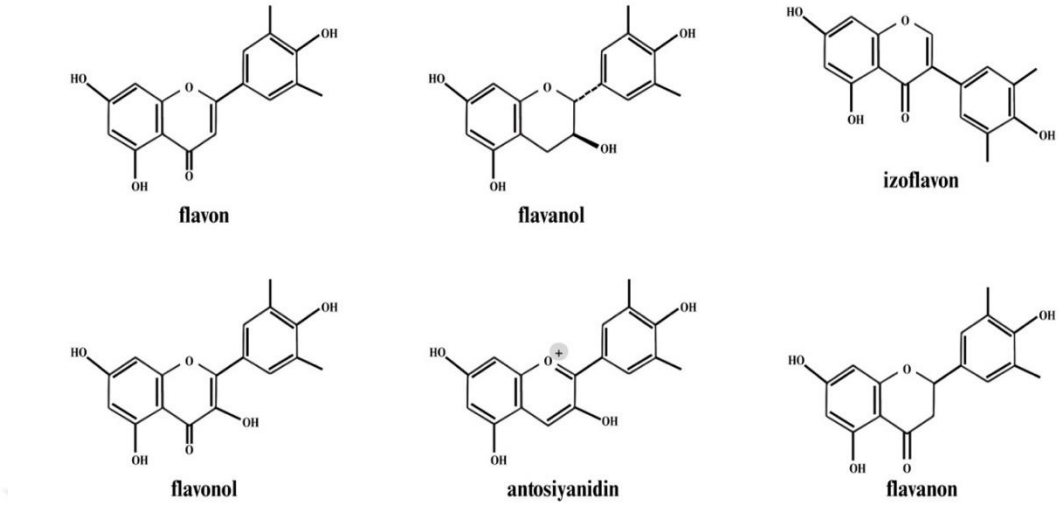
NADPH oksidaz) aktivitesini baskılayabilirken antioksidan enzimlerin (örneğin; SOD ve CAT) aktivitesini arttırabilirler [53,54].

Flavonoidler, iki fenil halkasının heterosiklik bir piron halkası aracılığıyla birbirine bağlanması sonucu oluşan ve aromatik halkalarında hidroksil grubu bulunduran düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir [50]. Yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halkaysa C ile adlandırılır. C halkasındaki oksijen ile başlayarak karbon atomları, B halkasında bulunan karbon atomları ise üssü (‘) rakamlarla ifade edilir (Şekil 2.8). Antioksidan özellikleri yapılarındaki aromatik halkalara ve bağlı hidroksil gruplarına göre değişmektedir. Flavonoidler genellikle glikozitler (O-glikozitler ve C-glikozitler) şeklinde bulunur ve günümüzde 4000’i aşkın flavonoid türü tanımlanmıştır [36,55].



Şekil 2.8 Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

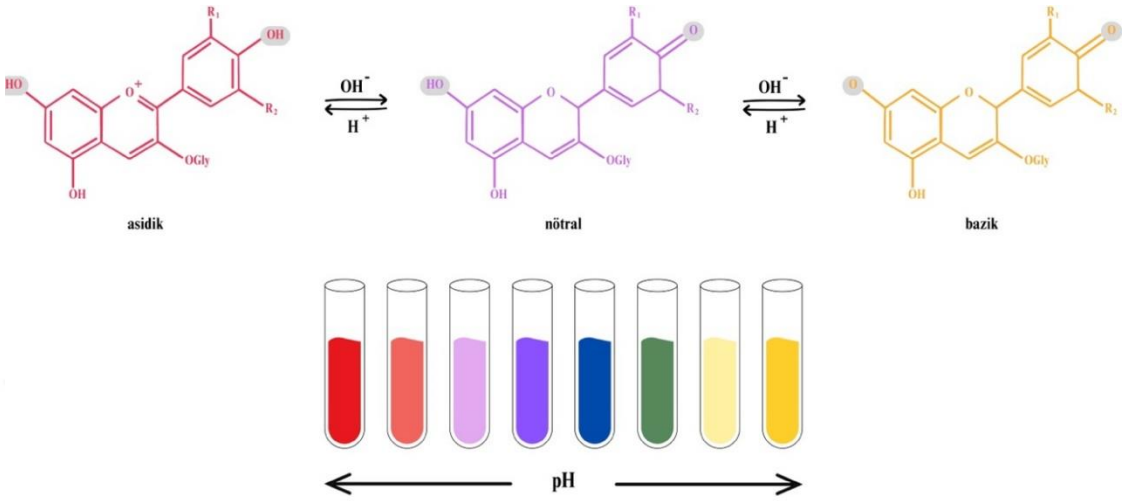
Flavonoidlerin sınıflandırılması genellikle kimyasal yapılarına göre yapılmaktadır. Fonksiyonel gruplarının varlığı, heterosiklik halkadaki oksidasyon durumu, hidroksil gruplarının sayısı ve konumu gibi kriterlere bağlı olarak çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Başlıca alt grupları şunlardır; flavoneller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyanidinler ve flavanoller (Şekil 2.9) [50,56].



Şekil 2.9 Flavonoidlerin kimyasal yapıları.

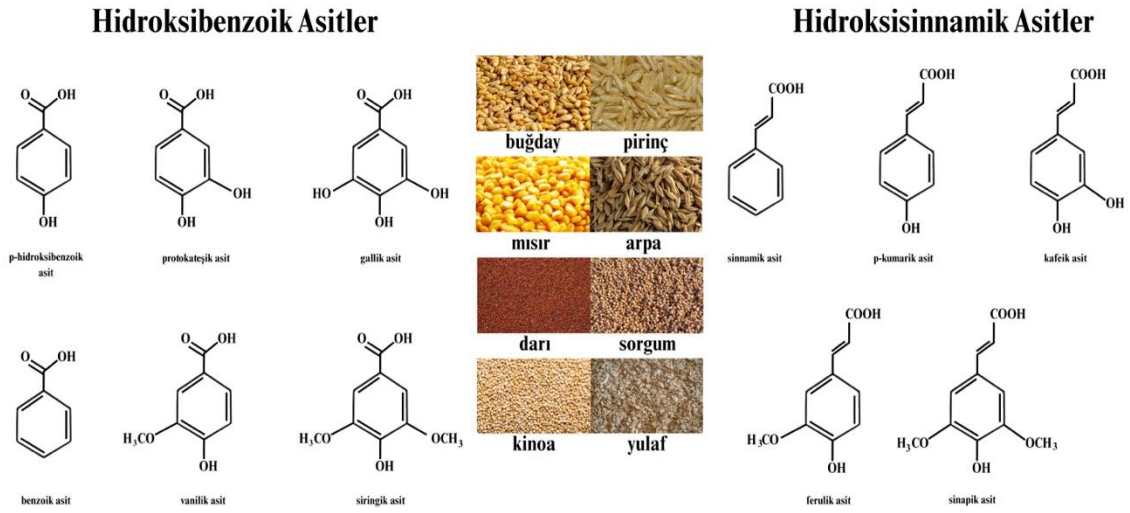
Polifenoller bakımından zengin gıdalar arasında çeşitli meyveler (özellikle kırmızı meyveler), kakao, üzüm ve çay bulunur. Bu gıdalar ve bunlardan türetilen ürünler de antioksidan bakımından zengindir. Böğürtlen, yaban mersini, çilek ve ahududu gibi meyveler özellikle antosiyaninler bakımından oldukça zengindirler [57]. Kakaoda bulunan flavanoller ise başlıca epikateşin, kateşin ve prosiyanidin formlarındadır [58]. Şarapta temel polifenoller kateşinler ve proantosiyanidinlerdir. Benzer şekilde, kahve ve çay da yüksek antioksidan içeriğine sahiptir ve sık tüketilmeleri sebebiyle diyet yoluyla alınan antioksidan kaynaklarını barındırmaktadırlar [59]. Antosiyaninler, suda çözünür pigmentler olarak tanımlanabilirler. Çiçeklerde, meyvelerde ve sebzelerde yaygın olarak bulunurlar. Antosiyaninlerin rengi pH değişimine bağlı olarak farklılık gösterir ve doğada kırmızı, turuncu, mavi, pembe ve mor gibi renklerde bulunabilirler [60]. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı bir aromatik halka, bir oksijen içeren heterosiklik halka ve bu yapıya tek bir karbon atomu ile bağlanmış başka bir aromatik halka şeklindedir. Hidroksil gruplarının sayısı, bağlı grupların türü ve aromatik karboksilik asitlerin bağlanma bölgelerine göre ayırt edilen 500'den fazla monomeri tanımlanmıştır [61]. Siyanidin, delfinidin, malvidin, petunidin ve pelargonidin gibi alt grupları vardır. Antioksidan aktiviteleri, yapısal farklılıklarına göre değişir. Antosiyaninlerin güçlü antioksidan aktiviteleri, onların oksidatif

stresle ilişkili hastalıkların, gelişimini önleme veya geciktirme potansiyeline sahip bileşikler haline getirir. Bu nedenle gıda takviyesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar [62].



Şekil 2.10 Antosiyaninlerin pH'a bağlı değişimleri.

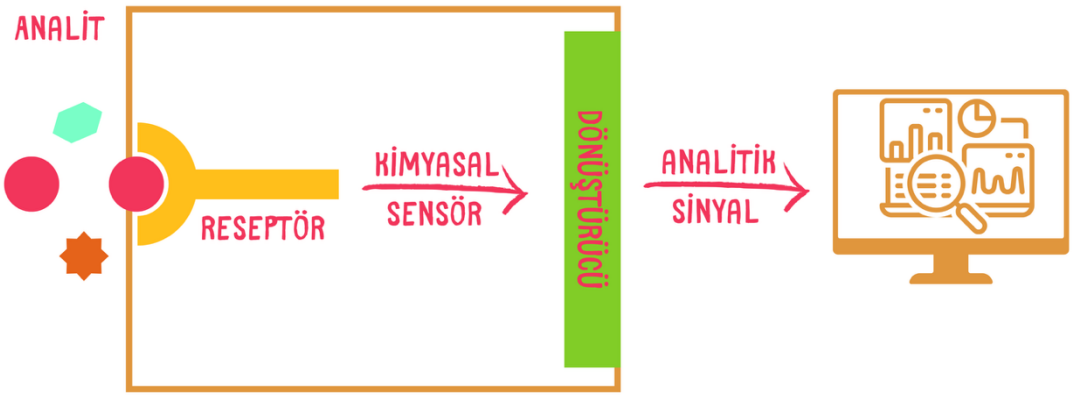
Fenolik asitler hem suda hem de yağda çözünebilen yapılarıyla etkili doğal antioksidanlardır. Bir diğer adlandırması ile fenil propanoidler, hidroksi benzoik ve hidroksi sinnamikleri içeren iki alt gruptan oluşmaktadır. P-kumarik, sinapik, ferulik, klorojenik ve kafeik asit türleri L-tirosin veya L-fenilden meydana gelir (Şekil 2.11). Yapılarında -CH=CH-COOH grubunun olması, hidrojen atomu verebilme kapasitesini olumlu etkilemesiyle birlikte benzoik asitlere kıyasla serbest radikalleri daha kararlı bir forma getirebilme yeteneği sağlar. Hidroksi benzoik asitler kimyasal yapılarındaki metoksi ve hidroksi gruplarının sayılarına ve konumuna göre çeşitlilik gösterirler. Bunların bir kısmı; vanilik asit, şiringik asit, gallik asit ve protokateşuik asittir [36,63,64].



Şekil 2.11 Yaygın kullanılan fenolik asitlerin yapıları.

2.4.SENSÖRLER

Sensörler, tayini yapılacak analitin konsantrasyonunun, aktivitesinin veya varlığının ölçüldüğü sistemlerdir. Analitin kimyasal reaksiyonundan ya da incelenen sistemin sahip olduğu fiziksel özelliklerden kimyasal bilgi elde edilmesini sağlamaktadır [2,65]. Temel olarak bir sensör sisteminde tanıma elemanı (kimyasal ya da biyolojik reseptör) hedef analitin tanınmasını sağlar, dönüştürücü (transdüser) bu etkileşimi ölçülebilir bir sinyale dönüştürür ve bir okuma/veri işleme sistemi sinyalin yorumlanmasını sağlar.



Şekil 2.12 Sensörlerin çalışma prensibinin şematik gösterimi.

Son yıllarda analitik kimya ve malzeme bilimi alanındaki gelişmeler sayesinde sensör teknolojileri üzerine yapılan araştırmalar büyük bir ivme kazanmaktadır. Özellikle biyoteknoloji, nanoteknoloji ve elektrokimya alanındaki ilerlemeler sensörlerin seçiciliğini, duyarlılığını ve kararlılığını önemli ölçüde arttırmaktadır. Sensörler bu gelişmeler sayesinde sadece laboratuvar ortamlarında değil, aynı zamanda çevresel izleme, biyomedikal teşhis, gıda güvenliği, endüstriyel süreç kontrolü ve ilaç analizi gibi geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılabilir hale gelmektedir. Sensörlerin en önemli avantajları analizlerin düşük maliyetli, hızlı ve genellikle numune hazırlığı gerektirmeden gerçekleştirilebilmesidir. Bunlara ek olarak taşınabilir cihazlara entegre edilebilirler, eş zamanlı ve yerinde analiz yapılabilmesine olanak sağlamaktadırlar. Günümüzde araştırmalar özellikle nanosensörler, biyosensörler, optik sensörler ve elektrokimyasal sensörler gibi yeni nesil sensör tiplerinin geliştirilmesine odaklanmaktadır. Bu sistemler özgüllükleri ve yüksek hassasiyetleri sayesinde analitik ölçümlerde giderek daha fazla tercih edilir bir hal almıştır [66–68].

2.4.1. Kimyasal Sensörler

Kimyasal sensörler, bir analite kimyasal reaksiyon aracılığıyla seçimli olarak yanıt veren, kantitatif ve kalitatif olarak belirlenmesini sağlayan sistemlerdir [69]. Duyarlılığı ve seçiciliği hedef analite karşı arttıran kimyasal sensörler, iki temel fonksiyonel birimden oluşmaktadır. Bu birimler alıcı ve dönüştürücü olarak adlandırılmaktadır. Sensörün seçiciliği, hassasiyeti, ömrü ve tepki süresi açısından etkili bir ölçüm elde etmek için kullanılan kimyasal seçici membranın, filmin veya tabakanın formu ve bileşimi hayati önem taşımaktadır. Yüzey üzerinde bulunan ligand veya fonksiyonel gruplar gibi bileşenlerin oluşturduğu sinyaller aracılığıyla analitin bu yüzey tarafından kimyasal olarak tanımlanması sağlanmaktadır. Dönüştürücü kısımları ise oluşan bu sinyallere yanıt verir ve tespit edilen analit miktarını sinyal büyüklüğüne çevirmektedir [2,70].

Kimyasal sensörlerin alıcı kısımları fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal olmak üzere 3 farklı prensibe dayanmaktadır. Fiziksel sensörler herhangi bir kimyasal reaksiyonun gerçekleşmediği sistemlerdir ve ölçümler de absorbans, iletkenlik, kırılma indisi, kütle ya da sıcaklık değişimini gibi parametrelere dayanarak yapılmaktadır. Biyokimyasal sensörlerde analitik sinyalin kaynağı biyokimyasal süreçlerdir. Mikrobiyal potansiyometrik sensörler ve immünosensörler

bu gruba örnektir. Bu tür sensörler, kimyasal sensörlerin bir alt kategorisi olarak değerlendirilmekte ve bazıları biyosensörler olarak adlandırılmaktadır [36]. Kimyasal sensörler analitin bir kimyasal reaksiyon sonucunda analitik sinyalde artışa neden olurlar ve sinyal oluşumu doğrudan gerçekleşen kimyasal reaksiyona bağlıdır.

Kimyasal sensörler dönüştürücünün türüne bağlı olarak 4 temel grupta incelenebilir;

Elektrokimyasal sensörler, potansiyometrik sistemleri (iyon seçici elektrotlar ile iyon seçici alan etkili transistörler, ISFET ve CHEMFET türleri) ve katı elektrolit temelli gaz sensörlerini kapsayan amperometrik/voltammetrik sensörlerden meydana gelmektedir. Ayrıca, çalışma prensibi doğrudan elektrokimyasal bir reaksiyona dayanmamakla birlikte elektriksel iletkenlik değişimlerinin ölçümünü esas alan yarı iletken gaz sensörleri de elektrokimyasal sensör sınıfı içerisinde değerlendirilmektedir [36,71].

Optik sensörler, kimyasal süreçlere bağlı olarak ortaya çıkan spektroskopik değişimlerin ölçülmesine dayanan sistemlerdir. Fiber optik sistemler, klinik analizlere yüksek uyumluluk göstermeleri nedeniyle 1997'den bu yana bu alandaki araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bazı biyosensör uygulamalarında da optiksel ölçüm tekniklerinden yararlanılmaktadır. Yansıma, absorbans, lüminesans temelli ölçümler farklı tür optik sensörlerin temel çalışma prensiplerini oluşturmaktadır [36,72].

Kütle duyarlılığa sahip sensörler, piezoelektrik fenomeni esas alınarak tasarlanmış olup salınım kristalinin yüzeyindeki kütle değişimine bağlı olarak rezonans frekansında meydana gelen kaymaları algılamaktadırlar. Elde edilen frekans değişimi, yüzeye adsorplanan maddenin miktarıyla doğru orantılıdır [73].

Isı duyarlı sensörler, literatürde çoğunlukla kalorimetrik sensörler olarak tanımlanmaktadır. Analitin varlığında gerçekleşen kimyasal reaksiyonların oluşturduğu sıcaklık değişimleri termistör ya da platin bazlı termometre gibi uygun transdüserler aracılığıyla izlenmektedir. Bu tip sensörlerde kullanılan reaksiyon ortamlarında genellikle yanıcı gazlar kullanılmaktadır [36].

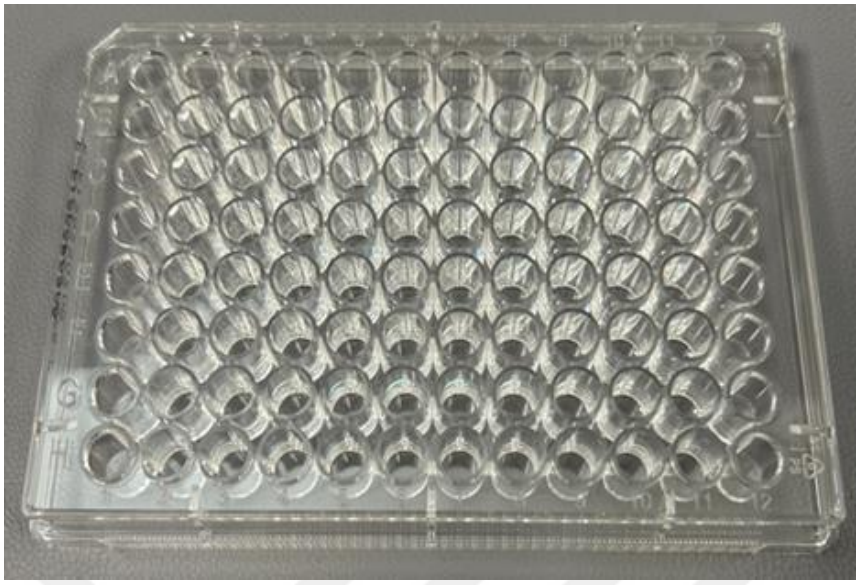
2.4.1.1.Optik Sensörler

Optik sensörler, günümüzde birçok endüstri ve araştırma alanında vazgeçilmez hale gelmiştir. Bu sensörler ışığın absorbans, yansıması, kırılması veya yayılması prensiplerine dayanarak

yüksek hassasiyetle ölçüm yaparlar [74]. Çevresel görüntüleme uygulamalarında hava kalitesi, su kirliliği ve iklim değişikliği gibi faktörlerin sürekli ve doğru bir şekilde izlenmesini sağlamaktadırlar [75]. Biyomedikal araştırmalarda hücrelerin ve biyomoleküllerin davranışlarını izlemek, biyokimyasal reaksiyonları analiz etmek ve tıbbi teşhislerde kullanılmak amacıyla kullanılmaktadırlar [76]. Ayrıca endüstriyel proses kontrollerinde, üretim süreçlerinin verimliliğini arttırmak ve kalite kontrolü sağlamak maksadıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar [77]. Gıda endüstrisinde ise, optik sensörler, gıda örneklerinde kalite kontrol, tazelik ölçümü ve kontaminasyon tespiti gibi kritik analizlerde rol oynarlar. Özellikle, meyve ve sebzelerin olgunluk durumunu belirlemek, süt ve süt ürünlerinde mikrobiyal aktiviteyi izlemek ve ambalajlı gıdaların analizlerinde kullanılmaktadır [78]. Tüm bu çeşitli uygulamalarda enerji verimli, düşük maliyetli, minyatürize edilebilirliği gibi avantajlarıyla yüksek performanslı sistemlerin üretilmesini mümkün kılarak yenilikçi çözümler sunmaya olanak sağlarlar.

2.5.MİKROPLAKA ESASLI YÖNTEMLER

Son yıllarda biyokimya ve analitik kimya alanında yüksek verimli, çevreci ve yenilikçi sistemlerin/analizlerin gereksinimin artmasıyla birlikte mikroplaka esaslı yöntemler geleneksel spektrofotometrik yöntemlere güçlü bir alternatif olarak öne çıkmaktadır [79]. Mikroplakalar, genellikle 96 kuyucuktan (Şekil 2.13) oluşan çok sayıda örneğin eş zamanlı ölçülmesine imkân sağlayan, düşük hacimli ve otomasyona uygun sistemlerdir [80]. Bu sistemlerde ölçüm hacimlerinin mikrolitre seviyelerine düşmesi hem kimyasal/çözücü kullanımı önemli ölçüde azaltmakta hem de analiz maliyetlerini düşürmektedir. Ayrıca çoğu mikroplaka okuyucunun absorbans, floresans ve luminesans ölçümlerini yapabilmesinin yanı sıra kesintisiz (continuous) ölçüm yapabilmeleri kinetik analizleri için büyük avantaj sağlamaktadır [81,82]. Böylelikle hızlı reaksiyonlar kısa periyotlarla gözlemlenebilmekte ve daha güvenilir veriler elde edilmektedir.



Şekil 2.13 96 kuyucuk içeren mikroplaka.

Antioksidan kapasite tayinlerinde kullanılan klasik yöntemlerin (DPPH, ABTS, CUPRAC vb.) mikroplaka formatına uyarlanması özellikle gıdalar [83], doğal ekstraktlar [84], biyolojik örnekler [85] ve tarımsal ürünler [86] üzerinde yapılan analizlerde kolaylık sağlar. Mikroplaka esaslı yöntemler antioksidan analizleri için yalnızca hız ve maliyet açısından değil aynı zamanda ölçümlerin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği bakımından da önemli avantajlar sunmaktadır. Çoklu kuyucuk yapısı her bir analiz içerisinde kör çözelti, standart ve örnek çözeltilerin eş zamanlı olarak yürütülmesine olanak sağlayarak yöntemin güvenilirliğini de arttırır. Ayrıca, otomasyona uyumlu olması sebebiyle manuel işlem hatalarını da azaltmakta ve örnek sayısının yüksek olduğu analizlerde standartlaşmaya olanak sağlamaktadır.

2.6.TAC YÖNTEMLERİ

Son yıllarda literatürde, antioksidan aktivitesi ölçmek için kullanılan yöntem ve cihazlarda önemli çalışmalar görülmektedir. Geliştirilen ilk yöntemler antioksidanların belirli oksidasyon ürünlerinin oluşumuna karşı etkinliğini ölçmeye dayanmakta ve dolayısıyla lipid oksidasyonunun belirlenmesi esasına göre geliştirilmektedir [87]. Günümüzde kullanılan yöntemler ise farklı serbest radikal veya reaktif oksijen türlerine karşı süpürme aktivitesi, indirgeme gücü ve metal kelatlama kapasitesi gibi özel yaklaşımlarla doğrudan ölçüme

dayanmaktadır. İlgili kimyasal reaksiyonlara göre bu testler HAT temelli yöntemler ve ET temelli yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Reaksiyon mekanizmaları farklı olsa da her iki yöntem grubunda da antioksidan aktiviteleri, antioksidanların belirli radikal türlerini nötralize etme kapasiteleri ile ilişkilendirilmektedir [88].

2.6.1. Hidrojen Atom Transferi Esaslı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

HAT yöntemleri, bir antioksidanın serbest radikalleri hidrojen atomu transferi yoluyla sönümleme kapasitesini ölçmektedir. Antioksidan kapasitesini ölçmek için HAT mekanizması genellikle radikal başlatıcılarla (peroksitler veya azo boyar maddeler) birlikte kullanılmaktadır. Antioksidanın etkisi incelenirken, oluşan serbest radikaller için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmalı kinetik reaksiyonları kullanılmaktadır [10].

ROO• + AH/ArOH ⇄ ROOH + A•/ArO•

HAT mekanizmasını açıklayan bu reaksiyonda, peroksil radikali (ROO•) ile fenol (ArOH yani antioksidan) arasındaki etkileşim sonucu oluşan ariloksil radikali (ArO•) rezonans kararlılığı sayesinde stabilize olur. Burada AH, oksidasyondan korunması hedeflenen biyomolekülleri temsil etmektedir. Etkili bir fenolik antioksidan, biyomoleküllerle serbest radikallerden daha hızlı reaksiyona girmelidir, böylece oksidatif hasara karşı koruyucu etki sağlamaktadır [89].

2.6.1.1.ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC testi, biyolojik sistemlerde ve gıdalarda lipid oksidasyonunda baskın serbest radikal türü olan peroksil radikallerine karşı antioksidanların süpürme kapasitesini ölçerek, HAT mekanizmasına dayalı klasik radikal zincir kırıcı antioksidan kapasiteyi yansıtan bir yöntemdir [80]. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu moleküller genellikle 2,2′-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH), 3′,6′-dihidroksi-spiro[izobenzofuran-1[3H],9′[9H]-ksanten]-3-on (fluorescein) ya da 2′,7′-diklorodihidrofluorescein diasetat (diklorofluorescein)'dir [90]. AAPH'ın bozunması sürekli bir radikal (ROO•) akışı sağlar, bu

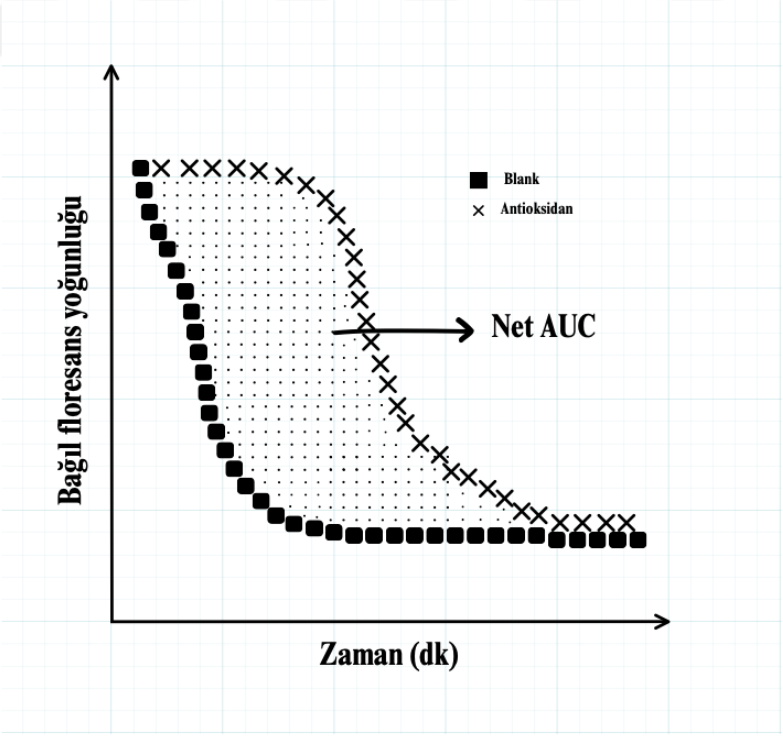
sırada fluorescein/diklorofluorescein oksitlenebilir hedef madde olarak davranır ve reaksiyonun kinetiği floresans sinyali aracılığıyla belirlenmektedir. ROO• varlığında floresans sinyalinin azalma hızı ölçülür. Aynı zamanda, floresan probun ROO• ile tepkimesi sonucu floresan özelliğini kaybeden bir ürüne dönüşmesi nedeniyle bu molekülün/bileşiğin miktarı da dolaylı olarak belirlenmektedir [91]. Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan (AUC) yapılmaktadır. Böylece peroksil radikalleri ile oksitlenen bir hedef molekülün bir antioksidan tarafından ne kadar korunduğu, hedef molekülün bozunması floresans takibi ile izlenerek bulunmaktadır [92].

$AAPH + O_2 \rightarrow 2ROO\bullet + N_2$

$ROO\bullet + Prob_{floresan} \rightarrow ROOH + Oksitlenmiş\ Prob_{floresan\ olmayan}$

$ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$

$ROO\bullet + A\bullet \rightarrow ROOA$



Şekil 2.14 Bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alan (AUC) grafiği.

2.6.1.2.TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

TRAP yöntemi, bir azo bileşiğinin (genellikle AAPH) termal bozunmasıyla başlatılan kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketimini ölçmeye dayalı olarak geliştirilmiştir. Bundan dolayı plazmanın bu reaksiyonu engelleme kabiliyetinin dolaylı olarak ölçülmesidir. İndüksiyon periyodu, oksijen emiliminin yavaşladığı süre, nicel olarak ölçülerek örneklerin toplam antioksidan kapasitesi TRAP değeri olarak ifade edilmektedir [93].

TRAP değeri, birim hacimde (örneğin 1 L plazma) tutulan peroksil radikallerinin (ROO•) mikromol cinsinden sayısı olarak ifade edilir [94]. Ancak yöntemin analiz süresi, düşük tekrarlanabilirlik gibi dezavantajları sebebiyle literatürde daha sonraki çalışmalarda çeşitli modifikasyonlarla kullanılmaktadır [95].

2.6.1.3.Luminol Yöntemi

Luminol yöntemi, kemilüminesans temelli bir TRAP yöntemi olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemde, AAPH bileşiğinin oluşturduğu peroksil radikalleri yükseltgenebilir bir substrat olan luminolün oksidasyonunu tetikleyerek ışık yayan luminol radikallerinin oluşmasına yol açmaktadır. Ortaya çıkan bu ışık sinyali luminometre adı verilen cihazlar aracılığıyla kaydedilmektedir. Antioksidan özellik taşıyan bileşikler kemilüminesans sinyalinin belirli bir süre boyunca oluşmasını engelleyerek gecikme zamanı adı verilen bir periyot oluşturur. Bu gecikme süresi incelenen örneğin toplam antioksidan kapasitesi ile doğru orantılıdır ve kaydedilen sonuçlar troloks eşdeğeri üzerinden ifade edilmektedir [36,96].

2.6.1.4.Krosin Beyezlatma Yöntemi

Bu yöntem, plazmadaki toplam antioksidan kapasitenin kinetik parametreler üzerinden değerlendirilmesine dayanmaktadır. Yöntemin temel prensibi, AAPH tarafından üretilen peroksil radikallerinin krosini oksitleyerek rengini gidermesi üzerine kuruludur. Krosinin peroksil radikalleri ile reaksiyon hızı, antioksidan bulunmayan koşullarda (V_0) ve antioksidan varlığında (V) olmak üzere 10 dakikalık süre içinde belirlenmektedir. Elde edilen hızların oranı (V_0/V) x eksenini, antioksidan konsantrasyonunun [A] krosin konsantrasyonuna [C] oranı ise y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik çizilir. Ortaya çıkan bu lineer grafiğin eğimi k_a/k_c oranını yani analiz edilen bileşiğin peroksil radikalleriyle etkileşimindeki dolaylı kapasitesini göstermektedir. Burada k_a antioksidan-peroksil radikali reaksiyonunun hız sabiti, k_c ise krosin-peroksil radikali reaksiyonunun hız sabitini temsil etmektedir. Hesaplanan bu oran daha önce

troloks için belirlenen oranın değerine bölünerek sonuçlar troloks eşdeğeri şeklinde ifade edimektedir. Bu yöntem, iki farklı antioksidan bileşiğinin peroksil radikalleri ile etkileşim kinetiklerinin karşılaştırılmasına imkân sağlamaktadır [36].

2.6.2. Elektron Transferi Esaslı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

ET temelli TAC yöntemleri, çeşitli radikal ve radikal katyonların indirgenmesi yoluyla antioksidanların elektron verme kapasitesi ile değerlendirilmektedir. Bu antioksidanların indirgeme ve sönümleme yeteneğine dayanmaktadır [97]. ET temelli TAC analizleri iyi bir hassasiyete sahiptir, çünkü antioksidan tarafından indirgenince renk veya floresans değişimi gösteren problar kullanılmaktadır. İndirgenmiş ve orijinal probların absorpsiyon veya floresans yoğunlukları arasındaki fark doğrudan ölçülmektedir [10].

Antioksidanların ET mekanizmasına göre etki biçimi şu reaksiyonlarla özetlenebilir:

$ROO\bullet + AH/ArOH \rightarrow ROO^{-} + AH^{\bullet+} / ArOH^{\bullet+}$

$AH^{\bullet+} / ArOH^{\bullet+} + H_2O \leftrightarrow A\bullet / ArO\bullet + H_3O^{+}$

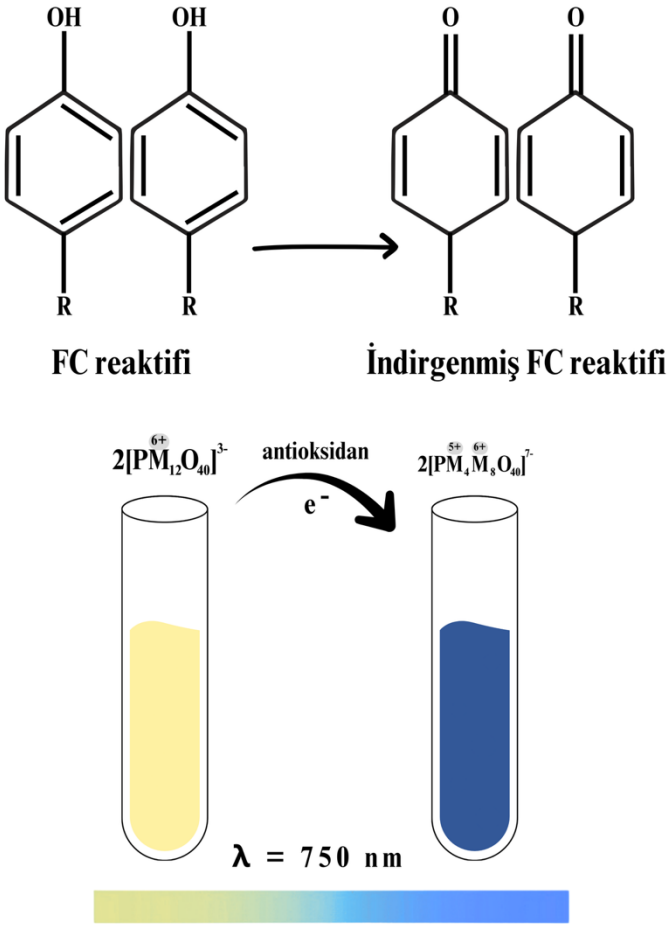
$ROO^{-} + H_3O^{+} \leftrightarrow ROOH + H_2O$

Bu reaksiyonlar genellikle HAT temelli testlere/yöntemlere göre daha yavaş gerçekleşmektedir. Ancak metal kompleksleri aracılığıyla yapılan bazı problarda solvent tipine bağlı olarak istisnalar meydana gelebilmektedir. ET reaksiyonları hem çözücüye hem de pH'a karşı duyarlıdır [97].

2.6.2.1.Folin-Ciocalteu Yöntemi

Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi başlangıçta proteinlerin analizi için tasarlanmış ve reaktifin, proteinlerin fenol grubu içeren tirozin kalıntılarıyla olan etkileşimini inceleyen bir yöntemdir. FC testi, alkali ortamda fenolik bileşiklerin Folin–Ciocalteu reaktifini ($3H_2O–P_2O_5–13WO_3–5MoO_3–10H_2O$) indirgemesi prensibine dayanır, bu etkileşim sonucunda oluşan mavi rengin yoğunluğu protein içeriği ile doğru orantılıdır [98]. Sonrasında bu yöntem toplam fenollerin

ölçümü için genişletilmiştir. Reaktifin kimyasal yapısı tam olarak tanımlanmamıştır ancak fosfomolibdik ve fosfotungstik asit komplekslerinden oluştuğu düşünülmektedir [97].



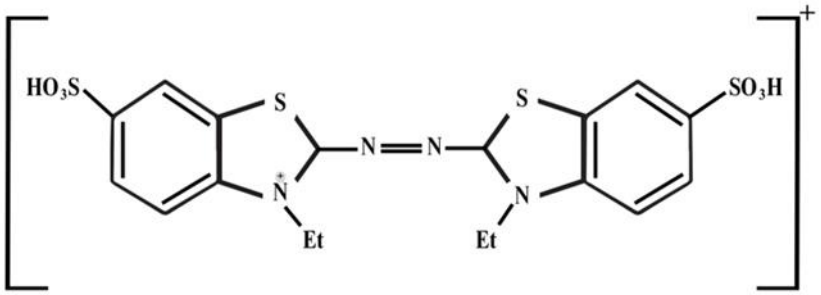
Şekil 2.15 Folin-Ciocalteu yönteminin şematik gösterimi.

FC yöntemi kolay uygulanabilir ve tekrarlanabilirliği yüksek bir yöntem olsa da pH, sıcaklık ve reaksiyon süresine duyarlılık gibi kısıtlamaları mevcuttur. Ayrıca, lipofilik fenoller için doğrudan uygulanabilirliği sınırlıdır [99].

2.6.2.2.TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) /ABTS Yöntem

TR eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen bu yöntem, (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)) ABTS'nin yoğun renkteki radikal katyonunu kullanarak antioksidan bileşikler tarafından sağlanan hidrojen atomlarını veya elektronları kabul eden faydalı bir kolorimetrik prob olarak kullanılmaktadır. Antioksidan yeteneği, bileşiğin (örneğin, Ph–OH) $ABTS^{\bullet+}$ rengini azaltma yeteneği olarak ölçülmekte olup bu başlangıç oksidasyonunu engelleyerek ve $ABTS^{\bullet+}$ üretimini önleyerek veya doğrudan önceden oluşturulmuş radikal katyon ile reaksiyona girerek gerçekleşmektedir. Antioksidan varlığında bu radikal katyonunun

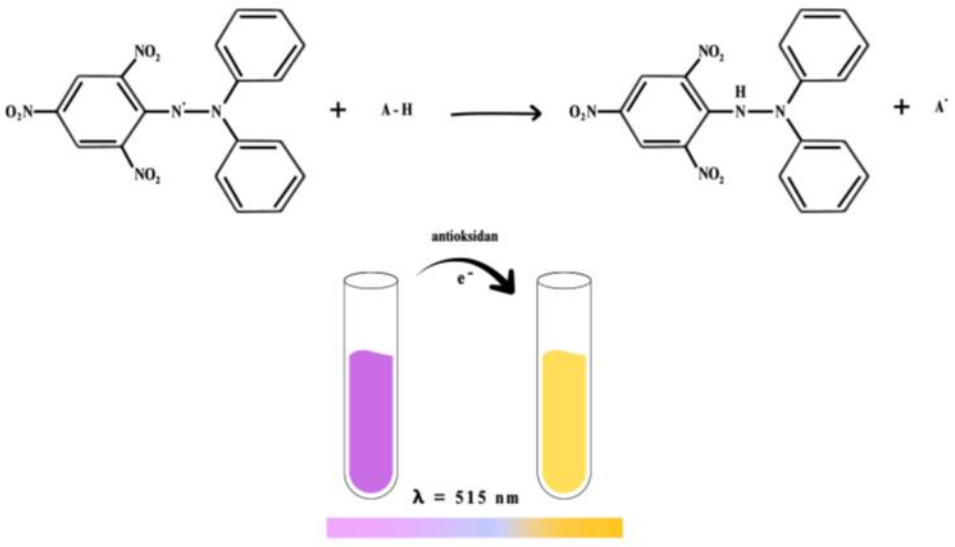
absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden bulunmaktadır [92].



Şekil 2.16 ABTS•$^{+}$ katyonunun yapısı.

2.6.2.3.DPPH Radikal Süpürme Yöntemi

DPPH yöntemi, antioksidanların radikal giderme kinetiğini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Reaksiyon denklemi HAT mekanizmasına göre formüle edilebilir ancak özellikle fenol-iyonize edici çözücülerde ve alkali pH'da ET mekanizması da göz ardı edilememektedir. DPPH• (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) radikali hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH• radikali 515 nm'de kararlıdır. Antioksidanlarla reakiyonu sonucunda absorbansında düşme meydana gelerek rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme yeteneğini inceleyen bir yöntem olarak kullanılmaktadır [92].



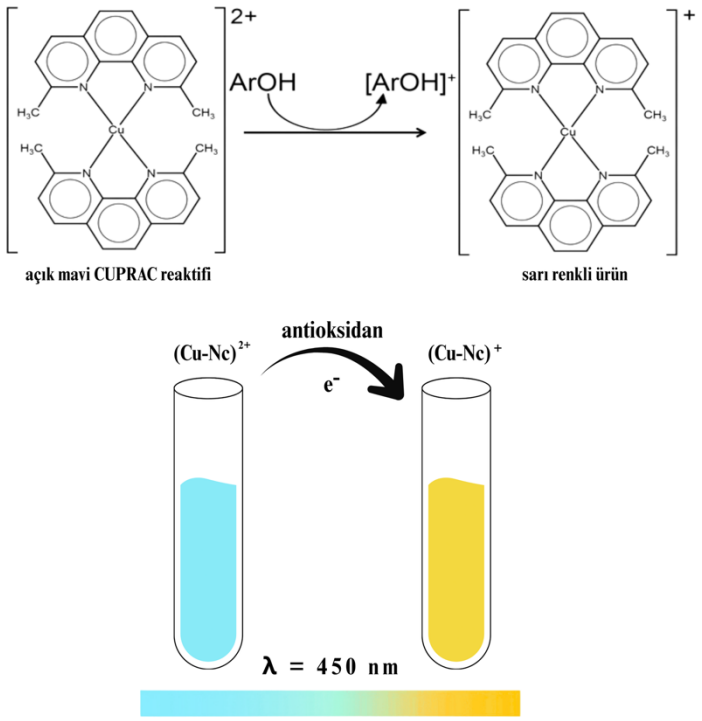
Şekil 2.17 DPPH yönteminin şematik gösterimi.

2.6.2.4.FRAP Yöntemi

Bu yöntem, demir(III) iyonlarının indirgenmesine dayanarak toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesini amaçlamaktadır. Asidik koşullar altında Fe(III) iyonları kısaltması TPTZ olan tripiridiltriazin ile etkileşime girerek Fe(III)-TPTZ kompleksini oluşturmaktadır. Numunedeki antioksidan bileşiklerin indirgeme etkisi sonucunda bu kompleks Fe(II)-TPTZ formuna dönüşür. Oluşan bu kompleks koyu mavi renkli olup 593 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir [100].

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

CUPRAC yöntemi, polifenollerin ve plazma antioksidanlarının Cu(II) iyonlarını azaltma yetenekleri ölçüldüğünden dolayı "bakır iyonu azaltıcı antioksidan kapasitesi" yöntemi olarak literatüre sunulmuştur. Seçilen kromojenik reaktif, Cu(II)-neokuproin, biyolojik olarak önemli olan antioksidanlara (örneğin; askorbik asit, α-tokoferol, ürik asit, bilirubin vb.) ve gıda antioksidanlarına (örneğin; flavonoidler, basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler) uygulanabilen bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara da uygulanabilen geniş spektrumlu bir uygulama alanı mevcuttur [101].



Şekil 2.18 CUPRAC yönteminin şematik gösterimi.

Genel olarak bu yöntemin prosedürü, Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7) tampon çözeltisinin karıştırılması ve ardından, tayini yapılacak herhangi bir antioksidan bileşiğin üzerine ilave edilmesiyle 30 dakika bekletilip içerisinde antioksidan bileşiklerin bulunmadığı referans çözeltisine karşı 450 nm'de absorbans değerinin ölçülmesi şeklindedir [101].

$$2n\ Cu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightarrow 2n\ Cu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + 2n\ H^+$$

Yukarıda verilen reaksiyonda antioksidan bileşiklerin yükseltgenmesi gösterilmektedir. Bu bileşikler aynı zamanda indirgen özellik gösterdiklerinden dolayı oksidasyon arası olarak kullanılan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler. Bu reaksiyonda, polifenolik antioksidanların Ar(OH) ve reaktif Ar-OH grupları genellikle kinonlara (Ar=O) yükseltgenmektedir ve Cu(II)-Nc reaktifi ise $Cu(Nc)_2^{+}$ kelatına indirgenmektedir. CUPRAC reaktifi hazırlanırken Cu^{2+} iyonlarının neokuproin miktarına göre stokiyometrik olarak fazla tutulması, $Cu(Nc)_2^{2+}$ kompleksinin yeterli konsantrasyonda bulunmasını sağlamaktadır. Burada yükseltgeyici tür yalnızca Cu^{2+} değil, $Cu(Nc)_2^{2+}$ kompleksidir. Bunun nedeni, Cu(II/I)-neokuproin kompleksinin standart redoks potansiyelinin (≈ +0,60 V) serbest Cu(II/I) (Cu^{2+}/Cu^{+}) potansiyelinden (≈ +0,17 V) çok daha yüksek olmasıdır ve bu durumda, polifenollerin $Cu(Nc)_2^{2+}$ ile hem termodinamik hem de de kinetik olarak daha hızlı ve verimli yükseltgenmesini sağlamaktadır. Oluşan redoks reaksiyonu sonucunda elde edilen renkli ürün miktarı (yani Cu(I)-Nc kelatı), reaksiyona giren Cu(II)-Nc miktarına eşit olmaktadır ve açığa çıkan protonlar, amonyum asetat tampon ortamında nötralize edimektedir [101].

CUPRAC yöntemi ilk olarak spektrofotometrik bir TAC tayin yöntemi olarak geliştirilmiş olsa da literatürde gerçekleştirilen çeşitli modifikasyonlarla [102–106] metodun kapsamının önemli ölçüde geliştirilebileceği gösterilmiştir. Yöntem bu modifikasyonlar sayesinde farklı numune matrikslerine uygulanabilmekte ve çeşitli ölçüm teknikleriyle entegre edilerek duyarlılık ve seçicilikte belirgin artış sağlamaktadır. Sensör esaslı sistemlere modifiye edilen CUPRAC yöntemlerinde analiz hızının artması, reaktif tüketiminin azalması ve çoklu analizlere imkân sağlanmasıyla geniş bir uygulama esnekliği sunmaktadır.

2.7.LİTERATÜR ÖRNEKLERİ

Kuswandi vd. yaptıkları çalışmada, bitkisel ekstraktların TAC değerlerinin belirlenebilmesi için DPPH temelli bir kâğıt mikrozon plakası kullanılarak geliştirilen yeni bir kolorimetrik analiz yöntemi kullanmıştır [107]. PμZP ekran baskı tekniğiyle oluşturulmuş kuyucuklu bir kâğıt üzerine DPPH radikalininin immolize edilmesiyle hazırlanmıştır. Mor renkli DPPH radikali, antioksidanlarla reaksiyona girerek soluk sarı hidrazin formuna indirgenmiştir. Bu renk değişimi tarayıcı ile görüntülenip ImageJ yazılımıyla analiz edilmiştir. Yapılan optimizasyon ve sistematik deneyler sonucunda geliştirilen PμZP temelli sensör, antioksidan analizinde hızlı, basit, ucuz, düşük hacim gerektiren ve taşınabilir bir alternatif sunmuştur.

Johnson vd. yaptıkları çalışmada, mikroplaka temelli yöntemler geliştirilirken genellikle ihmal edilen absorbans ölçüm öncesinde plakanın çalkalanması/karıştırılması (shaking) incelemiştir [108]. Bu sebeple çalışmada toplam fenolik içerik ve toplam antioksidan aktivite analizleri için FC yöntemi ve FRAP yöntemi kullanılmıştır. 6 farklı çeşitten toplam 36 nohut örneğinin her iki yöntem için de karıştırma öncesi ve sonrası absorbans değerleri ölçülmüştür. Karıştırma sonrası doğrusal bir artış gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, karıştırma işleminin reaksiyonun tamamlanması üzerinde olumlu bir etki gösterdiği ve bununla birlikte, yöntemin tekrarlanabilirliğini arttırdığı tespit edilmiştir.

Indracanti vd. yaptıkları çalışmada, antioksidan aktivitesinin hızlı ve güvenilir şekilde belirlenmesine yönelik 96 kuyucuklu mikroplaka temelli bir ABTS yöntemi geliştirmiştir [109]. Yöntemin konsantrasyon, inkübasyon süresi, reaktif ve örnek hacimleri, reaktif hazırlama koşulları ve tampon pH'sı gibi parametreleri optimize edilmiştir. Optimize edilen ABTS temelli mikroplaka yöntemi hem intra-assay hem de inter-assay analizlerde yüksek doğruluk ve hassasiyet göstermiştir. Çalışmada bazı antioksidan bileşikleri ve sebze ekstraktraları kullanılmış olup yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğruluğu incelenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen 96 kuyucuklu mikroplaka temelli ABTS yöntemi, standart antioksidan ve bitkisel örneklerin antioksidan kapasitesitelerini hızlı, hassas ve tekrarlanabilir biçimde belirlemek için uygun, güvenilir ve düşük maliyetli bir analiz imkânı sunmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.KİMYASALLAR

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasallardan troloks, gallik asit, kuersetin dihidrat, askorbik asit, rutin, α-tokoferol, bilirubin, kateşin, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) Sigma-Aldrich'ten; bakır(II) klorür dihidrat ve amonyum asetat Merck'ten; etanol ise Isolab'dan temin edilmiştir. Gerçek örnek çalışmalarında kullanılan serumlar Capricorn Scientific'dan ve çaylar da yerel marketten temin edilmiştir. Tüm kimyasallar analitik saflıkta olup ek bir saflaştırma işlemine tabi tutulmamıştır. Tüm deneysel aşamalarda yer alan sulu çözeltiler ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2.CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan kimyasal bileşiklerin tartımı için Shimadzu AP22WD model bir analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin homojen bir şekilde karıştırılması için Heidolf marka bir girdap karıştırma cihazı, reaktifleri mikroplakalara sabitleme aşamasında kullanılan Telstar LyoQuest model bir liyofilizatör ve tüm çözeltilerin hazırlanması sırasında Elga marka bir saf su sistemi kullanılmıştır. Mikroplakaların absorbans ölçümleri BioTek Synergy H1 model mikroplaka okuyucu ile yapılmıştır. Ayrıca, karşılaştırma aşamasında absorbans ölçümleri Shimadzu UV-1900i model UV-Vis spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için QS marka birer çift kuartz küvet kullanılmıştır.

3.3.ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Geleneksel CUPRAC Yöntemi için Çözeltilerin Hazırlanması

İlk olarak, 250 mL'lik balon jojeye 0,426 g $CuCl_2.H_2O$ tartılmıştır ve hacmine ultra saf su ile tamamlanarak $1{,}0x10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra, $7{,}5x10^{-3}$ M Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) için 100 mL'lik balon jojeye 0,156 g tartılarak

hacmine EtOH ile tamamlanmıştır. Son olarak, 1,0 M (pH=7) amonyum asetat ise 250 mL'lik balon jojeye 19,27 g tartılarak hacmine ultra saf su ile tamamlanmıştır.

3.3.2. Geliştirilen CUPRAC Yöntemi için Çözeltilerin Hazırlanması

$3{,}0x10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi 250 mL'lik balon jojeye 1,279 g Cu(II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$) tartılarak saf su ile hazırlanmıştır. $22{,}5x10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi için balon jojeye 0,468 g tartılıp etil alkol ortamında 100 mL'ye tamamlanmıştır. Son olarak, 3,0 M (pH=7) amonyum asetat çözeltisi için ise 250 mL'lik balon jojeye 57,81 g tartılarak hacmine tamamlanmıştır.

3.3.3. Standart Antioksidan Bileşiklerin Hazırlanması

Askorbik asit, saf su içerisinde derişimi $1{,}0x10^{-3}$ M olacak şekilde çözündürülerek hazırlanmıştır. $1{,}0x10^{-3}$ M bilirubin standart çözeltisi ise 0,01 M NaOH çözeltisi ile çözündürülüp bazın aşırısı 0,01 M HCl çözeltisi ile nötralleştirilerek hazırlanmıştır. Diğer antioksidan bileşiklerin çözeltileri, derişimleri $1{,}0x10^{-3}$ M olmak üzere EtOH ile hazırlanmıştır. Deneysel aşamalarda kullanılan tüm standart çözeltiler ana stoklarından EtOH:Su (50:50, v:v) çözeltisi ile seyreltilmiştir.

3.3.4. Çay ve Serum Örneklerinin Hazırlanması

Poşet çay örnekleri, 250 mL'lik ile bir beher içerisinde kaynatılmış suya 2 dakika boyunca daldırılıp çıkartılmıştır. Sonrasında 3 dakika boyunca üstü kapalı bir şekilde beherde demlemeye bırakılmıştır. İşlem sonrasında poşet çıkartılarak çözelti 45 μm şırınga filtresinden geçirilerek süzülmüştür ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Sonrasında yapılan deneysel çalışmalarda seyreltme amacıyla EtOH:Su (50:50, v/v) çözeltisi kullanılmıştır.

Serum örneklerine ise proteinlerin çöktürülmesi amacıyla 1:3 oranında EtOH ilavesi ardından girdap karıştırıcı ile homojenize edildikten sonra 7500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.

İşlem sonucunda elde edilen berrak üst faz dikkatlice toplanarak deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

3.3.5. İnterferans Çalışmaları için Çözeltilerin Hazırlanması

Geliştirilen mikroplaka esaslı sensörün antioksidan varlığında girişim yapması ihtimaline karşı $C_2O_4^{2-}$, $C_6H_5O_7^{3-}$, NO_3^-, SO_3^{2-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, Cl^-, K^+, Ca^{2+}, Na^+ iyonlarının ve D(+)-glukoz'un 10^{-2} M'lık ana stok çözeltileri saf su ile hazırlanmıştır.

3.4.YÖNTEMLERİN UYGULANMASI

3.4.1. Geleneksel CUPRAC Yöntemi

10 mL'lik temiz bir deney tüpüne sırasıyla 1,0 mL 10 mM Cu(II) çözeltisi, 1,0 mL 7,5 mM neokuproin çözeltisi ve 1,0 mL 1,0 M amonyum asetat tamponu eklenmiştir. Daha sonra, aynı deney tüpene x mL hazırlanan örnek çözeltisi ve (1,1-x) mL saf su ilave edilerek iyice çalkalanmıştır. Toplam hacmi 4,1 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda koşullarında ağzı kapalı olacak şekilde 30 dakika bekletilmiştir. Belirtilen süre sonunda, örnek içermeyen referans çözeltiye karşı, oluşan Cu(I)-Nc kompleksinin absorbans değerleri karakteristik dalga boyu olan 450 nm'de ölçülmüştür.

1,0 mL Cu(II) + 1,0 mL Nc + 1,0 mL tampon + x mL antioksidan çözeltisi + (1,1 – x) mL H_2O

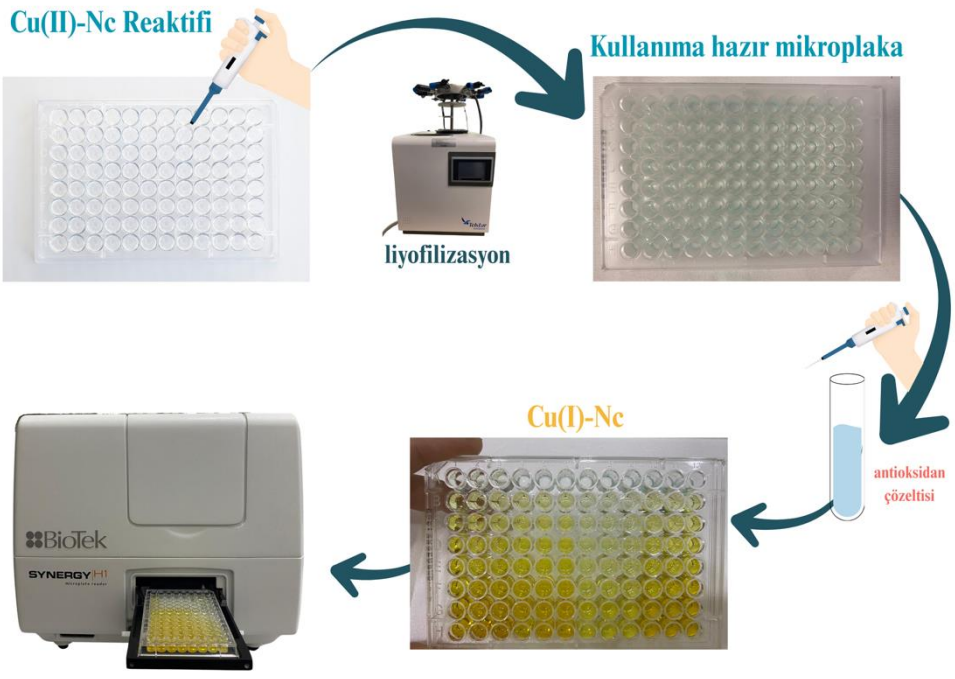
Toplam hacim (V_{toplam}) = 4,1 mL

3.4.2. Geliştirilen Mikroplaka Esaslı Antioksidan Kapasite Tayini Yöntemi

Bir reaktif haznesine eşit hacimlerde 30 mM Cu(II) çözeltisi, 22,5 mM neokuproin çözeltisi ve 3,0 M amonyum asetat tamponu eklenerek reaktif çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen reaktif çözeltisi, her bir mikroplaka kuyucuğunda 40 µL olacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan mikroplakalar, -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra, 12 saat boyunca liyofilizatör yardımıyla

toz formuna dönüştürülmüştür. Sonrasında, reaktif sabitlenmiş mikroplakaların her bir kuyucuğu antioksidan standart çözeltiler ile muamele edilmiştir. Mikroplaka okuyucu cihazında 5 dakika boyunca orbital karıştırma işlemine tabi tutulduktan sonra 25 dakika boyunca CUPRAC reaktifinin ilave edilen antioksidanlarla reaksiyonun verimli bir şekilde gerçekleşebilmesi için bekletilmiştir. Belirtilen süre sonunda oluşan Cu(I)-Nc kompleksinin absorbans değeri karakteristik dalga boyu olan 450 nm'de ölçülmüştür.

Geliştirilen sensör kapsamında her bir mikroplakada alınan absorbans değerleri ilgili mikroplakada alınan kör çözeltinin absorbans değerinden çıkarılarak net absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu kapsamda, elde edilen tüm veriler net absorbans hesabı üzerinden yorumlanmıştır. Bu yaklaşım, absorbans ölçümlerinin doğruluğunu arttırmak amacıyla standart bir prosedür olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.1 Geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensörün şematik gösterimi.

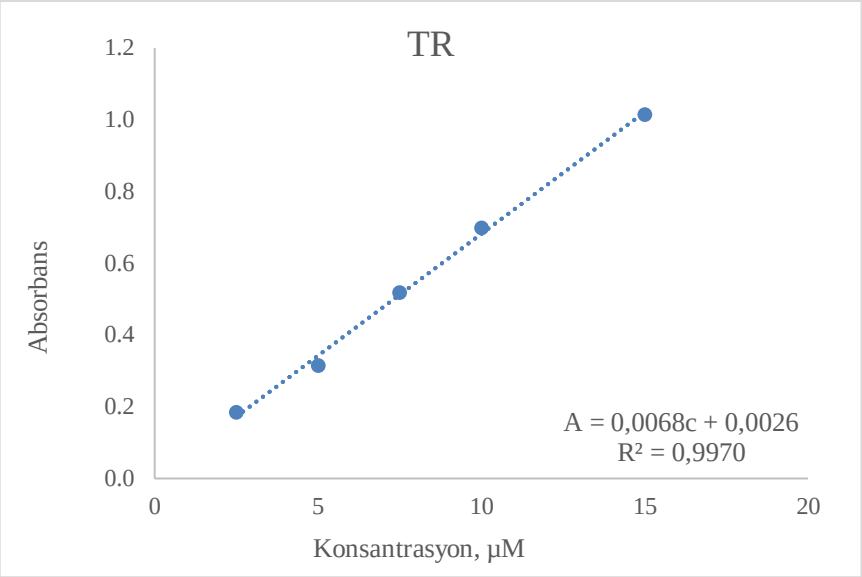
4. BULGULAR

4.1. CUPRAC REAKTİFLERİNİN OPTİMİZASYONU

Mikroplakalara immobilize edilen Cu(II)-Nc reaktifinin ve tampon çözeltisinin konsantrasyonları reaksiyon verimini ve renk oluşumunu doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, yöntemde kullanılan reaktiflerin optimum konsantrasyonlarının belirlenmesi analizin doğruluğu, kesinliği ve duyarlılığı açısından kritik bir öneme sahiptir. Reaktif konsantrasyonunun düşük olması Cu(II)-Nc ve antioksidan reaksiyonunun kantitatif açıdan tamamlanmasını engellemektedir ve reaksiyona girmeyen antioksidan ortamda kalabileceğinden beklenenden düşük absaorbans değerleri gözlenecektir. Buna karşılık, reaktiflerin aşırı konsantrasyonlarda kullanılması ise reaksiyonun stokiyometrisini bozabilmekle birlikte mikroplaka üzerinde çözünürlük sorunlarına neden olabilecektir. Ayrıca, reaktif oranlarının uygun tutulması CUPRAC yönteminin karakteristik özelliklerinden biri olan kontrollü renk oluşumu için gereklidir çünkü Cu(II)-Nc kompleksinin optimum derişimde olması hem reaksiyon kinetiğini hem de stabilitesini belirlemektedir. Sonuç olarak, geliştirilen mikroplaka esaslı CUPRAC yönteminin sensöre dönüştürülmesinin ilk aşamasında geleneksel CUPRAC reaktiflerinin kendi konsantrasyonu ile 3 ve 5 katı olacak şekilde hazırlanan reaktifler ile denemeler yapılmıştır. Optimum konsantrasyon 3 katı olarak belirlendikten sonra reaktiflerin hacim denemeleri yapılmıştır. Reaktifin hacmi doğrudan reaksiyonu etkilediği gibi mikroplakaların homojen bir şekilde kaplanması açısından da büyük önem taşımaktadır. Düşük hacimlerde yapılan denemelerde reaktifin yeterli olmadığı, yüksek hacimlerde ise liyofilizatör ile kurutma aşamasında homojen dağılım görülmediği tespit edilmiştir. Optimum koşullar belirlenirken referans antioksidan bileşikleri olarak TR ve QR seçilmiş olmakla birlikte her bir CUPRAC konsantrasyonu ve hacminde kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Geliştirilen sensörün doğrusallığını ve hassasiyetini belirlemek amacıyla kalibrasyon eğrilerinden oluşturulan doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları incelenmiştir. Optimum parametreler olarak geleneksel CUPRAC reaktifinin 3 katı seçilerek uygun hacim 40 µL olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda elde edilen TR grafiği Şekil 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.1 TR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

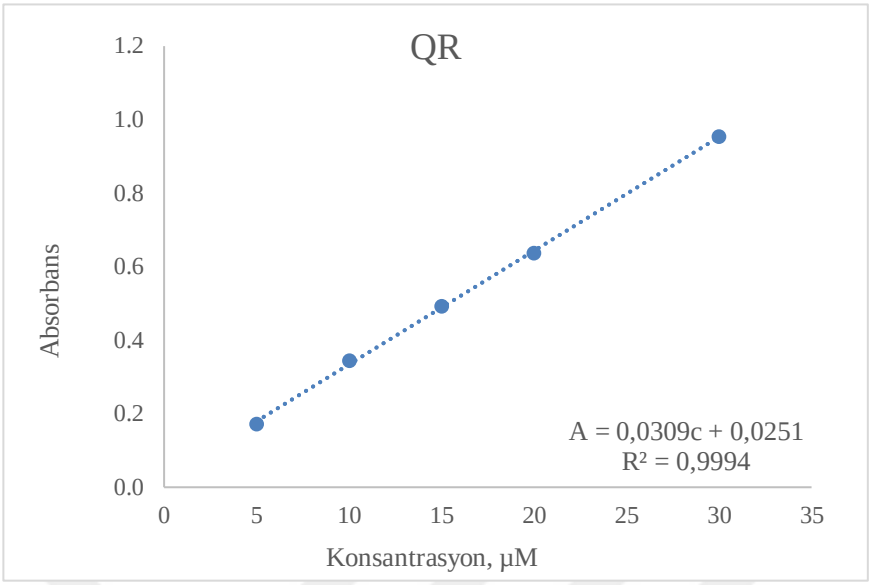
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,185
50	0,314
75	0,518
100	0,698
150	1,015



Şekil 4.1 TR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.2 QR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

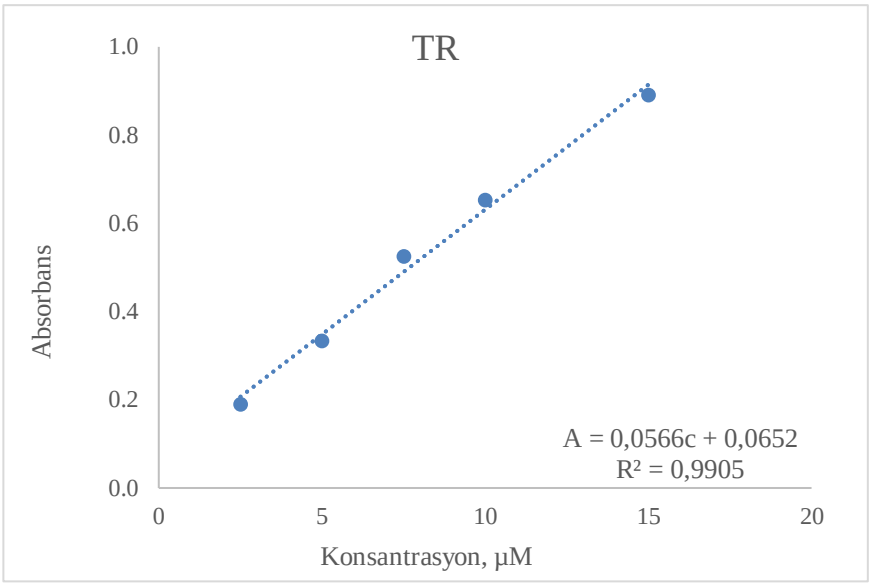
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
5	0,172
10	0,344
15	0,493
25	0,637
30	0,953



Şekil 4.2 QR için 100 µL reaktifin CUPRACx1 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.3 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

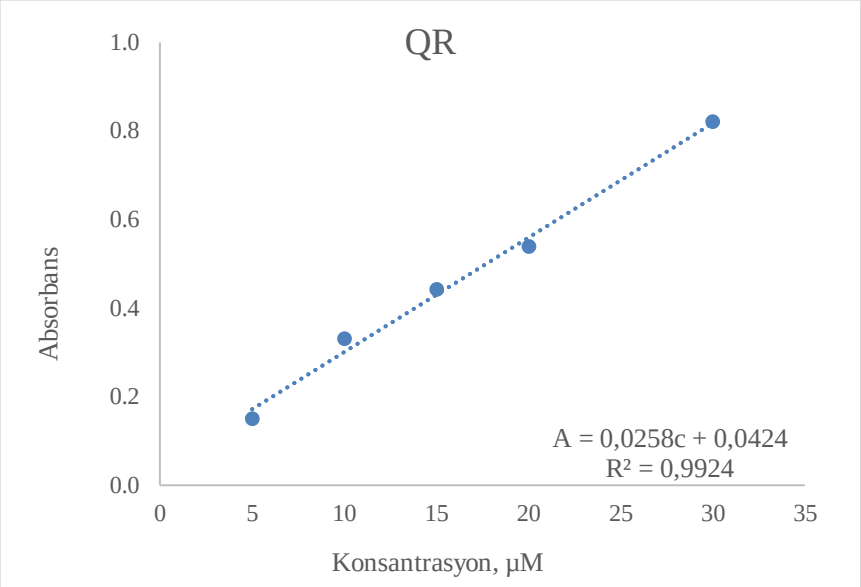
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,189
50	0,333
75	0,525
100	0,653
150	0,890



Şekil 4.3 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.4 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

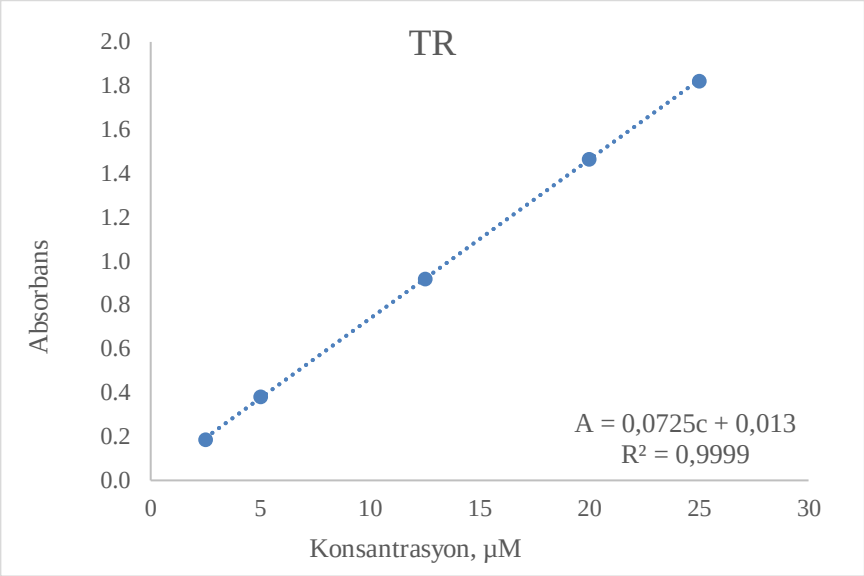
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
5	0,150
10	0,330
15	0,441
20	0,583
25	0,820



Şekil 4.4 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.5 TR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

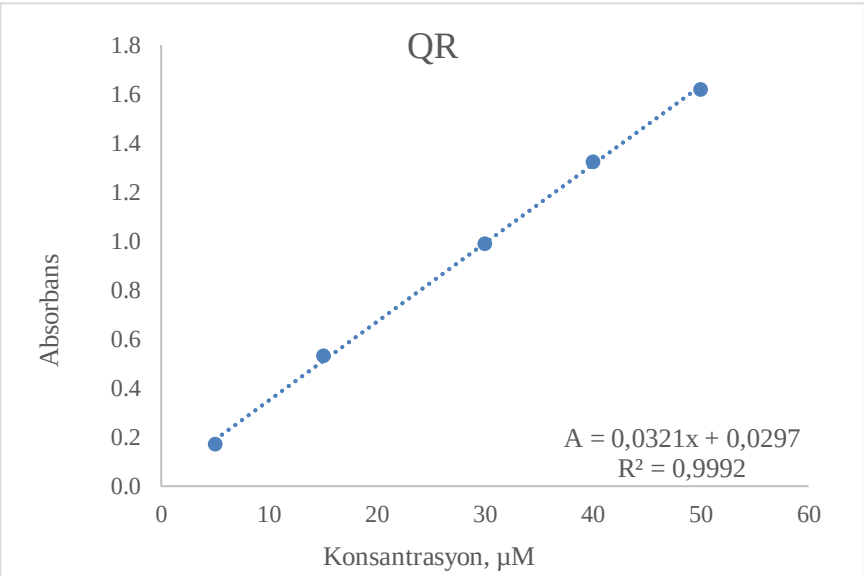
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,187
50	0,382
125	0,921
200	1,467
250	1,822



Şekil 4.5 TR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.6 QR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

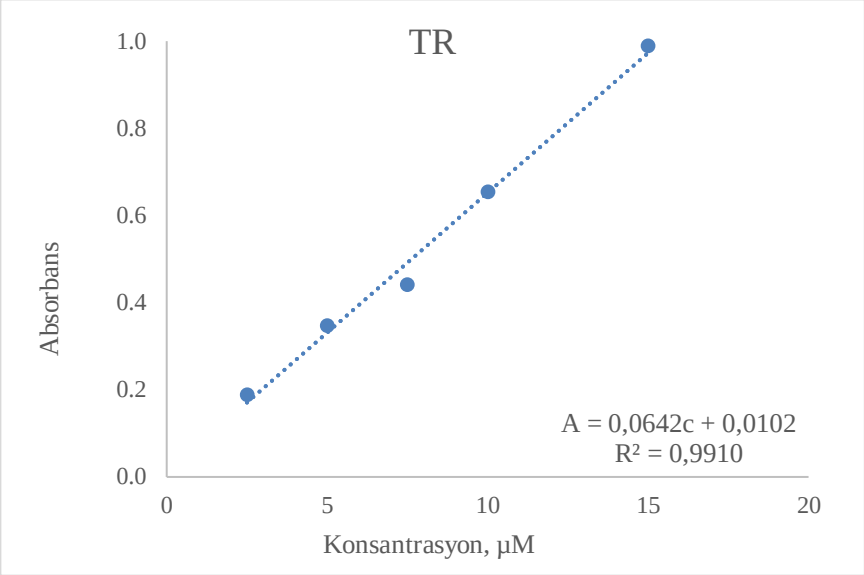
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
5	0,172
15	0,531
30	0,990
40	1,325
50	1,619



Şekil 4.6 QR için 40 µL reaktifin CUPRACx3 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.7 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

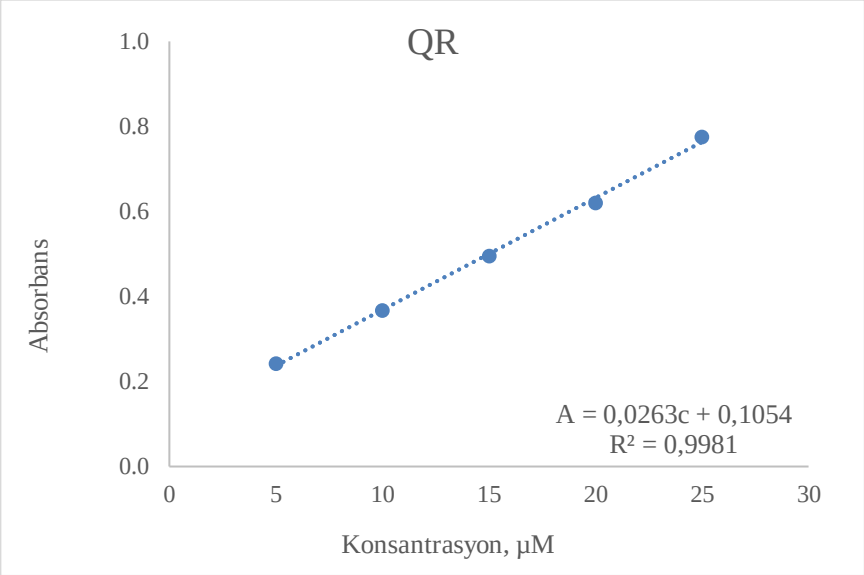
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,188
50	0,347
75	0,440
100	0,654
150	0,989



Şekil 4.7 TR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

Tablo 4.8 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki absorbans değerleri.

Konsantrasyon (µM)	Absorbans
5	0,243
10	0,368
15	0,495
20	0,620
25	0,775



Şekil 4.8 QR için 20 µL reaktifin CUPRACx5 konsantrasyonundaki doğru denklemi.

4.2.KARIŞTIRMA SÜRESİ OPTİMİZASYONU

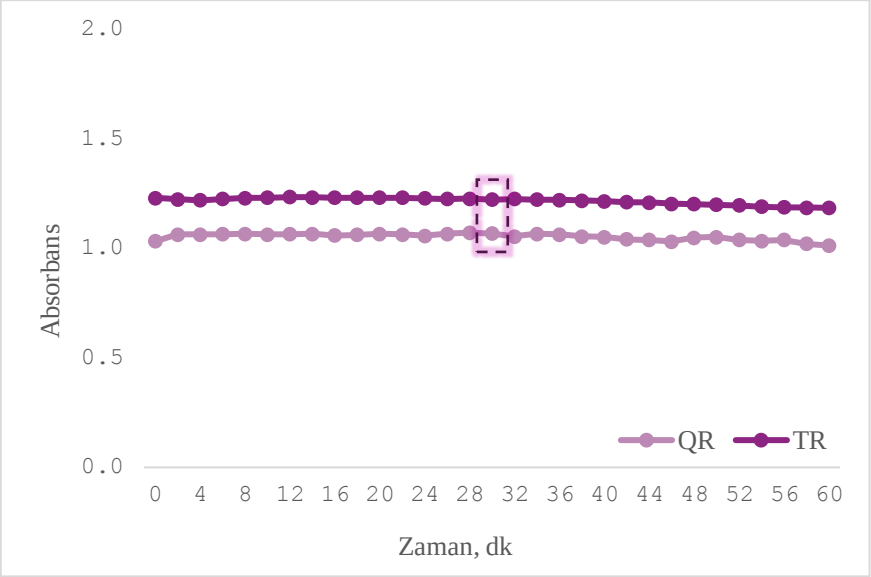
Mikroplakalara sabitlenen CUPRAC reaktifleri, üzerine analiz için ilave edilen çözeltiler ile çözünürler. Bu sebeple, çözelti ilave edildikten sonraki aşamada reaksiyonun tam ve verimli bir şekilde gerçekleşebilmesi için karıştırma süresi önemli bir parametredir. Bu optimizasyonda, TR ($1,5x10^{-4}$ M) ve QR ($3,0x10^{-5}$ M) standartları kuyucuklara ilave edilerek 10 dakika boyunca dakikada bir ölçüm alınmıştır. Optimum parametre en düşük dakikada maksimum absorbans değerlerine sahip olan 5 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Karıştırma süresi optimizasyonu.

4.3.KİNETİK ÇALIŞMALARI

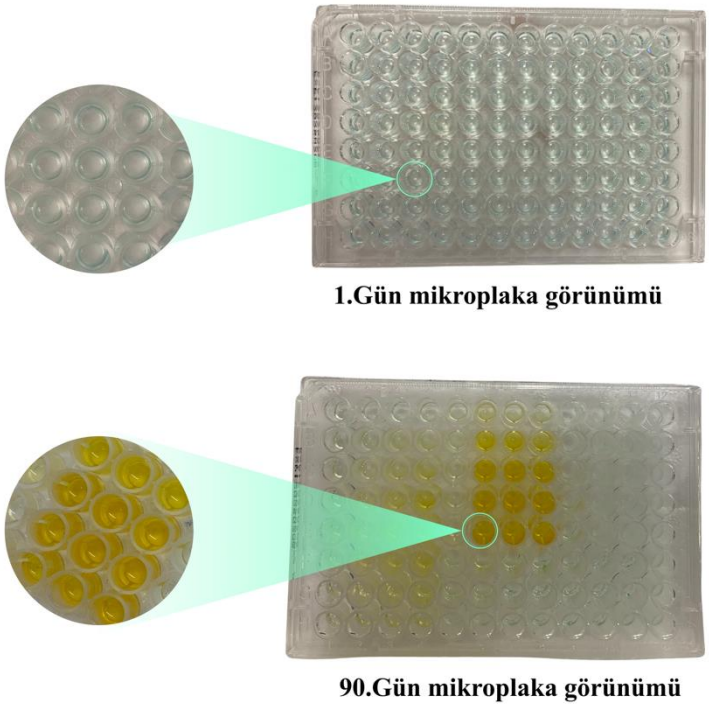
Antioksidan aktivitesi, reaktif türleri gidermek için antioksidanların etkisine ilişkin kinetiği genellikle reaksiyon hızları veya birim zaman başına düşen serbest radikalleri süpürme yüzdeleri olarak ifade edilir. Antioksidan kapasitesi ise reaktif türlerin antioksidanlar tarafından termodinamik dönüşüm verimliliğini, yani sabit bir zaman periyodunda bir mol antioksidan tarafından süpürülen serbest radikallerin mol sayısını ifade eder [110]. Antioksidan analizleri, ölçülen antioksidan türüne göre (örneğin lipofilik/hidrofilik ya da enzimatik/enzimatik olmayan) veya analiz ortamına göre (örneğin sulu ya da organik çözücü) farklılık gösterebilir. Bu nedenle, geliştirilen yöntemin mekanizmasını daha iyi anlamak, analizlerin verimini ve güvenilirliği arttırmak amacıyla referans antioksidan standart çözeltileri olarak TR ($1,5x10^{-4}$ M) ve QR ($3,0x10^{-5}$ M) seçilerek kinetik çalışmaları yapılmıştır. Mikroplaka okuyucu içerisinde 2 dakikada bir ölçüm alınacak şekilde 60 dakika boyunca absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Optimum süre maksimum absorbansın sabitlendiği dakika olan 25 dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



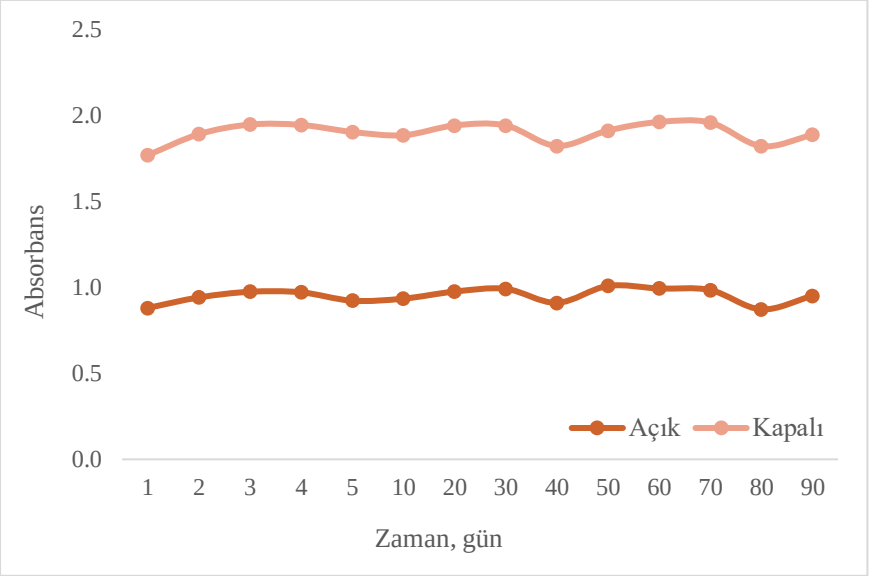
Şekil 4.10 Kinetik çalışmaları absorbans değerleri grafiği.

4.4.KARARLILIK ÇALIŞMALARI

CUPRAC reaktifi kaplanmış mikroplakaların açık ve kapalı ortamlarda antioksidan bileşiklere gösterdikleri aktivite ve fiziksel görünümü incelemek amacıyla kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Optimum parametrelerde hazırlanan mikroplakalar, -20°C de 90 gün boyunca tutulmuştur. Referans olarak troloks standart çözeltisi kullanılmıştır. İlk 5 gün art arda analiz yapıldıktan sonra 10 gün arayla absorbans ölçümlerine devam edilmiştir. Her bir ölçüm günü kuyucuklara $1{,}25x10^{-4}$ M TR çözeltisinden 200 µL ilave edilerek üç tekrarlı çalışılmıştır. Elde edilen absorbans ölçümleri antioksidan içermeyen kör çözeltiden çıkartılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'te gösterilmiştir. Reaktif kaplanmış açık ve kapalı mikroplakaların 90 gün boyunca stabil kalabildiği ve analitik performansını koruduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11 Stabilite çalışmasının 1. ve 90. gün görünümleri.



Şekil 4.12 Kararlılık çalışmaları absorbans değerleri grafiği.

4.5.ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KALİBRASYON GRAFİKLERİ

Geliştirilen sensörde referans olarak kullanılan TR standart bileşiği $1{,}0x10^{-3}$ M olarak hazırlanmıştır. Yöntemin belirlenen optimum koşullarında (Tablo 4.9), antioksidan bileşiğinden artan konsantrasyonlarda bir seri çözelti hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği 5 farklı derişim ile 3 tekrarlı olacak şekilde absorbans ölçümleri ile oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.13' de verilmiştir.

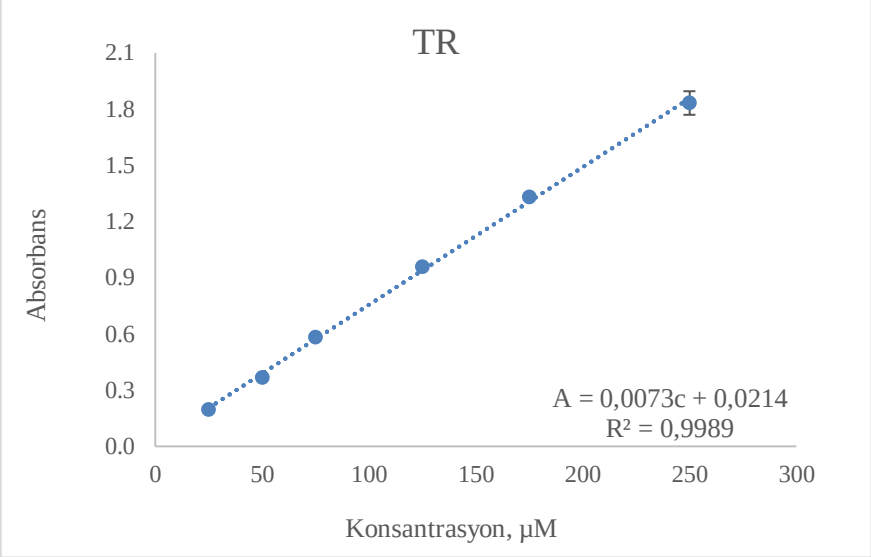
Tablo 4.9 Geliştirilen mikroplaka esaslı sensörün optimum parametreleri.

Parametreler	Değerler
Cu(II)-Nc Reaktif Konsantrasyonu	CUPRACx3
Cu(II)-Nc Reaktif Hacmi	40 µL
Karıştırma Süresi	5 dk
İnkübasyon/Bekleme Süresi	25 dk
Antioksidan/Örnek Hacmi	200 µL

Sonraki aşamada, plazma ve gıda örneklerinde bolca bulunan antioksidan bileşiklerine (kuersetin, gallik asit, rutin, α-tokoferol, askorbik asit, bilirubin ve kateşin) mikroplaka esaslı CUPRAC yöntemi uygulanarak her bir antioksidan bileşiği için kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur.

Tablo 4.10 Troloksun geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

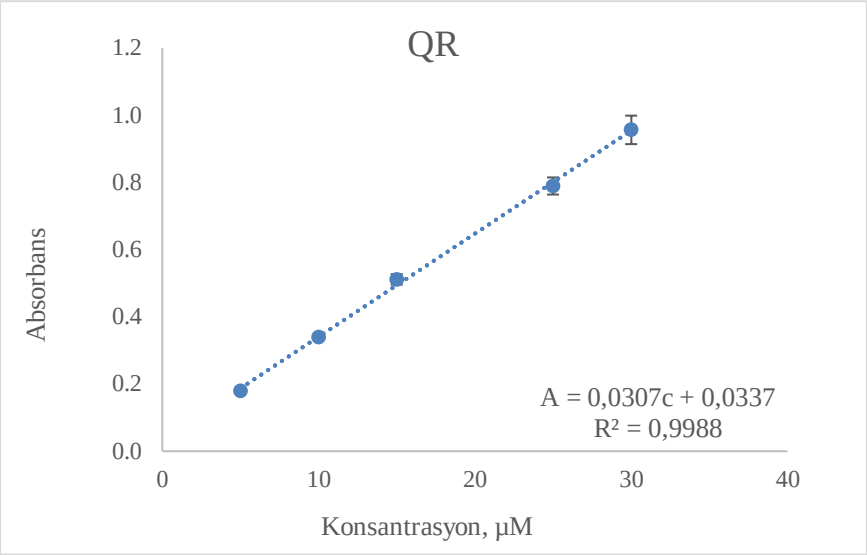
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,197
50	0,368
75	0,583
125	0,958
175	1,330
250	1,833



Şekil 4.13 Troloksun geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.11 Kuersetinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

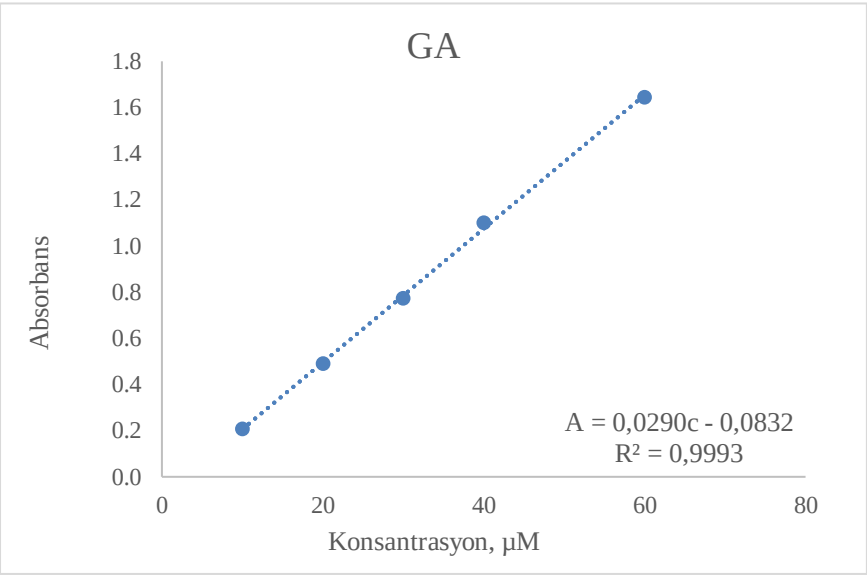
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
5	0,180
10	0,339
15	0,512
25	0,790
30	0,957



Şekil 4.14 Kuersetinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.12 Gallik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

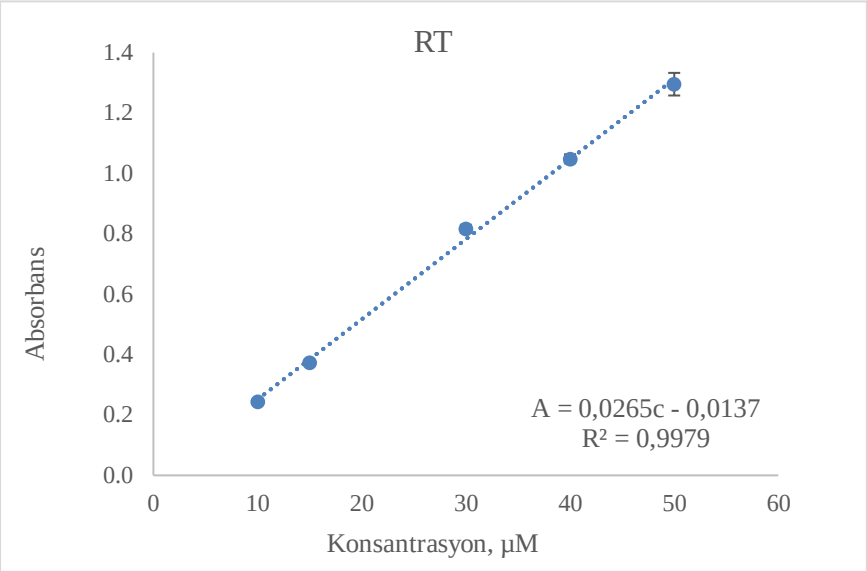
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
10	0,208
20	0,491
30	0,773
40	1,100
60	1,645



Şekil 4.15 Gallik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.13 Rutinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

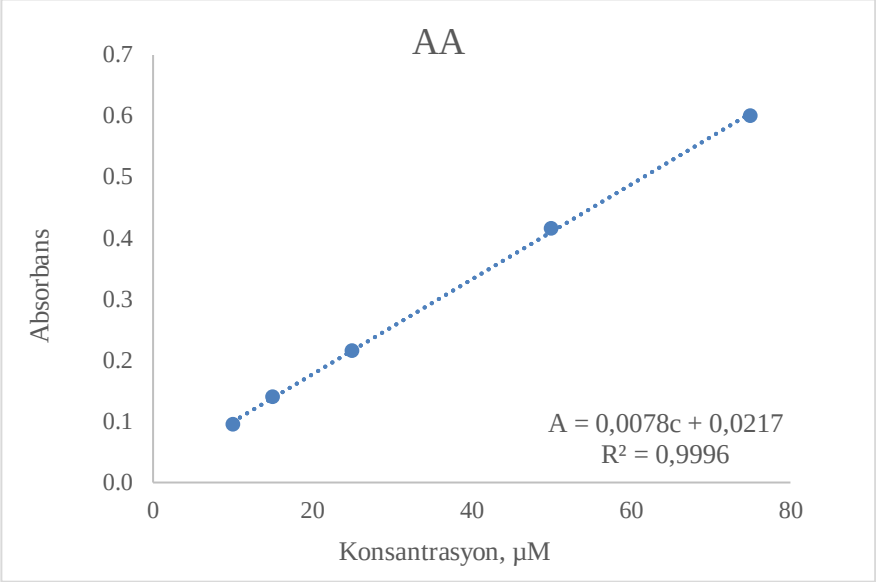
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
10	0,244
15	0,373
30	0,817
40	1,049
50	1,296



Şekil 4.16 Rutinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.14 Askorbik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

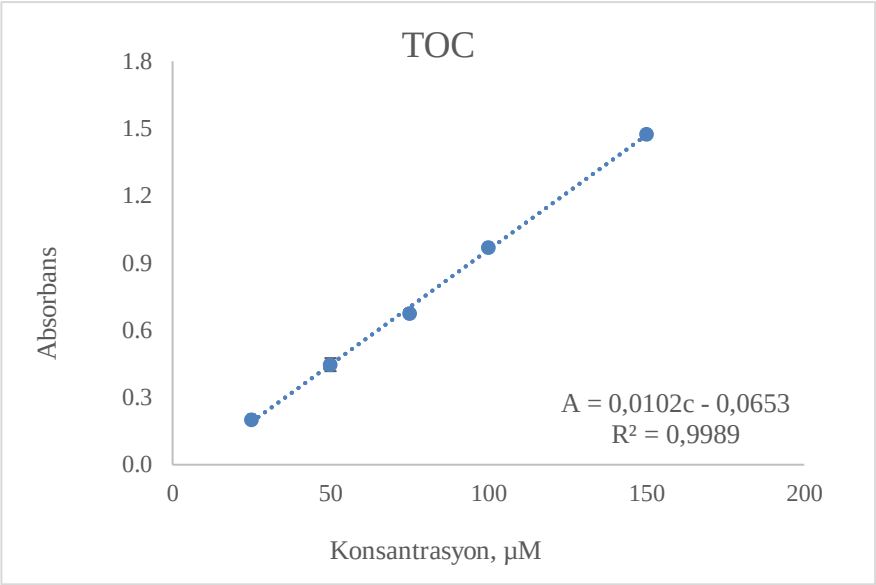
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
10	0,096
15	0,141
25	0,216
50	0,416
75	0,601



Şekil 4.17 Askorbik asitin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.15 α-tokoferolün geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

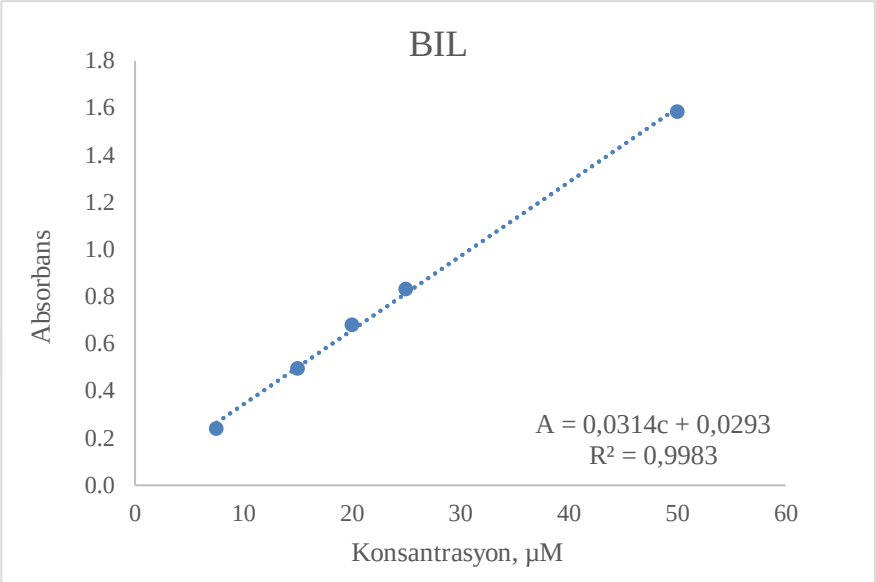
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
25	0,202
50	0,447
75	0,675
100	0,970
150	1,474



Şekil 4.18 α-tokoferolün geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.16 Bilirubinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

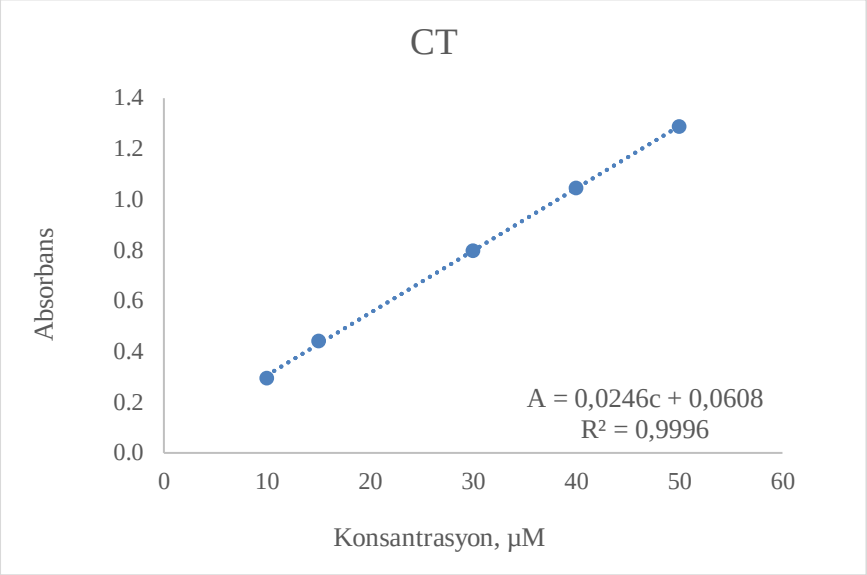
Konsantrasyon (µM)	Absorbans
7,5	0,241
15	0,496
20	0,681
25	0,834
50	1,586



Şekil 4.19 Bilirubinin optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.17 Kateşinin geliştirilen optik sensör uygulaması ile elde edilen absorbans değerleri.

Konsantrasyon (µM)	Absorbans
10	0,296
15	0,441
30	0,799
40	1,046
50	1,287



Şekil 4.20 Kateşinin optik sensör uygulaması ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Çalışılan antioksidan bileşiklerinin mikroplaka esaslı CUPRAC yöntemi uygulanarak oluşturan kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri, korelasyon katsayıları ve doğrusal lineer aralıkları belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ile bileşiklerin TEAC değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.18).

Tablo 4.18 Antioksidan bileşiklerin geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör ile elde edilen doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorplama katsayıları ve TEAC değerleri.

Antioksidanlar	Doğru Denklemleri ve Korelasyon Katsayıları	Lineer Aralıklar (µM)	TEAC (geliştirilen sensör)	TEAC (geleneksel CUPRAC)
TR	A=0,007c-0,021 R² =0,9989	4,14 – 168,43	1,00	1,00
QR	A=0,031c+0,034 R² =0,9988	0,52 – 37,61	4,43	4,38
GA	A=0,029c-0,083 R² =0,9993	4,59 – 44,24	4,14	2,62
RT	A=0,027c-0,014 R² =0,9979	2,37 – 44,96	3,86	2,56
AA	A=0,008c+0,022 R² =0,9996	3,50 – 147,25	1,14	0,96
TOC	A=0,010c-0,065 R² =0,9989	11,50 – 126,50	1,43	1,10
BIL	A=0,031c-0,046 R² =0,9983	2,55 – 39,70	4,43	3,18
CT	A=0,025c+0,061 R² =0,9996	0,36 – 45,56	3,57	3,09

A: Absorbans, c: konsantrasyon (µM)

4.6.GERİ KAZANIM ÇALIŞMALARI

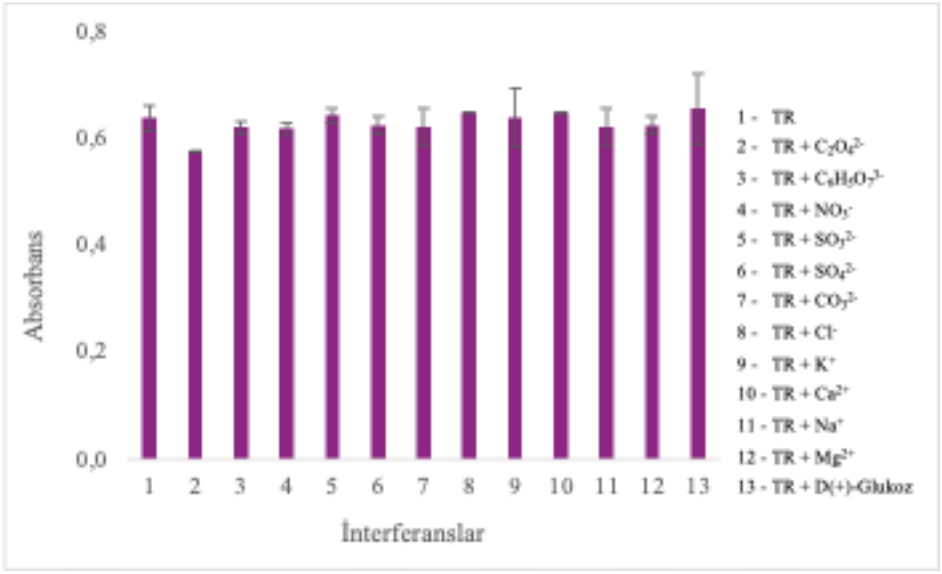
Geliştirilen mikroplaka esaslı CUPRAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanım çalışmalarının araştırılması amacıyla siyah çay ile antioksidan katkı çalışmaları yapılmıştır. Denemelerde toplanan veriler ile kullanılan antioksidan bileşiklerin yüzde geri kazanımları ve bağıl standart sapmaları (%RSD) hesaplanmıştır ve Tablo 4.19'te özetlenmiştir.

Tablo 4.19 Siyah çay infüzyonunda antioksidan bileşiklerin katkısı ile elde edilen sonuçlar (N=3)

Katkı Yapılan Antioksidanlar	İlave Edilen Derişim (μM)	Bulunan Derişim (μM)	Standart Sapma	%RSD	%Geri Kazanım
CT	11,75	10,59	0,01	0,39	90,13
QR	8,26	7,41	0,04	5,11	89,71
AA	18,74	16,57	0,01	1,18	88,44

4.7.İNTERFERANS ÇALIŞMALARI

Geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensörün seçiciliğini ve gerçek örnek matrikslerinde bulunan girişim yapabilecek çeşitli iyonlarla etkileşime girme durumunu incelemek amacıyla interferans çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda, $1{,}5x10^{-4}$ M TR standart çözeltisine hedef analitin 1000 katı derişimde hazırlanan interferan çözeltiler ilave edilerek bir seri ölçüm yapılmıştır. Analit derişiminin çok üzerinde olmalarına rağmen etkinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde kalması, geliştirilen sensörün karmaşık gıda ve biyolojik matrikslerde yüksek seçicilikle analiz yapabilme kapasitesini ortaya koymuştur.



Şekil 4.21 Geliştirilen mikroplaka esaslı sensörün troloks tayini sırasında girişim yapıcı maddelerin absorbans üzerine etkisi.

4.8.GERÇEK ÖRNEK UYGULAMALARI

Gerçek örnekler, geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör yöntemine Bölüm 3.3.4 'de belirtilen şekliyle hazırlanmıştır. Mikroplaka kuyucuklarına sabitlenmiş Cu(II)-Nc reaktifi ile muamele edilen her bir örnek için 3 tekrarlı absorbans değerleri elde edilmiştir. Deneysel işlem sonrasında elde edilen absorbans değerleri kullanılarak TR eşdeğeri cinsinden derişim hesapları yapılmıştır. Geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensörünün hassasiyetini ve doğruluğunu incelemek amacıyla geleneksel CUPRAC yöntemi ile karşılaştırma yapılmıştır. Hazırlanan her bir gerçek örneğe geleneksel CUPRAC yöntemi de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.20 ve Tablo 4.21'de gösterilmiştir.

Tablo 4.20 Çay örneklerinin mikroplaka esaslı optik sensör ve geleneksel CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.

Çay Örnekleri	Geliştirilen Sensör (mmol TR/g-örnek)	Geleneksel CUPRAC (mmol TR/g-örnek)
Siyah Çay	0,580 ± 0,013	0,469 ± 0,025
Papatya Çayı	0,244 ± 0,003	0,390 ± 0,006
Kuşburnu Çayı	0,425 ± 0,002	0,316 ± 0,009

Tablo 4.21 Serum örneklerinin mikroplaka esaslı optik sensör ve geleneksel CUPRAC yöntemlerine göre belirlenen toplam antioksidan kapasite değerleri.

Serum Örnekleri	Geliştirilen Sensör (mM TR)	Geleneksel CUPRAC (mM TR)
Fare	0,272 ± 0,013	0,597 ± 0,011
At	0,183 ± 0,001	0,281 ± 0,009
İnsan	0,205 ± 0,012	0,329 ± 0,013

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksidatif stres, canlı organizmalarda üretilen reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma sistemi arasındaki hassas dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan ve hücrelerde protein, lipid ve DNA hasarına yol açan bir durumdur. Bu hasarlar kanser, diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar ve nörodejeneratif bozukluklar başta olmak üzere birçok hastalığın oluşmasına sebep olurlar. Serbest radikalleri nötralize ederek bu yıkıcı etkileri minimize eden antioksidanların varlığı, söz konusu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kritik rol oynar. Bu sebeple, gıda ve biyolojik örnekler başta olmak üzere kompleks matrikslerde antioksidan kapasite yöntemlerinin kullanılması büyük önem taşır. Bu nedenle, literatürde mevcut bulunan tayin yöntemlerine kıyasla birçok avantajları bulunan ulusal ve özgün bir yöntem olan 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' (CUPRAC) yöntemi esas alınmıştır. Yöntemin hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilirliği geniş çalışma imkanları sunmaktadır. Buna ek olarak, yöntemin diğer analitik tekniklere uyumlu bir şekilde çalışabilmesi ve modifiye edilebilir olması gibi birçok olumlu yönleri mevcuttur.

Bu tez çalışmasında, antioksidan kapasite tayini için Cu(II)-Nc reaktifi kullanılarak pratik uygulamaya sahip, seçici ve yenilikçi mikroplaka esaslı bir optik sensör geliştirilmiştir. İlk olarak, reaksiyon verimini ve renk oluşumunu doğrudan etkilediği için mikroplakalara immobilize edilen Cu(II)-Nc reaktifinin ve tampon çözeltisinin konsantrasyonları ve hacimleri optimize edilmiştir. Optimum parametreleri belirlemek amacıyla referans antioksidan bileşiği olarak troloks ve kuersetin kullanılarak kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları karşılaştırma yapıldığında optimum koşullar olarak geleneksel CUPRAC reaktifinin 3 katı seçilmekle birlikte uygun hacim 40 μL olarak belirlenmiştir. İkinci aşamada, mikroplaka üzerine immobilize edilmiş Cu(II)-Nc reaktifinin homojen bir şekilde çözündüğü karıştırma süresinden emin olmak amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmış ve optimum karıştırma süresi 5 dakika olarak belirlenmiştir. Bir sonraki aşamada, reaksiyon hızlarını ve buna bağlı olarak geliştirilen yöntemin mekanizmasını daha iyi anlamak amacıyla kinetik çalışmaları yapılmıştır. Cu(II)-Nc reaktifinin immobilize edildiği mikroplakalarla troloks ve kuersetin antioksidan bileşikleri her 2 dakikada bir absorbans ölçümleri alınarak 60 dakika boyunca muamele edilmiştir. Optimum süre maksimum absorbansın sabitlendiği 25 dakika olarak belirlenmiştir. Son aşamada ise geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensörün kararlılık çalışmaları yapılmıştır. Biri orijinal

mikroplaka kapağı ile diğeri hava almayan bir ambalaj içerisinde -20°C'de muhafaza edilerek 90 gün boyunca günler arası referans troloks ($1,25x10^{-4}$ M) çözeltisi ile muamele edilerek değerlendirilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen absorbans ölçümleri değerlendirildiğinde belirgin bir değişme olmadığı ve sensörün 90 gün boyunca her iki koşulda da kararlılığını koruduğu gözlemlenmiştir.

Tüm optimum koşullar belirlendikten sonra geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör kullanılarak troloksun da içinde bulunduğu toplam 8 antioksidan bileşiğin molar derişim-absorbans kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Tablo 4.18'de standart antioksidan bileşiklerin lineer doğru denklemleri, korelasyon katsayıları, doğrusal çalışma aralıkları ve TEAC değerleri listelenmiştir. Elde edilen sonuçlar geleneksel CUPRAC yöntemi ile karşılaştırıldığında TEAC değerlerinin geliştirilen yöntem ile uyumlu olduğu bazı antioksidanlar için nispeten daha yüksek değerler bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin CUPRAC yöntemine kıyasla sıra korelasyon katsayısı (Spearman'ın Rho değeri) 0,9550 ($P = 0,00081$) olup, $P < 0,01$ seviyesinde iki değişken arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul bulunmuştur.

Siyah çay infüzyonuna ilave edilen standart antioksidan bileşiklerinin (kateşin, askorbik asit, kuersetin) çözeltilerine uygulanan mikroplaka esaslı optik sensör sonucunda önerilen yöntemin tekrarlanabilirliği ve doğruluğunu temsil eden geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yürütülen çalışmada, belirlenen derişimlerde elde edilen absorbans ölçümlerinin hesaplanan bağıl standart sapma (%RSD) değerleri yöntemin tekrarlanabilirliğini temsil etmektedir. Her bir antioksidan bileşiğinin geri kazanım değerleri mikroplaka esaslı optik sensör ile oluşturulan bireysel kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak hesaplanmıştır. Geri kazanım sonuçları %88,44 ile %90,13 arasında olduğu gözlemlenmektedir.

Çay ve serum örneklerinde gerçekleştirilerek elde edilen TAC değerleri, geleneksel CUPRAC ve geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör kullanılarak TEAC değerleri sıvı örnekler için (mM TR) denklem (5.1) ve katı örnekler için (mmol TR/g-örnek) denklem (5.2) kullanılarak yapılmıştır. Aşağıdaki denklemlerde; ölçülen absorbans değeri A, troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı ε_{TR}, CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi V_f, analiz sırasında alınan örnek hacmi V_s, seyreltme faktörü r, hazırlanan ekstrenin hacmi V_e ve ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı m ile gösterilmektedir. Çay ve serum örnekleri için hesaplanan TAC değerleri Tablo 4.20 ve Tablo 4.21'de özetlenmiştir. Geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör kullanılarak çay örneklerinden elde edilen TAC değerleri büyükten küçüğe göre sırasıyla siyah

çay, kuşburnu ve papatya şeklindedir. Karşılaştırma metodu olarak kullanılan geleneksel CUPRAC yöntemi ile elde edilen sonuçlarda ise papatya çayının antioksidan kapasite değerinin daha yüksek çıktığı gözlemlenmiştir. Önerilen yöntemin uygulandığı serum örneklerinde ise TAC değerleri büyükten küçüğe doğru sırasıyla fare, insan ve at olarak belirlenmiştir. Bütün bulgular birlikte toplandığında geleneksel CUPRAC ve önerilen metottaki değerlerin sıralaması birbirleri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Tablo 4.20'deki geliştirilen sensöre göre çay örneklerinin TAC değerlerinin hiyerarşisi geleneksel CUPRAC yöntemi ile genel olarak tutarlı bulunmuştur. Tablo 4.20'de sunulan kapasite verilerinin optik sensör ve geleneksel CUPRAC yöntemleri ile elde edilen doğrusal regresyon analizi, geliştirilen sensörün geleneksel yöntem ile iyi korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (P = 0,05 için $F_{deneysel}$ = 0,08, $F_{kritik(tablo)}$ = 18,51, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$). Ayrıca, sentetik serum örnekleri ile yapılan denemeler neticesinde optik sensör ile elde edilen veriler genel olarak geleneksel yöntem ile uyumlu bulunmuş olup elde edilen doğrusal regresyon analizi, geliştirilen sensörün geleneksel yöntem ile iyi korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (P = 0,05 için $F_{deneysel}$ = 6,46, $F_{kritik(tablo)}$ = 18,51, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$).

$$\text{Antioksidan Kapasite (mM TR)} = (A/\varepsilon_{TR}).(V_f / V_s).\, r\, .1000 \quad (5.1)$$

$$\text{Antioksidan Kapasite (mmol TR / g-örnek)} = (A/\varepsilon_{TR}).(V_f / V_s).r.(V_e/m) \quad (5.2)$$

Bu tez kapsamında, çay ve serum örneklerinde TAC değerlerinin belirlenmesi için CUPRAC yöntemi esas alınarak yeni mikroplaka esaslı optik sensör geliştirilmiştir. Günümüzde antioksidan tayini için geliştirilen sensörler, hızlı ve düşük maliyete sahip olmaları nedeniyle oldukça büyük önem taşımaktadır. Optik sensörler minyatür hale dönüştürülebilmeleri ve otomasyon sistemlere entegre edilebilmeleri gibi birçok avantajları sayesinde yerinde tayin için elverişli ve pratik yöntemler olarak kullanılmaktadır.

Tez çalışmasında geliştirilen mikroplaka esaslı optik sensör ile elde edilen sonuçlar referans yöntem olarak seçilen orijinal/geleneksel CUPRAC yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, geleneksel CUPRAC reaktifi, Cu(II)-Nc, belirlenen optimum konsantrasyon ve hacimde liyofilizasyon işlemi uygulanarak mikroplakanın kuyucuklarına sabitlenmiş ve reaktifin çeşitli antioksidan bileşiklerine karşı aktivitesini kaybetmediği ortaya konularak bir optik sensör geliştirilmiştir. Önerilen mikroplaka esaslı optik sensör, çeşitli antioksidanların geniş derişim aralıklarında geleneksel CUPRAC yöntemi referans alınarak incelenmiştir. Bununla birlikte, karmaşık matriks örneklerinde gerçekleştirilen başarılı geri kazanım sonuçları ile belirlenmiş toplam antioksidan kapasitesinin, geçmiş yıllardan beri kullanılarak popülerliğini arttırmış olan CUPRAC yöntemi ile karşılaştırılarak uyumluluğu tespit edilerek, geliştirilen yöntemin yüksek doğrulukta ve gerçek örneklerde kullanılabilir olduğunu ortaya koymuştur. Bu tez kapsamında sonuç olarak, antioksidanların yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip tayini amacıyla düşük maliyetli, kolay kullanılabilir, hızlı ve yenilikçi bir yöntem olarak mikroplaka esaslı optik sensör tasarlanmakla birlikte literatüre sunulmuştur.

6. KAYNAKLAR

1. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10:3886–907. https://doi.org/10.3390/ijerph10093886

2. Şen, F., 2018, *Antioksidan Kapasite Ölçümü için Doğal Polimer Film Esaslı Optik Sensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

3. Bener M, Şen FB, Apak R. Heparin-stabilized gold nanoparticles-based CUPRAC colorimetric sensor for antioxidant capacity measurement. *Talanta*. 2018;187:148–55. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.021

4. Khan A, Numan M, Khan AL, Lee I-J, Imran M, Asaf S, et al. Melatonin: Awakening the Defense Mechanisms during Plant Oxidative Stress. *Plants.* 2020;9:407. https://doi.org/10.3390/plants9040407

5. Speisky H, Shahidi F, Costa de Camargo A, Fuentes J. Revisiting the Oxidation of Flavonoids: Loss, Conservation or Enhancement of Their Antioxidant Properties. *Antioxidant*s. 2022;11:133. https://doi.org/10.3390/antiox11010133

6. Keddar MN, Ballesteros-Gómez A, Amiali M, Siles JA, Zerrouki D, Martín MA, et al. Efficient extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from microalgae with supramolecular solvents. *Sep Purif Technol.* 2020;251:117327. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117327

7. Davies KJA. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life.* 2000;50:279–89. https://doi.org/10.1080/713803728

8. Prior RL. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods.* 2015;18:797–810. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018

9. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of Tissue Homogenates and Their Cytosols. *Arch Biochem Biophys.* 2001;388:261–6. https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2292

10. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J Agric Food Chem.* 2016;64:997–1027. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739

11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic *Biol Med.* 1999;26:1231–7. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3

12. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition Research.* 2003;23:1719–26. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.08.005

13. Bener M, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Novel Optical Fiber Reflectometric CUPRAC Sensor for Total Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts and Biological Samples. *J Agric Food Chem.* 2013;61:8381–8. https://doi.org/10.1021/jf402327x

14. Lamuela-Raventós RM. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. *Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd;* 2017. p. 107–15. https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6

15. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol.* 2020;94:651–715. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

16. Krumova K, Cosa G. Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. 2016. p. 1–21. https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001

17. Masenga SK, Kabwe LS, Chakulya M, Kirabo A. Mechanisms of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24:7898. https://doi.org/10.3390/ijms24097898

18. Aranda-Rivera AK, Cruz-Gregorio A, Arancibia-Hernández YL, Hernández-Cruz EY, Pedraza-Chaverri J. RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. Oxygen. 2022;2:437–78. https://doi.org/10.3390/oxygen2040030

19. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organization Journal. 2012;5:9–19. https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613

20. Jin S, Kang PM. A Systematic Review on Advances in Management of Oxidative Stress-Associated Cardiovascular Diseases. Antioxidants. 2024;13:923. https://doi.org/10.3390/antiox13080923

21. Li Z, Guo D, Wang C, Chi X, Liu Z, Wang Y, et al. Toxic effects of the heavy metal Cd on Apis cerana cerana (Hymenoptera: Apidae): Oxidative stress, immune disorders and disturbance of gut microbiota. Science of The Total Environment. 2024;912:169318. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169318

22. Mostafavi Abdolmaleky H, Zhou J-R. Gut Microbiota Dysbiosis, Oxidative Stress, Inflammation, and Epigenetic Alterations in Metabolic Diseases. Antioxidants. 2024;13:985. https://doi.org/10.3390/antiox13080985

23. Houldsworth A. Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: a review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants. Brain Commun. 2023;6. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad356

24. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2004;58:39–46. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2003.11.004

25. Yang J, Luo J, Tian X, Zhao Y, Li Y, Wu X. Progress in Understanding Oxidative Stress, Aging, and Aging-Related Diseases. Antioxidants. 2024;13:394. https://doi.org/10.3390/antiox13040394

26. Weinberg Sibony R, Segev O, Dor S, Raz I. Overview of oxidative stress and inflammation in diabetes. J Diabetes. 2024;16. https://doi.org/10.1111/1753-0407.70014

27. Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. Mol Cell. 2021;81:3691–707. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.018

28. Viña J, Borrás C. Women Live Longer than Men: Understanding Molecular Mechanisms Offers Opportunities to Intervene by Using Estrogenic Compounds. Antioxid Redox Signal. 2010;13:269–78. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2952

29. Krumova K, Cosa G. Chapter 1. Overview of Reactive Oxygen Species. 2016. p. 1–21. https://doi.org/10.1039/9781782622208-00001

30. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Arch Toxicol. 2024;98:1323–67. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4

31. Halliwell B. Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2024;25:13–33. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00645-4

32. Zeb A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. J Food Biochem. 2020;44. https://doi.org/10.1111/jfbc.13394

33. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Arch Toxicol. 2020;94:651–715. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

34. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. Eur J Med Chem. 2021;209:112891. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891

35. Khan M, Liu H, Wang J, Sun B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. Food Research International. 2020;130:108933. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933

36. Bener M. Besin Özütleri ve Serumda Antioksidan Kapasite Ölçümü için Moleküler Spektroskopik Sensörler Geliştirilmesi. 2013.

37. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Int J Mol Sci. 2021;22:3380. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

38. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A-F, Teixeira M, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. Chem Rev. 2014;114:3854–918. https://doi.org/10.1021/cr4005296

39. Robbins D, Zhao Y. Manganese Superoxide Dismutase in Cancer Prevention. Antioxid Redox Signal. 2014;20:1628–45. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5297

40. Aebi H. [13] Catalase in vitro. 1984. p. 121–6. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3

41. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. Free Radic Biol Med. 2015;87:84–97. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017

42. Min YN, Niu ZY, Sun TT, Wang ZP, Jiao PX, Zi BB, et al. Vitamin E and vitamin C supplementation improves antioxidant status and immune function in oxidative-stressed breeder roosters by up-regulating expression of GSH-Px gene. Poult Sci. 2018;97:1238–44. https://doi.org/10.3382/ps/pex417

43. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. Oncogene. 2003;22:7369–75. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940

44. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Mol Aspects Med. 2009;30:1–12. https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006

45. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Adv Med Sci. 2018;63:68–78. https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005

46. Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. The FASEB Journal. 1999;13:1145–55. https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1145

47. Hamad I, Arda N, Pekmez M, Karaer S, Temizkan G. Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast,

Schizosaccharomyces pombe. J Nat Sci Biol Med. 2010;1:16. https://doi.org/10.4103/0976-9668.71667

48. Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS, Rogers MS, et al. Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity Assay Versus Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay in Plasma. Clin Chem. 2004;50:952–4. https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031526

49. Kaźmierczak-Barańska J, Boguszewska K, Adamus-Grabicka A, Karwowski BT. Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent. Nutrients. 2020;12:1501. https://doi.org/10.3390/nu12051501

50. Parcheta M, Świsłocka R, Orzechowska S, Akimowicz M, Choińska R, Lewandowski W. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. Materials. 2021;14:1984. https://doi.org/10.3390/ma14081984

51. Ahmed P, Mahgoub Azooz M, Nabi G, Ahmad P, Jaleel A, Azooz MM. Generation of ROS and non-enzymatic antioxidants during abiotic stress in plants. Botany Research International [Internet]. 2009;2:11–20. https://www.researchgate.net/publication/257022403

52. Zeb A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. J Food Biochem. 2020;44. https://doi.org/10.1111/jfbc.13394

53. Shen N, Wang T, Gan Q, Liu S, Wang L, Jin B. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. Food Chem. 2022;383:132531. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531

54. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 2001;74:418–25. https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418

55. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016;5:e47. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41

56. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. Nutrients. 2021;13:273. https://doi.org/10.3390/nu13010273

57. Singh RB, Fedacko J, Fatima G, Magomedova A, Watanabe S, Elkilany G. Why and How the Indo-Mediterranean Diet May Be Superior to Other Diets: The Role of Antioxidants in the Diet. Nutrients. 2022;14:898. https://doi.org/10.3390/nu14040898

58. Miller KB, Hurst WJ, Flannigan N, Ou B, Lee CY, Smith N, et al. Survey of Commercially Available Chocolate- and Cocoa-Containing Products in the United States. 2. Comparison of Flavan-3-ol Content with Nonfat Cocoa Solids, Total Polyphenols, and Percent Cacao. J Agric Food Chem. 2009;57:9169–80. https://doi.org/10.1021/jf901821x

59. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. Nutr J. 2010;9:3. https://doi.org/10.1186/1475-2891-9-3

60. Bueno JM, Sáez-Plaza P, Ramos-Escudero F, Jiménez AM, Fett R, Asuero AG. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. Crit Rev Anal Chem. 2012;42:126–51. https://doi.org/10.1080/10408347.2011.632314

61. Lang Y, Gao N, Zang Z, Meng X, Lin Y, Yang S, et al. Classification and antioxidant assays of polyphenols: a review. Journal of Future Foods. 2024;4:193–204. https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.002

62. Huang W-Y, Liu Y-M, Wang J, Wang X-N, Li C-Y. Anti-Inflammatory Effect of the Blueberry Anthocyanins Malvidin-3-Glucoside and Malvidin-3-Galactoside in Endothelial Cells. Molecules. 2014;19:12827–41. https://doi.org/10.3390/molecules190812827

63. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med. 1996;20:933–56. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

64. Leváková Ľ, Lacko-Bartošová M. Phenolic acids and antioxidant activity of wheat species: a review. Agriculture (Pol'nohospodárstvo). 2017;63:92–101. https://doi.org/10.1515/agri-2017-0009

65. Newcombe DT, Cardwell TJ, Cattrall RW, Kolev SD. An optical redox chemical sensor based on ferroin immobilised in a Nafion® membrane. Anal Chim Acta. 1999;401:137–44. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00474-2

66. Nejadmansouri M, Majdinasab M, Nunes GS, Marty JL. An Overview of Optical and Electrochemical Sensors and Biosensors for Analysis of Antioxidants in Food during the Last 5 Years. Sensors. 2021;21:1176. https://doi.org/10.3390/s21041176

67. Munteanu IG, Apetrei C. A Review on Electrochemical Sensors and Biosensors Used in Assessing Antioxidant Activity. Antioxidants. 2022;11:584. https://doi.org/10.3390/antiox11030584

68. Baranwal J, Barse B, Gatto G, Broncova G, Kumar A. Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review. Chemosensors. 2022;10:363. https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363

69. Bener M, Şen FB, Kaşgöz A, Apak R. Carrageenan-based colorimetric sensor for total antioxidant capacity measurement. Sens Actuators B Chem. 2018;273:439–47. https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.061

70. Bener M, Şen FB, Apak R. Novel pararosaniline based optical sensor for the determination of sulfite in food extracts. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2020;226:117643. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117643

71. Guth U, Vonau W, Zosel J. Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review. Meas Sci Technol. 2009;20:042002. https://doi.org/10.1088/0957-0233/20/4/042002

72. Sabri N, Aljunid SA, Salim MS, Ahmad RB, Kamaruddin R. Toward Optical Sensors: Review and Applications. J Phys Conf Ser. 2013;423:012064. https://doi.org/10.1088/1742-6596/423/1/012064

73. Dohn S, Svendsen W, Boisen A, Hansen O. Mass and position determination of attached particles on cantilever based mass sensors. Review of Scientific Instruments. 2007;78. https://doi.org/10.1063/1.2804074

74. Bener M, Apak R. Ferric-o-phenanthroline adsorbed on a Nafion membrane: A novel optical sensor for antioxidant capacity measurement of food extracts. Sens Actuators B Chem. 2017;247:155–62. https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.017

75. Butt MA, Voronkov GS, Grakhova EP, Kutluyarov R V., Kazanskiy NL, Khonina SN. Environmental Monitoring: A Comprehensive Review on Optical Waveguide and Fiber-Based Sensors. Biosensors (Basel). 2022;12:1038. https://doi.org/10.3390/bios12111038

76. Pirzada M, Altintas Z. Recent Progress in Optical Sensors for Biomedical Diagnostics. Micromachines (Basel). 2020;11:356. https://doi.org/10.3390/mi11040356

77. Sabri N, Aljunid SA, Salim MS, Fouad S. Fiber Optic Sensors: Short Review and Applications. 2015. p. 299–311. https://doi.org/10.1007/978-981-287-128-2_19

78. Mignani AG, Ciaccheri L, Cucci C, Mencaglia AA, Cimato A, Attilio C, et al. EAT-by-LIGHT: Fiber-Optic and Micro-Optic Devices for Food Quality and Safety Assessment. IEEE Sens J. 2008;8:1342–54. https://doi.org/10.1109/JSEN.2008.926971

79. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290–302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

80. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. J Agric Food Chem. 2001;49:4619–26. https://doi.org/10.1021/jf010586o

81. Cheng Z, Moore J, Yu L (Lucy). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. J Agric Food Chem. 2006;54:7429–36. https://doi.org/10.1021/jf0611668

82. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. J Agric Food Chem. 2002;50:4437–44. https://doi.org/10.1021/jf0201529

83. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Vírseda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant

activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. J Sci Food Agric. 2015;95:204–9. https://doi.org/10.1002/jsfa.6706

84. Kuswandi B, Fantoni M, Hidayat MA, Ningsih IY. Paper microzone plate based on DPPH as a simple colorimetric assay of the total antioxidant content of herbal extracts. J Food Sci Technol. 2020;57:1971–6. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04378-6

85. Ugar M, Tufan AN, Altun M, Guclu K, Ozyurek M. Glutathione Peroxidase Activity of Biological Samples Using A Novel Microplate-Based Method. Curr Anal Chem. 2018;14:512–8. https://doi.org/10.2174/1573411014666171204154653

86. Chen I-C, Chang H-H, Yang H-W, Chen G-L. Evaluation of total antioxidant activity of several popular vegetables and Chinese herbs: A fast approach with ABTS/H2O2/HRP system in microplates. J Food Drug Anal. 2020;12. https://doi.org/10.38212/2224-6614.2671

87. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. J Funct Foods. 2015;18:757–81. https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047

88. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. J Agric Food Chem. 2005;53:4290–302. https://doi.org/10.1021/jf0502698

89. Apak R. Current Issues in Antioxidant Measurement. J Agric Food Chem. 2019;67:9187–202. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03657

90. Echegaray N, Pateiro M, Munekata PES, Lorenzo JM, Chabani Z, Farag MA, et al. Measurement of Antioxidant Capacity of Meat and Meat Products: Methods and Applications. Molecules. 2021;26:3880. https://doi.org/10.3390/molecules26133880

91. Alam MdN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal. 2013;21:143–52. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002

92. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and

Lipid Peroxidation Assays. J Agric Food Chem. 2016;64:1028–45. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743

93. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. J Agric Food Chem. 2016;64:1028–45. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743

94. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Int J Mol Sci. 2021;22:3380. https://doi.org/10.3390/ijms22073380

95. Zvereva M V., Zhmurova A V. The use of a chemiluminescence in the assessment of the nanomaterials antioxidant activity. Biophys Rev. 2023;15:963–9. https://doi.org/10.1007/s12551-023-01148-4

96. Murillo Pulgarín JA, Bermejo LFG, Durán AC. Evaluation of the antioxidant activity of vegetable oils based on luminol chemiluminescence in a microemulsion. European Journal of Lipid Science and Technology. 2010;112:1294–301. https://doi.org/10.1002/ejlt.201000364

97. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. J Agric Food Chem. 2016;64:997–1027. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739

98. Blainski A, Lopes G, De Mello J. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. Molecules. 2013;18:6852–65. https://doi.org/10.3390/molecules18066852

99. Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC. LIMITATIONS OF FOLIN ASSAYS OF FOLIAR PHENOLICS IN ECOLOGICAL STUDIES. J Chem Ecol. 2001;27:761–78. https://doi.org/10.1023/A:1010306103643

100. Benzie IFF, Devaki M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. Measurement of Antioxidant Activity & Capacity. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 77–106. https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5

101. Özyürek M, Güçlü K, Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2011;30:652–64. https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.016

102. Bener M, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Development of a Low-Cost Optical Sensor for Cupric Reducing Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts. Anal Chem. 2010;82:4252–8. https://doi.org/10.1021/ac100646k

103. Bener M, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Novel Optical Fiber Reflectometric CUPRAC Sensor for Total Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts and Biological Samples. J Agric Food Chem. 2013;61:8381–8. https://doi.org/10.1021/jf402327x

104. Bener M, Şen FB, Apak R. Heparin-stabilized gold nanoparticles-based CUPRAC colorimetric sensor for antioxidant capacity measurement. Talanta. 2018;187:148–55. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.021

105. Kondakçı E, Özyürek M, Güçlü K, Apak R. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. Talanta. 2013;115:583–9. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.006

106. Çekiç SD, Başkan KS, Tütem E, Apak R. Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols. Talanta. 2009;79:344–51. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.061

107. Kuswandi B, Fantoni M, Hidayat MA, Ningsih IY. Paper microzone plate based on DPPH as a simple colorimetric assay of the total antioxidant content of herbal extracts. J Food Sci Technol. 2020;57:1971–6. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04378-6

108. Johnson JB, Mani JS, Naiker M. Microplate Methods for Measuring Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Chickpea: Impact of Shaking. CSAC 2023. Basel Switzerland: MDPI; 2023. p. 57. https://doi.org/10.3390/CSAC2023-15167

109. Indracanti M, Chv S, Sisay T. A 96 Well-Mıcrotıter Plate Abts Based Assay For Estımatıon Of Antıoxıdant Actıvıty In Green Leafy Vegetables. Biotechnology International [Internet]. 2019;12:22–9. www.bti.org.in

110. Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Başkan KS, Erçağ E, Esin Çelik S, et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology. Analytical Methods. 2011;3:2439. https://doi.org/10.1039/c1ay05320e

7. EKLER

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İrem Zehra Kublay
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya (%100 İngilizce)
Mezuniyet Yılı	23.06.2022

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Kimya Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler