



İLYAS YILDIZ

DOKTORA TEZİ

**KİMYA ANA BİLİM DALI
PROF. DR. ÖMER İŞILDAK**

25.02.2022

Her hakkı saklıdır

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DPPH, FRAP VE FCR ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİN TAYİNİ İÇİN
POTANSİYOMETRİK SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve
POTANSİYOMETRİK ÇALIŞMA ŞARTLARININ İNCELENMESİ

İLYAS YILDIZ

TOKAT
25.02.2022

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;
Yükseköğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Öncelikli Alanlar Doktora Burs
Programı,
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
2021/40 nolu proje ile desteklenmiştir.**

JÜRİ KABUL VE ONAY

İlyas YILDIZ tarafından hazırlanan “DPPH, FRAP ve FCR Antioksidan Kapasitelerin Tayini İçin Potansiyometrik Sensörlerin Geliştirilmesi ve Potansiyometrik Çalışma Şartlarının İncelenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 25.02.2022 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından oy birliği/ ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) :.....

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

ONAY

...../...../.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

TEZ BEYANI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Ömer IŞILDAK danışmanlığında hazırlamış olduğum “DPPH, FRAP ve FCR Antioksidan Kapasitelerin Tayini İçin Potansiyometrik Sensörlerin Geliştirilmesi ve Potansiyometrik Çalışma Şartlarının İncelenmesi” adlı Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

25/02/2022

İlyas YILDIZ

İmza

ÖZET

DPPH, FRAP VE FCR ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİN TAYİNİ İÇİN POTANSİYOMETRİK SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ ve POTANSİYOMETRİK ÇALIŞMA ŞARTLARININ İNCELENMESİ

Yıldız, İlyas

Doktora, Biyosensörler Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ömer İŞILDAK

Şubat 2022, xvii+ 91 sayfa

Bu tez çalışmasında vücudumuzda gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda yan ürün olarak açığa çıkan oldukça kararsız moleküller olan serbest radikallerin etkilerini yok eden ve insan sağlığı açısından oldukça önemli olan antioksidanların belirlenmesinde mevcut klasik yöntemlere alternatif olarak hızlı, ekonomik ve duyarlı potansiyometrik biyosensörler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda DPPH radikal giderme testi, toplam fenolik testi (FCR), ve Demir(III) indirgeme gücü testleri (FRAP) için ayrı ayrı potansiyometrik biyosensörler geliştirilmiştir. Geliştirilen her bir biyosensörün seçiciliği, tekrarlanabilirliği, tayin limiti, doğrusal çalışma aralığı ve cevap zamanı gibi potansiyometrik performanslarını niteleyen özellikler belirlenerek antioksidan aktivitenin ölçülebilirliği araştırılmıştır. Geliştirilen DPPH•-seçici PVC membran biyosensör için optimum membran bileşimi % 17,5 iyonofor, % 45,0 PVC, % 37,5 dibütilftalat olarak belirlendi. Biyosensörün DPPH• radikal çözeltisinin 18,75 – 300 mg L⁻¹ konsantrasyon aralığında R² değeri 0,9984 ve tayin limiti 12,75 mg L⁻¹ elde edilmiştir. FCR-seçici PVC membran biyosensörü için en uygun membran bileşim oranı, % 5,0 Gallik asit, % 30,0 PVC, % 65,0 dibütilftalat olarak belirlendi. Biyosensörün FCR çözeltisinin 0,031 – 0,5 mol L⁻¹ 'lık konsantrasyon aralığında R² değeri 0,9996 ve tayin limiti 0,022 mol L⁻¹ elde edilmiştir. FRAP-seçici biyosensörü için en uygun membran bileşimi oranı % 7,0 demir(II)kuersetin, % 34,0 PVC, % 59,0 BEHS olarak belirlendi. Biyosensörün Fe(III) çözeltisinin 1,0×10⁻⁵ – 1,0×10⁻¹ mol L⁻¹ 'lık konsantrasyon aralığında R² değeri 0,9994 ve tayin limiti 8,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensörler bitki örneklerine başarılı bir şekilde uygulandı ve antioksidan tayini oldukça yüksek geri kazanımlarla gerçekleştirildi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, DPPH radikali, FRAP, FCR, biyosensör, sensör, potansiyometri, aktivite testi, yeni metot

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POTENTIOMETRIC BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF DPPH, FRAP AND FCR ANTIOXIDANT CAPACITIES AND INVESTIGATION OF POTENTIOMETRIC WORKING CONDITIONS

Yıldız, İlyas

Doctorate Thesis, Division of Biosensors

PhD Supervisor: Prof. Dr. Ömer İŞILDAK

February, xvii+ 91 pages

In this thesis study, it is aimed to develop fast, low-cost, and sensitive potentiometric biosensors as an alternative to existing classical methods in the determination of antioxidants, which are very important for human health and scavenge the effects of free radicals, which are highly unstable molecules that are released as a by-product as a result of reactions in our body. For this purpose, potentiometric biosensors have been developed separately for DPPH radical scavenging test, total phenolic test (FCR), and Iron (III) reducing power tests (FRAP). The measurability of antioxidant activity was investigated by determining the properties that characterize the potentiometric performance of each developed biosensor, such as selectivity, reproducibility, detection limit, linear operating range and response time. The optimum membrane composition for the developed DPPH•-selective PVC membrane biosensor was determined as 17.5% ionophore, 45.0% PVC, 37.5% dibutylphthalate. The biosensor's R^2 value and detection limit were 0.9984 and 12.75 mg L⁻¹ respectively, in the concentration range of 18.75 – 300 mg L⁻¹ of DPPH• radical solution. The optimal membrane composition ratio for the FCR-selective PVC membrane biosensor was determined as 5.0% Gallic acid, 30.0% PVC, 65.0% dibutylphthalate. The biosensor's R^2 value and detection limit were 0.9986 and 0.022 mol L⁻¹ respectively, in the concentration range of 0.031 - 0.5 mol L⁻¹ of FCR solution. The optimal membrane composition ratio for the FRAP-selective biosensor was determined as 7.0% iron(II)-quercetin complex, 34.0% PVC, 59.0% BEHS. The biosensor's R^2 value and detection limit were 0.9994 and 8.0×10^{-6} mol L⁻¹ respectively, in the concentration range of 1.0×10^{-5} – 1.0×10^{-1} mol L⁻¹ of Fe(III) solution. The developed biosensors were successfully applied to plant samples and antioxidant determination was carried out with very high recoveries.

Keywords: Antioxidant, DPPH radical, FRAP, FCR, biosensor, sensor, potentiometric, new method, activity

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bana her anımda maddi manevi dâhil olmak üzere yol gösteren, tüm bilgisiyle beni yönlendiren, bana bir hocadan fazla olan, hayatımın bundan sonraki her alanında da bana önder ve yanımda olmasından büyük mutluluk duyacağım çok değerli ve kıymetli danışman hocam, Prof. Dr. Ömer IŞILDAK'a

Yüksek lisans eğitimim de tanıdığım ve tanıdığım için çok mutlu ve onur duyduğuyum yüksek lisans da bir danışman olarak başlayıp ve hocadan daha fazlasını yapan, bana hem akademik hem özel hayatta bir önder olan desteğini, bilgisini, tecrübesini esirgemeyen değerli hocam, Prof. Dr. Ramazan ERENLER'e,

Tez izleme komitemdeki yönlendirme ve desteklerinden dolayı, Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a,

Tez çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı, Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a,

Tez çalışmalarım sırasındaki spektrokopik analizleri yapan ve bilgisiyle destek ve yardımlarından dolayı, Öğr. Gör. Dr. Nusret GENÇ'e

100/2000 Doktora burs programı kapsamında öncelikli alanlardan biri olan Biyosensörler programı ile burs desteği sağlayan Yüksek Öğretim Kurulu (YÖK) başkanlığına

İyi günde kötü günde beni maddi manevi destekleyen aileme,

ve 2021/4 nolu proje ile bu tez çalışmasını destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na

Sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım... İLYAS YILDIZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	6
ABSTRACT.....	7
TEŞEKKÜR	8
İÇİNDEKİLER	9
SİMGELER VE KISALTMALAR	12
ŞEKİL LİSTESİ.....	14
ÇİZELGE LİSTESİ.....	16
1 GİRİŞ	17
2 GENEL BİLGİLER.....	19
2.1 Antioksidanlar	19
2.1.1 E vitamini	21
2.1.2 Troloks.....	22
2.1.3 C vitamini	22
2.1.4 Polifenolik bileşikler	23
2.1.5 Gallik asit.....	24
2.1.6 Flavonoidler.....	25
2.2 Antioksidan Aktivite	27
2.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	29
2.3.1 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme yöntemi.....	29
2.3.2 Toplam fenolik bileşik tayin yöntemi (FCR)	30
2.3.3 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan aktivitesi (FRAP)	30
2.4 Potansiyometri.....	31
2.5 Biyosensörler.....	35
2.5.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	36
2.6 İyon Seçici Elektrotlar.....	41
2.7 Biyosensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler.....	42
2.7.1 Seçicilik	42
2.7.2 Cevap zamanı	45

2.7.3	pH çalışma aralığı	47
2.7.4	Tekrarlanabilirlik	47
2.7.5	Tayin limiti	48
2.7.6	Kullanım ömrü.....	48
2.8	Kaynak Özetleri	49
3	MATERYAL ve METOT	56
3.1	Materyal	56
3.1.1	Kullanılan kimyasal maddeler	56
3.1.2	Kullanılan cihazlar.....	57
3.2	Metot	57
3.2.1	Standart çözeltilerin hazırlanması	57
3.2.2	Standart DPPH•, FCR ve FeCl ₃ çözeltilerinin hazırlanması	58
3.2.3	Diğer iyon çözeltilerinin hazırlanması	58
3.2.4	Bitki örneklerinin hazırlanması	58
3.2.5	Biyosensörlerin hazırlanması	59
3.2.6	Biyosensörlerin EMF ölçümleri	62
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	67
4.1	DPPH•-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları	68
4.1.1	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti	70
4.1.2	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliği	71
4.1.3	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliği	72
4.1.4	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı	73
4.1.5	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu	74
4.1.6	DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması.....	75
4.2	FCR-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları ..	77
4.2.1	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti	79
4.2.2	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliği	80
4.2.3	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliği	82
4.2.4	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı	83

4.2.5	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu	83
4.2.6	FCR-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması.....	84
4.3	FRAP-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları .	87
4.3.1	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti.....	89
4.3.2	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliğı	90
4.3.3	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliğı	92
4.3.4	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı.....	93
4.3.5	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu	94
4.3.6	FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması.....	95
5	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	98
6	KAYNAKLAR	103
	ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

a_A	Ana İyon Aktivitesi
a_B	Bozucu Türün Aktivitesi
C_s	Eklenen Standart Çözeltinin Konsantrasyonu
C_x	Analiz Edilen Çözeltinin Bilinmeyen Konsantrasyonu
E	İndikatör Elektrot Potansiyeli
E_0	Standart Elektrot Potansiyeli
E_A	Ana İyon Çözeltisinin Potansiyeli
E_B	Bozucu Türün Çözeltisinin Potansiyeli
F	Faraday Sabiti
$K_{A,B}^{POT}$	Seçicilik Katsayısı
n	Alınıp Verilen Elektron Sayısı
R	İdeal Gaz Sabiti
R^2	Belirleme Katsayısı
S	Elektrotun Doğrusal Potansiyometrik Cevabının Eğimi
T	Mutlak Sıcaklık
t_{95}	Denge Potansiyelinin %95'ine Ulaşılması İçin Geçen Süre
V_s	Eklenen Standart Çözeltinin Hacmi
V_x	Analiz Edilen Çözeltinin Hacmi
Z_A	Ana İyon Yüğü
Z_B	Bozucu Türün Yüğü
$\Delta E/\Delta t$	Birim Zamanda Elektrot Potansiyelinde Meydana Gelen Değişim

Kısaltmalar

Ag/AgCl	Gümüş/gümüş klorür
DPPH	Difenilpikrilhidrazil
FRAP	Ferric reducing ability power
FCR	Folin Ciocalteu reaktifi
GA	Gallik asit
TPTZ	Tripiridintriazin
KUE	Kuersetin
DPPH-SPMB	DPPH- seçici PVC membran biyosensör
DPPH-RSA	DPPH radikal süpürme aktivitesi
FCR-SPMB	FCR- seçici PVC membran biyosensör
FCR-GAE	FCR gallik asit eşdeğer
FRAP-SPMB	FRAP- seçici PVC membran biyosensör
FRAP-TE	FRAP-troloks eşdeğer
EMF	Elektromotor kuvvet
SCE	Doygun Kalomel Elektrot
DBP	Dibütilftalat
BEHS	Bis(2–etilhekzil)sebakat
DEHA	Bis(2–etilhekzil)adipat
o-NPOE	o–nitrofeniloktileter
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İSE	İyon Seçici Elektrot
KTpClPB	Potasyum Tetrakis(4–klorofenil)borat
NaTPB	Sodyum Tetrafenilborat
PVC	Poli(vinil klorür)
THF	Tetrahidrofur

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. Serbest radikalın hücreye vermiş olduğu zarar (Simone, 1992).....	19
Şekil 2. 2 E vitamini kimyasal yapısı	21
Şekil 2. 3 Troloks kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2. 4 Askorbik asidin yapısı ve radikal reaksiyonu sonucu oluşan yapı	23
Şekil 2. 5 Fenol yapısı.....	23
Şekil 2. 6 Fenolik asit türevleri	24
Şekil 2. 7 Gallik asit.....	24
Şekil 2. 8 Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002).	25
Şekil 2. 9 Flavonoid türleri	26
Şekil 2. 10 Kuersetin molekülünün kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2. 11 DPPH radikali ve bir antioksidan ile reaksiyonu.....	29
Şekil 2. 12 Fenolik- Folin-Ciocalteu kompleksi ve reaksiyonu.....	30
Şekil 2. 13. [Fe(III)(TPTZ) ₂] kompleksinin antioksidan ile reaksiyonu.....	31
Şekil 2. 14 Potansiyometrenin çalışma prensibi	32
Şekil 2. 15 Potansiyometrik sistem (Isildak ve ark., 2021)	33
Şekil 2. 16 Şematik biyosensör Sistemi.....	35
Şekil 2. 17 Bir biyosensör sisteminde biyobileşen ve dönüştürücüler (Mello ve Kubota, 2002)	36
Şekil 2. 18 Voltametrik Sistemi	39
Şekil 2. 19 Yaygın olarak kullanılan plastikleştiriciler.....	42
Şekil 2. 20 IUPAC'a göre cevap zamanı (t ₉₅).....	46
Şekil 2. 21 IUPAC'a göre cevap zamanı	46
Şekil 2. 22 İyon seçici bir elektrotun pH çalışma aralığı.....	47
Şekil 2. 23 İyon seçici bir elektrotun tayin limiti belirleme yöntemi	48
Şekil 3. 1 (a) Potansiyometrik bir biyosensörün şematik gösterimi (b) Çalışma süresince geliştirilen biyosensörler	60
Şekil 3. 2 Demir(II)kuersetin kompleksi	61
Şekil 4. 1 DPPH-SPMB'ün potansiyometrik davranışı	69
Şekil 4. 2 DPPH-SPMB'ü ile elde edilen kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 4. 3 DPPH-SPMB'ün tayin limiti potansiyometrik davranışı	70
Şekil 4. 4 DPPH-SPMB tayin limiti grafiği.....	70
Şekil 4. 5 DPPH-SPMB'nün girişim yapan türlere verdiği potansiyel cevabı	72
Şekil 4. 6 DPPH-SPMB tekrarlanabilirliği	72
Şekil 4. 7 DPPH-SPMB cevap zamanı	74
Şekil 4. 8 Gallik asitin DPPH• çözeltilisi ile titrasyonu (A) ve DPPH• çözeltilisinin Gallik asit ile titrasyonu (B).....	75
Şekil 4. 9 FCR-SPMB'ün potansiyometrik davranışı.....	78
Şekil 4. 10 FCR-SPMB'ü ile elde edilen FCR kalibrasyon eğrisi.....	78
Şekil 4. 11 FCR-SPMB'ün tayin limiti potansiyometrik davranışı	79
Şekil 4. 12 FCR-SPMB'ün tayin limiti ve LOD değeri.....	80
Şekil 4. 13 FCR-SPMB'nün girişim yapan türlere verdiği potansiyel cevabı.....	81
Şekil 4. 14 FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirliği	82
Şekil 4. 15 FCR-SPMB'nün cevap zamanı	83
Şekil 4. 16 FCR'nin Gallik asit ile titrasyonu.....	84

Şekil 4. 17 FCR – gallik asit kalibrasyon grafiği.....	85
Şekil 4. 18 FRAP-SPMB’ün potansiyometrik davranışı	89
Şekil 4. 19 FRAP-SPMB’ü ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	89
Şekil 4. 20 FRAP-SPMB’ün tayin limiti potansiyometrik davranışı.....	90
Şekil 4. 21 FRAP-SPMB’nün tayin limiti	90
Şekil 4. 22 FRAP-SPMB’nün seçicilik davranışı.....	92
Şekil 4. 23 FRAP-SPMB’nün tekrarlanabilirliği.....	92
Şekil 4. 24 FRAP-SPMB’nün cevap zamanı	94
Şekil 4. 25 Troloksun Fe(III) çözeltisi ile titrasyonu.....	95
Şekil 4. 26 FRAP-TE miktarının kalibrasyon grafiği	96



ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2. 1 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.....	20
Çizelge 2. 2 Antioksidan Aktivite Tayin Metotları	27
Çizelge 4. 1 DPPH-SPMB % bileşim oranları ve R^2 değerlerleri	68
Çizelge 4. 2 DPPH-SPMB seçicilik katsayıları	71
Çizelge 4. 3 DPPH-SPMB'nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri	73
Çizelge 4. 4 DPPH radikal giderme testinin potansiyometrik ve spektroskopik yöntemlerin kıyaslanması	76
Çizelge 4. 5 FCR-SPMB'nün % bileşim oranları ve R^2 değerlerleri.....	77
Çizelge 4. 6 FCR-SPMB seçicilik katsayıları.....	81
Çizelge 4. 7 FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri..	82
Çizelge 4. 8 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerle elde edilen FCR-GAE test sonuçları	86
Çizelge 4. 9 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerin Bağımsız Örneklem T testi sonuçları.....	86
Çizelge 4. 10 FRAP-SPMB'nün % bileşim oranları ve R^2 değerleri.....	88
Çizelge 4. 11 FRAP-SPMB'nün seçicilik katsayıları	91
Çizelge 4. 12 FRAP-SPMB'nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri	92
Çizelge 4. 13 FRAP Fe(III) indirgeme gücü testi potansiyometrik ve spektroskopik yöntemlerin kıyaslanması	96
Çizelge 4. 14 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerin Bağımsız Örneklem T testi sonuçları.....	97

1 GİRİŞ

Bitkilerin içeriğindeki antioksidan maddelerinin varlığını tespit etmek için aktif bileşiklerin izolasyonuna yönelik yüzlerce çalışma yapılmakta ve yapılmaya devam etmektedir. Antioksidanca zengin meyve, sebze gibi bitkilerin Alzheimer, kalp hastalıkları, kanser gibi birçok hastalıklar için koruyucu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Bu antioksidan maddelerin analizleri için birçok klasik analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bu klasik analiz yöntemleri oksidan/standart madde arasında ki ilişkiyi incelemektedir. Nitel ve nicel olarak antioksidanların tespitinde HPLC ve UV-görünür Spektrometre gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu teknikler pahalı ve zaman alıcıdır. Antioksidanların varlığında kullanılan bu yöntemlerden UV-görünür spektrometre ölçümleri bir indirgeme yükseltgeme potansiyeline bağlı olarak renk değişiminin ölçümü temeline dayanmaktadır. İndirgeme yükseltgeme sonucu oluşan potansiyel farkın ölçülebilmesi nedeniyle potansiyometrik temelli sensörlerle de ölçmesine olanak sağlanmaktadır. Biyosensörler, yüksek seçicilikleri, düşük maliyetli olmaları, taşınabilir, kolay otomasyon, zaman tasarrufu ve üretim kolaylıkları gibi birçok özellikleri nedeniyle çekici alternatif tekniklerdir. Bu nedenle, antioksidan aktivitelerin tespiti için biyosensörlerin geliştirilmesi çalışmaları devam etmekte ve büyük bir ilgi görmektedir. Sensörler, kısaca çevresinde ki kimyasal veya fiziksel değişimleri algılayan araçlardır. Biyosensörler, uygun bir dönüştürücü ile yakın membran hale getirilmiş biyolojik materyalden oluşan analitik bir araç veya sistem olarak tanımlanabilir. Biyolojik tanıma elemanları, bir biyosensör sistemindeki ana seçici unsurdur. Bu unsurlar, organizmalar, antikorlar, dokular, organeller, enzimler ve nükleik asitler olabilirler. Biyolojik tanıma elemanının tipi, biyosensörün seçicilik derecesini belirler. Biyosensörler, dönüştürücü tiplerine göre amperometrik, potansiyometrik, kondüktimetrik, optik, akustik, piezoelektrik ve termal gibi çeşitli tiplerde sınıflandırılabilir.

Antioksidanlar son derece spesifik olarak etkileştikleri oksidan maddeleri söndürerek nötral hale getirirler. Bir antioksidan ile oksidan arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu spesifik bir potansiyel fark oluşur. Bitki ekstraktlarında bolca bulunan

bu antioksidanların oluşturdukları bu potansiyel farklar biyosensör alanlarında yoğun çalışmaların temelini oluşturmaktadır.

Potansiyometrik bir biyosensör, yüksek hassasiyet ve geniş bir lineer aralık gibi umut verici özellikleri nedeniyle diğerk biyosensör sistemleri arasında daha ilgi çekici olmaya başladı. Potansiyometrik biyosensör ile analit konsantrasyonu, farklı analit konsantrasyonlarında çalışan ve referans elektrot ile arasındaki potansiyel farkın değışimi ölçölerek belirlenir.

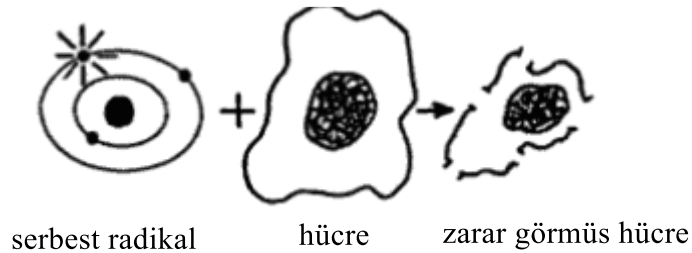
Bu tez çalışmamızda, bitki ekstraktlarında antioksidan kapasitesini belirleme yöntemlerinden DPPH radikal giderme testi, toplam fenolik testi (FCR), ve Demir(III) indirgeme gücü testleri (FRAP) için ayrı ayrı potansiyometrik biyosensörler geliştirilmiştir. Bu biyosensörler ile bitkilerin antioksidan aktiveleri hızlı bir şekilde belirlenmiştir. Klasik yöntemlerden birçok açıdan avantajlı olan bu yeni ölçüm yöntemi yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacaktır. Bu çalışma, bitki ekstraktlarının antioksidan aktivelerinin kolay ve ekonomik ve hızlı bir şekilde tespit edileceğini göstermesi açısından oldukça önemlidir.

Geliştirdiğimiz potansiyometrik biyosensörlerin çalışma şartlarını ve davranışlarını belirleyen iyonoforların yapısı literatürdeki mevcut çalışmalardan farklıdır. Ayrıca biyosensörlerin gövde yapısı ticari olarak geliştirilmiş elektrot hazırlanma yöntemi ve yapısından tamamen farklıdır. Bizim geliştirdiğimiz biyosensörler prop kullanılmadan mikro ölçekte ve kompozit yapıda olacak şekilde hazırlandı. Minyatürize edilebildiğinden strip şeklinde de sensörlerin hazırlanabilmesine imkân sağlamaktadır. Hazırlanışı oldukça pratik, kolay ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Maliyeti çok düşüktür ve gerektiğinde tek sefer kullanılabilir da olabilecektir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Antioksidanlar

Vücudumuz, hayatta kaldığımız sürece devamlı oksijene ihtiyaç duyar. Oksijen molekülleri yaşam için elzem bir ihtiyaç olmakla birlikte, vücudumuzda gerçekleşen metabolizma reaksiyonları sırasında oldukça kararsız olarak bilinen serbest radikaller ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Bu radikaller hemen her şeyle reaksiyona girer ve oldukça kararsız bir yapısı vardır. Genel bir ifade ile serbest radikaller bu metabolizma reaksiyonları sonucu dış orbitalinde çift elektron yerine tek elektron bulundan atomlara veya moleküllere verilen genel isim olarak bilinir. Bu serbest radikaller Reaktif Oksijen Türleri (ROS), Reaktif Azot Türleri (RAT) ve Reaktif Kükürt Türleri (RKT) olarak adlandırılır. Bu radikaller biyolojik sistemlerde lipit, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verirler. Serbest radikaller çok hızlı ve etkin moleküllerdir. Bu radikallerin zararlı olmaların sebebi kararsız yapıda oldukları için vücut içinde organizmadaki kararlı moleküllerin yapılarını bozmaları ve bu molekülleri işlevsel olarak çalışmaz yapımları veya yanlış işlev yapmasına sebep olmalarıdır (şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Serbest radikalın hücreye vermiş olduğu zarar (Simone, 1992)

İnsan vücudu ise bu radikalleri söndürmek ve yok etmek için birçok mekanizma ve enzim geliştirmiştir. Aynı zamanda enzim olmayan ve dışardan aldığımız birçok destekleyici gıdalar da bu radikalleri yok eder ve söndürür. Hem vücut tarafından üretilen hem de dışardan aldığımız bu maddeler serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmadaki savunmasına antioksidan savunma sistemleri diyoruz. Bu tür maddeleri ise antioksidan olarak adlandırılmaktadır. Gıdalarda renk koku, tat,

bozulmasını geciktirmek veya engellemek amacıyla gıdalara katkı maddesi olarak çoğunlukla sentetik antioksidanlar (Butillenmiş hidrosiyanisol (BHA), Butillenmiş hidroksitoluen (BHT), tert-butilhidrokinon (TBHQ) ve 6 propil gallat (PG)) eklenmektedir. Ancak bu katkı maddelerin yan etkililerinden dolayı yasaklanmış durumdadır. (Çizelge 2.1) (Halliwell, 2008). Bazı durumlarda bu antioksidan maddeler savunma sisteminde yetersiz kalabilir ve sonuçta serbest radikaller oluşur ve oksidatif gerilim olarak adlandırılan durum ortaya çıkar. Bu durum organizmadaki antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır ve biyolojik moleküllerde hasara yol açarak birçok hastalıklara neden olmaktadır (Kim ve ark., 2002). Örneğin lipit, protein ve nükleik asitlerle oksidatif reaksiyonlar sonucunda, vücutta bulunan bileşiklere zarar vermekte ve birçok biyolojik sorunlara neden olmaktadır. Bu zarar sonucunda eğer onarım olmazsa zamanla biyolojik ve ateroskleroz, diyabet, kanser gibi birçok hastalık ortaya çıkar (Benavente-Garcia ve ark., 2000). Oluşan bu hasar sonucunda yaşlanmayla birlikte kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve bağışıklık sisteminin işlevsel bozuklukları da olmaktadır (Stutts and Wightman 1983). Vücut bu radikallerle yaşamımız boyunca savaşmaktadır. Bazen de vücudumuzun ürettiği bu antioksidanlar yetersiz kalmaktadır.

Çizelge 2. 1 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.

Enzimatik Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
	Doğal Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz (SOD)	C Vitamini	Butillenmiş hidroksianisol (BHA)
Glutasyon peroksidaz (GPx)	E Vitamini	Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutasyon-S-transferaz (GST)	Karotenoidler	Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)
Katalaz	Polifenolik bileşikler	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Glutasyon redüktaz (GR)	Melatonin Selenyum Ürik asit vs.	Alkil gallat türevleri

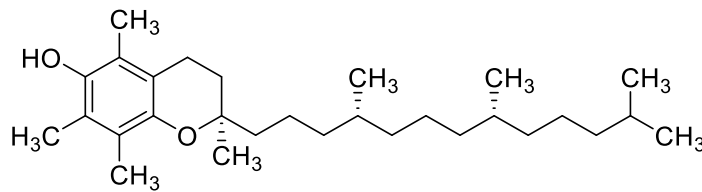
Günümüzde yapılan araştırmalarda hemen her hastalığın temelinde bir dereceye kadar oksidatif strese bağlı olduğu kanaatine varılmaktadır. Bilim insanları bir yandan bu hastalıkların tedavisinde yeni çare araştırırken diğer taraftan da sağlıklı bir yaşam sürdürme ve hastalıkları önleme alanında çok yoğun bir şekilde araştırmalar yapmaktadır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda serbest radikal oluşumunun önlenmesi,

antioksidan kapasitesi düzeyinin belirlenmesi, radikal sonucu oluşan hastalıkların azaltılması için birçok diyet ve ilaç kullanımının oldukça önemli yer tuttuğu anlaşılmaktadır. Buna ek olarak vücudumuza dışardan aldığımız antioksidanların çoğu meyveler ve sebzeler olmakla beraber tahıllar, nane türleri, kekik türleri, baklagiller, şifalı bitkiler ve bitki kaynaklı içeceklerde bolca bulunmaktadır.

Bitki kaynaklarında bulunan antioksidanlar; insan için son derece önemli moleküller olan vitaminler (A, B9, C ve E) , flavonoidler, flavonlar, fenolik asitler, tanenler gibi fenolik bileşikler, alkaloid, protein, amin gibi azotlu bileşikler, polifonksiyonlu polifenol organik asitler ve karotenler içermektedir. Fenolik bileşikler ile A, C, E vitamini meyve ve sebzelerde bol bulunan doğal antioksidanlardır. Bu antioksidan özelliğe sahip bileşikler insan sağlığı açısından destekleyici olmaktadır. Bu yapıları kısaca tanıyacak olursak:

2.1.1 E vitamini

E vitaminin kimyasal adı tokoferol ve kimyasal yapısı tokol olup 1922'de, Evans ve Bishop tarafından bulundu (Şekil 2.2). E vitaminin iki tip çalışma fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi redoksa bağımlı olarak proteine bağlı bir kofaktör olmasıdır. Bu amaçla lipidlerin oksidasyonunun etkilerinin azaltılması veya yayılması önlenmektedir. E vitamini lipoproteinlerde önemli antioksidan görevi görür. Bu yüzden önemli bir antioksidandır. E vitaminin (α , β , δ tokoferol) olarak birçok formu bulunur ve en çok alfa tokoferol formu incelenir. Yapılan araştırmalar, E vitamininin birçok hastalığın yansıra ek olarak kardiyovasküler hastalıkları ve bazı kanserleri azalttığı belirlenmiştir (Altınar ve ark., 2017).

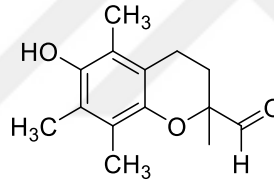


Şekil 2. 2 E vitamini kimyasal yapısı

Tokollerin (tokoferol ve tokotrienol) farklı bileşikleri de E vitamini aktivitesi gösterir. En aktifi alfa-tokoferoldür. Geçmişte asıl olarak α -tokoferol üzerinde yoğunlaşmışken, bugün öteki tokoferoller ve tokotrienoller daha fazla ilgi çekmektedir. İlk sonuçlara göre bunlar, α -tokoferolden farklı antioksidan ve diğer fonksiyonlara sahiptir.

2.1.2 Troloks

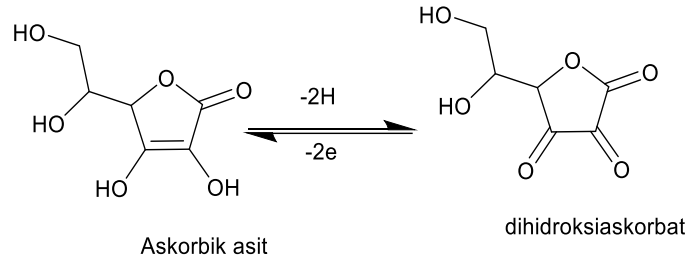
Kimyasal adı 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit olan ve E vitaminin suda çözünen formudur (Şekil 2.3). E vitamini gibi bir antioksidandır ve hemen hemen tüm klasik yöntem antioksidan testlerinde kullanılır. Özellikle demir (III) indirgeme gücü testi olan FRAP testinde standart olarak kullanılır. Çünkü tıpkı E vitamini gibi oksidatif stresi azaltmada önemli derece de etkilidir.



Şekil 2. 3 Troloks kimyasal yapısı

2.1.3 C vitamini

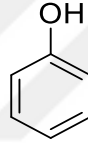
İnsanlar için son derece gerekli bir vitamin olan C-vitamininin kimyasal adı askorbik asittir. İnsan vücudu bu vitamini sentezlemediği için dışarıdan alınmak zorundadır. Bu C vitaminini insanlar en çok meyve ve sebzelerden alır ve suda çözünebilen bir moleküldür. C vitamini aynı zamanda serbest radikalleri doğrudan söndürebilen son derece güçlü bir antioksidandır. Çok iyi bir radikal söndürücü olduğu için hemen hemen tüm antioksidan testlerinde standart olarak kullanılır. Bunun yansıra çeşitli besin maddelerinde C vitamini acılaşma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. Doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenmektedir (Şekil 2.4) (Hudson, 1990).



Şekil 2. 4 Askorbik asidin yapısı ve radikal reaksiyonu sonucu oluşan yapı

2.1.4 Polifenolik bileşikler

Fenol, benzen halkasına OH⁻ molekülünün bağlanmasıyla oluşan kimyasal bir bileşiktir (Şekil 2.5). Fenoller, aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun bağlanmasıyla oluşan aromatik bileşiklerdir.

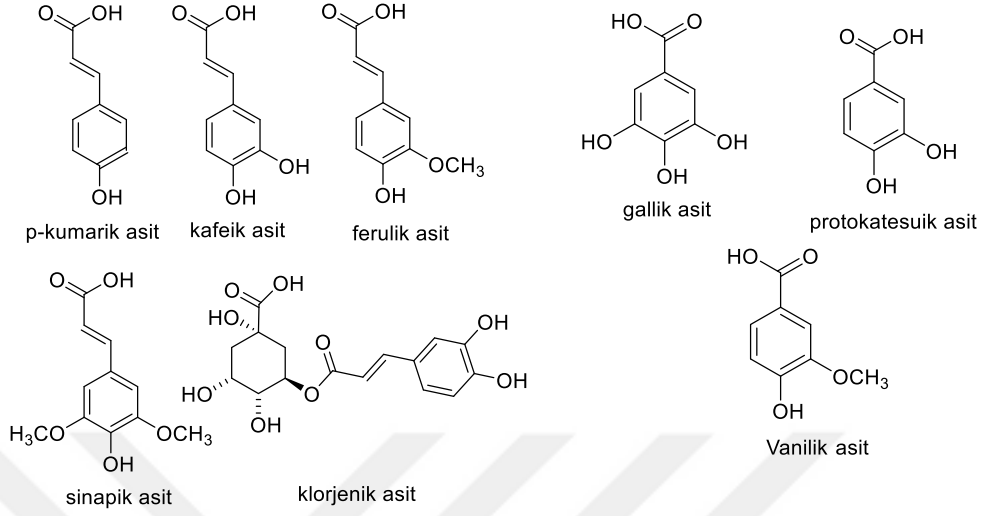


Şekil 2. 5 Fenol yapısı

Polifenoller ise her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşiklerdir (Şekil 2.6). Polifenoller bitki dünyasının büyük bir kısmında bolca bulunan ve fitokimyasalların en yaygın bulunan bileşiklerdir. Polifenoller doğal antioksidanların önemli grubunu oluşturduğu için insanlar için en gerekli moleküllerdendirler. Polifenoller genelde bitkilerden elde edilir ve bitkilerin renklenmelerinden, örneğin sonbahardaki yaprak renklerinden sorumludurlar. Aynı zamanda bitkiler tarafından sentezlenen sekonder metabolitler olarak üretilip bitkilerin çeşitli çevre şartlarına adaptasyon sağlama ve kendilerini savunmak için kullandığı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin Alzheimer hastalığının başlangıcını da geciktirdiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2002). En yaygın bitkisel fenolik antioksidanlar başta flavonoidler olmak üzere fenolik asitler ve tanenlerdir. Aynı zaman da doğal olarak bulunan fenolik asitler iskelet yapılarına göre hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinammik asit türevleri olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir.

HIDROKSISINNAMİK ASİTLER

HIDROKSIBENZOİK ASİTLER

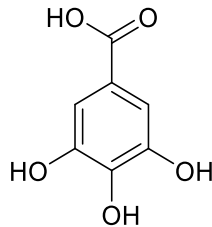


Şekil 2. 6 Fenolik asit türevleri

Besinler tıpkı vitaminler gibi fenolik asit türevlerini bol miktarda içermektedir. Özellikle gallik asit bitkilerden izole edilip elde edildiğinde diğer türevlerinden daha aktif bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden çoğu klasik antioksidan aktivite testinde standart olarak kullanılır.

2.1.5 Gallik asit

Kimyasal adıyla 3,4,5-trihidroksibenzoik asit olarak isimlendirilen gallik asit bir fenolik asit sınıfında yer alır ve özellikle çay, meşe kabuğu gibi birçok bitkide bulunan gallik asit çok güçlü bir antioksidandır (Şekil 2.7).



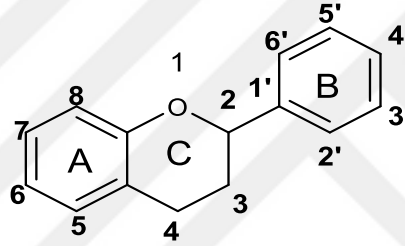
Şekil 2. 7 Gallik asit

Gallik asit aynı zamanda sentezlenebilmektedir ve halkadaki hidroksil grubunun farklı konumları ile karakterize edilebilir. Bu tip fenolik bileşikler çok güçlü

antioksidanlardır ve bu aktiviteyi hidroksil grubu üzerinden yaparlar. Hidroksil grupları bir indirgeme aracıdır ve bazıları metal iyonu şelatlama ve ROS türlerini süpürücü olarak davranırlar (Makris ve Rossiter, 2002).

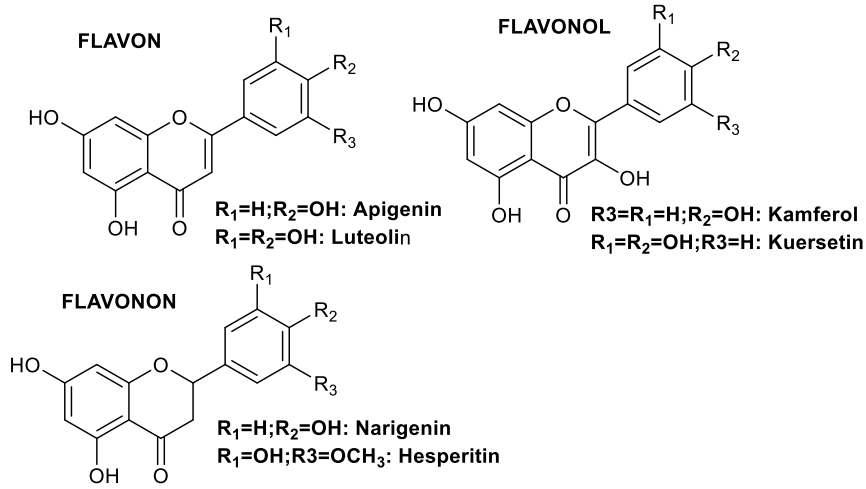
2.1.6 Flavonoidler

Fenolik asit türevi olan flavonoidler. A, B ve C benzen halkasına sahip düşük molekül ağılıklarına sahiptirler. Bu halkalardan A ve B, 6 karbonlu iki aromatik halka ve C halkası ise 3 karbonlu pıran halkasından oluşur ve bu halkalara farklı gruplar bağlanmasıyla flavonoid çeşitleri ortaya çıkmaktadır. (Şekil 2.8)



Şekil 2. 8 Flavonoidlerin genel yapısı (Heim ve diğ., 2002).

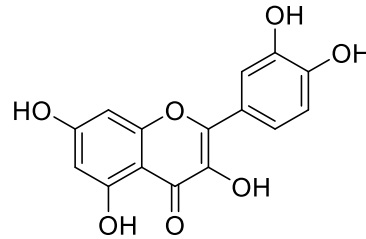
Flavonoidler kendi arasında antoksantrinler (flavonoller, flavanoller, flavonlar, izoflavonlar ve flavanonlar) ve antosiyaninler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9 Flavonoid türleri

Şekil 2.9'dan görüleceği gibi flavon türleri yapılarına bağlanan gruplar ile farklı yapılar elde edilmektedir. Flavon bileşiğinin 3 nolu karbonunun pi bağında olması ve hidroksil grubu içermemesi ile oluşan yapıdır. Bu flavonların en önemli bileşikleri apigenin ve luteolindir.

Flavonoller ya da 3-hidroksiflavon, flavon bileşiğinin 3. karbon atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar (Şekil 2.10). Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. Kuersetin flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir.



Şekil 2. 10 Kuersetin molekülünün kimyasal yapısı

Flavonon ise 3 nolu karbonun hem pi bağı hem de hidroksil grubu içermeyen yapısıdır. En önemli molekülleri hesperitin ve narigenindir.

2.2 Antioksidan Aktivite

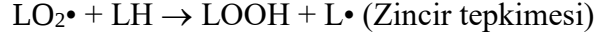
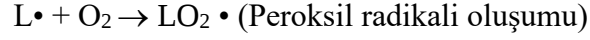
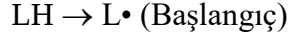
Bitkiler, insanlar ve diğer canlı türleri serbest radikallerin oluşturmuş olduğu yan etkilerden korunmak için antioksidanlara sahiptirler. Bu antioksidanlar hem insan vücudunda bulunmaları hem de bitkilerde çok düşük miktarlarda bile olması serbest radikallerin ve ROS gibi reaktif türlerin oluşturduğu olumsuz etkilerini büyük ölçüde engelleyen maddelerdir (Altınar ve ark., 2017). Vücudumuz oksidatif stres veya metabolik reaksiyon sonucu oluşan radikaller için vücudun kendi oluşturduğu enzimatik antioksidan savunmalar yeterli değildir. Bu yüzden dışardan almamız gereken antioksidanlar için bitkisel gıdalara ihtiyacımız vardır. Antioksidanlar, tanım olarak okside olabilen veya olmuş bileşikler düşük hacimlerde bile söndüren maddelerdir. Günümüzde bu tanım gelişti, reaktif türlerini doğrudan süpürebilen ve bağışıklık sistemini güçlendiren maddeler olarak adlandırılmıştır (Carocho ve Ferreira, 2013).

Antioksidanlar radikallere karşı oksidasyonu önlemede temel olarak hidrojen atom transferi (HAT) ve tek elektron transferi (SET) tepkimelerinden oluşmaktadır. Çizelge 2.2’de HAT ve SET üzerine geliştirilmiş antioksidan aktivite tayin metotları görülmektedir.

Çizelge 2. 2 Antioksidan Aktivite Tayin Metotları

Hidrojen Atomu Transferi HAT	
Oksijen Radikalini Absorblama Kapasitesi	(ORAC)
Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre	(TRAP)
Elektron Transferi Temelli Metotlar SET	
Cu(II) İyonu İndirgeme Testi	CUPRAC
Fe(III) İyonu İndirgeme Gücü	FRAP
DPPH Radikali Giderme Aktivitesi	DPPH
Toplam Fenolik Bileşik Tayini	FCR

Her iki antioksidan belirleme reaksiyonlarında indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonu da gerçekleşmektedir. Birincisi H-atomu transferidir. Bu reaksiyonlarında doymamış yağ asitlerinin oluşturduğu radikallerdir.



Doymamış yağ asitlerinde lipid peroksidasyonu, alkil radikalinin ($\text{L}^\bullet$) oluşumuyla başlayan bir radikal zincir reaksiyonudur. Başlangıç reaksiyonundan sonra alkil radikalinin ($\text{L}^\bullet$) oksijenle (O_2) reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini ($\text{LOO}^\bullet$) oluşturur. Ortamda herhangi bir antioksidanların olmadığı durumlarda lipid peroksil radikali ($\text{LOO}^\bullet$) yükseltgenmemiş lipid (LH)'a hidrojen atomu aktararak alkil radikallerini ($\text{L}^\bullet$) oluşturur. Bu LOOH radikaller Demir, Bakır gibi vs. geçiş metallerin varlığında kararsız ikincil oksidasyon ürünlerini meydana getirir. Bu kararsız reaksiyonları durdurmak için antioksidanlar devreye girer ve fenolik antioksidanlar (PhOH) peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek bu tepkimeyi durdururlar.

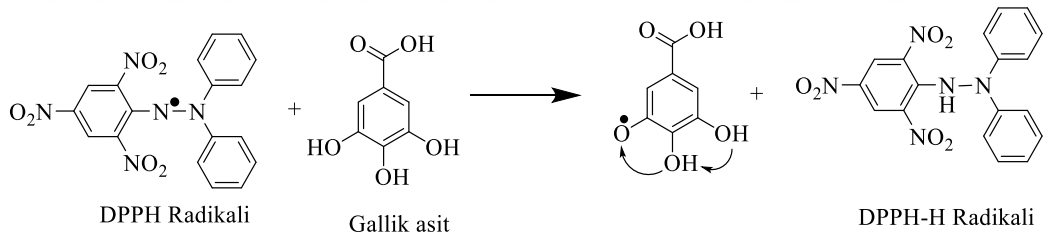


Bu reaksiyon fenolik bileşiklerin hidroksil grubunun O-H bağı daha zayıf olduğu için reaksiyon bu konumdan ve çok hızlı gerçekleşmektedir (Laguerre ve ark., 2007). Bitkilerdeki antioksidan maddeler geçiş metallerinden Fe(III) 'ü Fe(II) 'ye, Cu(II) 'yi Cu(I) 'e indirgeyerek serbest radikal oluşumunu engelleyebilirler. Yapılan çalışmalarda, bitkilerin içerisindeki fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite gösterdikleri ve geçiş metal iyonu varlığında oksidan etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Childs ve ark., 2001). Literatürde bu bileşiklerin varlığını tespit etmek için birçok klasik yöntem geliştirilmiştir.

2.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

2.3.1 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderme yöntemi

Bu yöntem, antioksidan aktivite belirlenmesinde kullanılan en eski metottur. İlk olarak 1950'lerde doğal materyallerdeki H vericilerini incelemek için kullanılmıştır. Daha sonraları gıdaların ve fenoliklerin antioksidan potansiyellerini belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır (Ali ve ark., 2008) DPPH testi; 2,2-difenil-1-pikrikhidrazil serbest radikale karşı antioksidanların radikal giderme özelliğinin ölçümünü temel alır. DPPH radikal giderme testi doğal bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesini ölçmede en fazla kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun birinci sebebi ucuz maliyetli ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Ancak 517 nm de girişim yapan maddeleri de ölçmesi nedeniyle dezavantajı bulunmaktadır. Bu yöntem, antioksidan bileşiklerin mor renkli bir bileşik olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrikhidrazil) radikalini (517 nm) indirgemesi sonucu oluşan renksiz ürünün ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 2.11) (Catalin Mot ve ark. 2011).

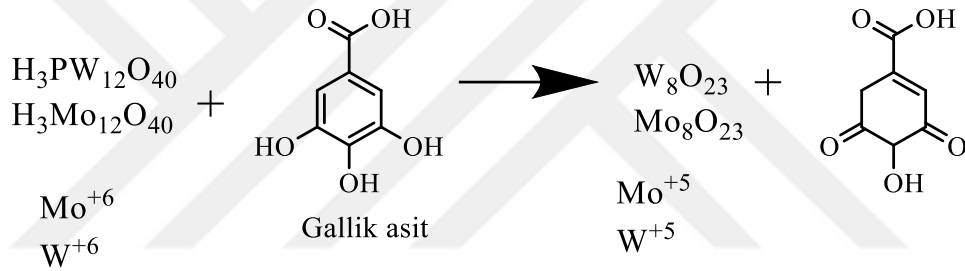


Şekil 2. 11 DPPH radikali ve bir antioksidan ile reaksiyonu

Bu tez çalışmamızda klasik yöntemde en çok kullanılan DPPH• süpürme testi için hızlı ve daha düşük hacimlerde ölçüm yapabilen potansiyometrik temelli PVC membran elektrot geliştirdik. Klasik yöntemlerde oluşan dezavantajlardan birisi olan 517 nm de girişim yaparak absorban veren maddelerin bizim geliştirdiğimiz metotta girişim yapmaması büyük bir avantaj sağlamaktadır.

2.3.2 Toplam fenolik bileşik tayin yöntemi (FCR)

Literatürdeki toplam fenolik testi, Singleton ve arkadaşları tarafından bitki ekstraktlarındaki toplam fenolik miktarlarını ölçmek için geliştirilmiştir (Lussignoli ve ark., 1999). Bu yöntemde bitkideki fenolik bileşiklerin *Folin-Ciocalteu* (fosfotungstik asit, fosfomolibdik asit) reaktifi (FCR) içerisindeki Tungsten ve Molibdenyum'a elektron transfer edilmesi temeline dayanmaktadır. Yani fenolik bileşiklerin bazik ortamda *Folin-Ciocalteu* ayracını indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. FCR reaktifi ticari olarak satılmaktadır. Oluşan *fenolik-Folin-Ciocalteu* kompleksi mavi renkte olup 760 nm deki absorbans ölçülerek spektrofotometrik olarak belirlenir (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12 Fenolik- Folin-Ciocalteu kompleksi ve reaksiyonu

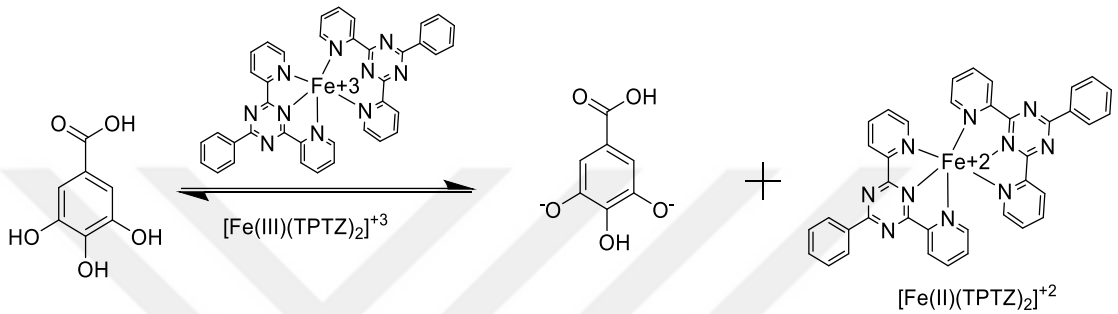
Toplam fenolik test sonuçları standart bileşik olan Gallik asit eşiti olarak verilir. FCR testi basit, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Ancak uzun süre gerektirmesi ve sadece bazik ortamda reaksiyon vermesi yöntemin dezavantajlarıdır (Prior ve ark., 2005; Magalhães ve ark., 2008)

Bizim çalışmamızda FCR toplam fenolik testinin temelinde gerçekleşen indirgenme, yükseltgenme reaksiyonuna bağlı olarak yeni bir potansiyometrik elektrot geliştirdik.

2.3.3 Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan aktivitesi (FRAP)

İngilizce Ferric Reduction Assay Power Yöntemi olan FRAP testi ilk kez Benzei ve Strain tarafından geliştirilmiştir (Benzie ve Devaki, 2018). Bu yöntemin temeli demir

(III)'ün, demir (II) ye indirgemesi temeline dayanır. İndirgenme yoluyla antioksidanlarının toplam miktar tayini yapılmaktadır. Burada kalorimetrik olarak tayin edebilmesi için demir(III) ün tripiridiltiazin (TPTZ) kompleksi kullanılır (Şekil 2.13). Sarı renkteki $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]$ kompleksi indirgeme sonucu, mavi renkte Fe(II) -tripiridiltiazin kompleksine dönüşmektedir. Oluşan mavi renkteki $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]$ kompleksinin 593 nm'de maksimum absorbansı ölçülmektedir (Ou ve ark., 2002).



Şekil 2. 13. $[\text{Fe(III)}(\text{TPTZ})_2]$ kompleksinin antioksidan ile reaksiyonu

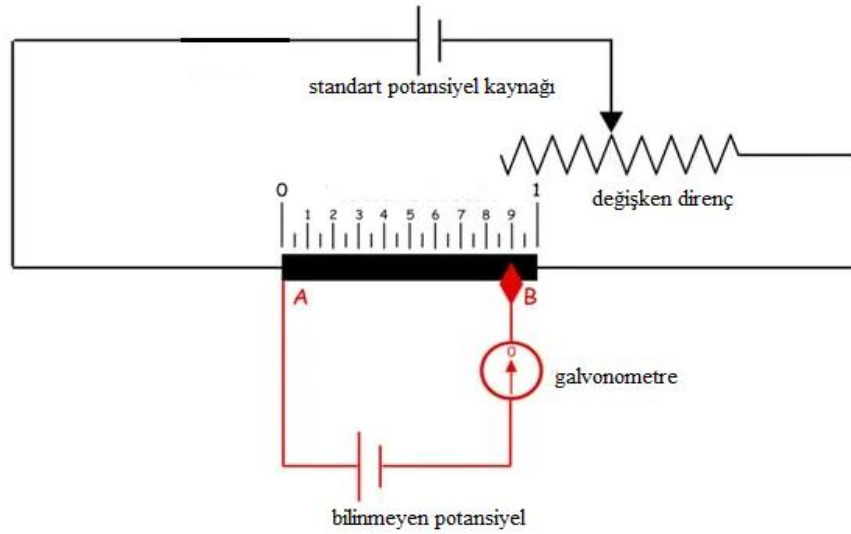
FRAP testinde sonuçlar troloks eşdeğeri olarak verilir. Reaksiyonun maksimum verimde gerçekleşmesi için ortalama 30 dakika beklenir (Okan ve ark., 2013). Yöntemde sadece demir indirgendiği için birçok antioksidan aktivite testleri için uygulanamamaktadır (OKAN ve ark., 2013). Ayrıca, yöntem sadece demir iyonunu temel aldığı için mekanik ve fizyolojik antioksidan aktiviteleri için uygun değildir. Ancak, diğer yöntemlere oranla daha basit, hızlı ve ucuzdur (Prior ve ark., 2005).

FRAP testinde de diğer iki metot gibi bir redoks reaksiyonu meydana gelmektedir. Fe(III) iyonunun Fe(II) ye indirgemesi sonucu bir potansiyel fark oluşmaktadır. Bu indirgeme-yükseltgenme reaksiyonunun özelliğinden yararlanarak bu çalışmamızda FRAP testi için yeni bir potansiyometrik elektrot geliştirdik.

2.4 Potansiyometri

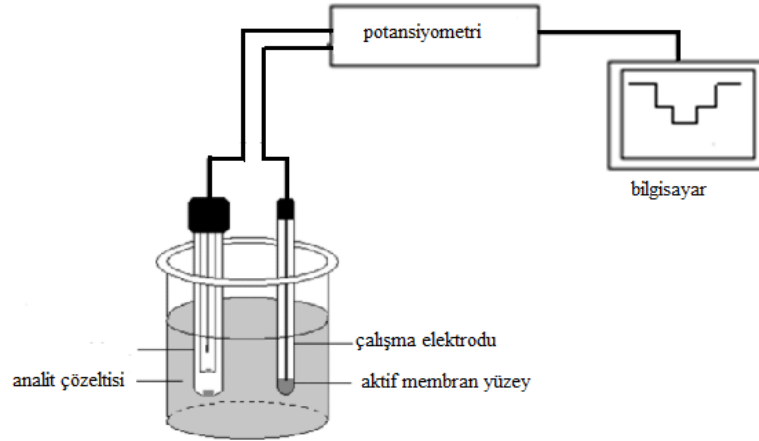
Potansiyometrik sensörlerin temeli 1900'lü yıllara kadar dayanmaktadır. Cremer tarafından bulunmuş ve günümüz teknolojisi ile gelişen çevre, endüstri, tarım, tıp, rutin laboratuvar analizleri, tekstil, tıbbi ilaç analizi ve çeşitli inorganik ve organik iyonların tayininde ve birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Potansiyometri en önemli

elektrokimyasal tekniklerden birisidir (Cremer, 1906). Potansiyometrik sensörlerin çalışma prensibi, bir çalışma elektrotu ve referans elektrot kullanılarak oluşturulan hücrede oluşan potansiyel farkın ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Ölçülen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimi ile orantılıdır (Atan, 2013). Potansiyometri en önemli elektrokimyasal analiz yöntemlerinden biridir ve araştırmacılar tarafından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir elektriksel devreden oluşan ve yapısındaki değişken direnç ayarlanarak, belirli bir gösterge çizelgesi ile standart potansiyelin bilinen kısmı bilinmeyen potansiyele karşı işaretlenir. Burada gösterge çizelgesi üzerindeki iki potansiyel eşit olduğu değerde, galvanometreden herhangi bir akım değeri geçmez. Bunun sonucunda ise bilinmeyen potansiyel, değişken direncin pozisyonundan okunur (Topcu ve ark., 2011). Potansiyometre cihazının çalışma prensibi şekil 2.14’de gösterilmiştir.



Şekil 2. 14 Potansiyometrenin çalışma prensibi

Potansiyometri ölçüm sisteminde bulunan iki elektrottan birisi referans elektrot (herhangi bir potansiyel değişimden etkilenmeyen) diğeri ise çalışma (indikatör) elektrotu (potansiyeli çözelti bileşim değişimlerine göre değişen) olmak üzere elektrot sisteminin potansiyelinin zamana karşı ölçüldüğü bir yöntemdir (Isildak ve Özbek, 2020). Potansiyometrik ölçüm sistemi Şekil 2.15’de gösterilmiştir. Analit çözeltisinde iyonların derişimine bağlı olarak bir potansiyel oluşur. Ölçülen bu potansiyele bağlı olarak analitin aktivitesi ölçülür (Isildak ve Özbek, 2020).



Şekil 2. 15 Potansiyometrik sistem (Isildak ve ark., 2022)

Potansiyometrik yöntemler, diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir. Kısa cevap zamanı, geniş doğrusal çalışma aralığı, düşük enerji tüketimi, düşük maliyeti, hazırlık kolaylığı, bunlardan sadece birkaç tanesidir (Isildak ve Özbek, 2020; Isildak ve ark., 2022). Potansiyometride elektrostatik potansiyel (EMF), standart referans elektrot yarı hücresiyle membran elektrot yarı hücresi birleştirilerek ölçülür. Buradaki EMF değeri basit iyonlar veya test edilen iyonun yüklü ya da nötral kompleksleri, membranın iç kısımlarına doğru iç standart çözeltinin kompozisyonuyla orantılı olarak taşınırlar. Böylece bir EMF değeri oluşur. Bu EMF genel olarak eşitlik 2.1'deki gibi formüle edilir.

$$E_{\text{hücre}} = E_{\text{indikatör elektrot(İSE)}} + E_{\text{Referans Elektrot}} + E_{\text{Sıvı Bağlantı Potansiyeli}} \quad (2.1)$$

Bu formülden ölçülen hücre potansiyeli ile indikatör elektrotun potansiyeli veya derişim ile elektrot potansiyeli arasındaki ilişki;



Denklemindeki gibidir. Bu denklemden matematiksel olarak elde edilen Nernst Eşitliği 2.2' deki gibi olur.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (2.2)$$

Bu eşitlikte;

E = İndikatör elektrot potansiyeli

E° = Standart elektrot potansiyeli

R = Gaz sabiti, $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = Sıcaklık, kelvin (0°C için $273,15 \text{ K}$)

F = Faraday sabiti = ($96486 \text{ J volt}^{-1}$)

$[A]$, $[B]$, $[C]$ ve $[D]$ = Elektrotta algılanan iyon aktiviteleri

a , b , c ve d = yarı reaksiyonda yer alan her bir türün mol sayısı

n = elektron sayısı transferi veya membrandaki aktif iyon yüküdür.

Eğer ölçümler standart koşullarında 25°C 'de yapılırsa, sabit sayılar eşitlik 2.3'da yerine yazıldığında Nernst Eşitliği aşağıdaki gibi olur.

$$E = E^\circ \pm \frac{0592}{n} \log \frac{a_2}{a_1} \quad (2.3)$$

Buna göre 25°C 'de E – $\log(a)$ ilişkisinin her on katlık aktivite farkındaki teorik potansiyel değişimi, a_1 ve a_2 ise iyonların aktivite derişimi olur. Ölçülen potansiyel n yüklü iyonlar için $59,2 \text{ n/mV}$ 'tur. Nernst eşitliğine göre on katlık aktivite teorik potansiyel değişimi tek yüklü iyonlar için $59,2$, iki yüklü iyonlar $29,6$ ve üç yüklü iyonlar için ise $19,8 \text{ mV}$ olarak hesaplanmaktadır (Skoog ve Leary, 1996).

İyon–seçici elektrot kullanılarak oluşturulan bir ölçüm hücresi şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir:

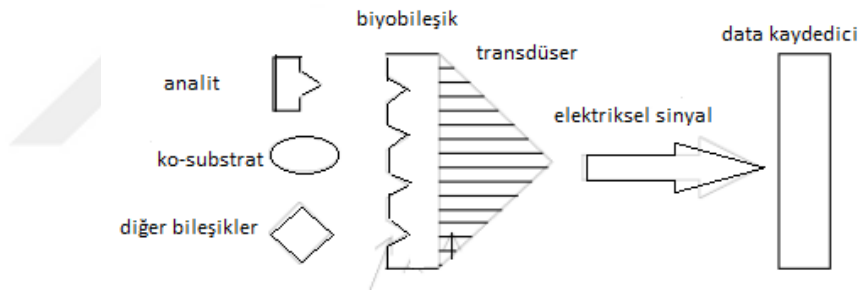
İletken tel / Katı–hal kontakt / iyon–seçici membran / Test çözeltisi // Dış referans elektrot

Potansiyometrideki hesaplamalar yukarıdaki formüllere göre yapılırken kullanılan cihazlar, genelde basit ve ucuz cihazlardır ve genel olarak üç kısma ayrılır.

1) Potansiyel ölçme cihazı, 2) Referans elektrot, 3) İndikatör elektrot,

2.5 Biyosensörler

Sensör İngilizce “sense”, yani algılama kelimesinden türetilmiş algılayıcı anlamında kullanılan bir kelimedendir. Bir fiziksel kimyasal değişimi algılayıp ona karşılık veren yani herhangi bir ortamda bir değişme algılayıp cevap veren cihazlardır. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) göre biyosensör, bir transdüser elemanı ile doğrudan bir biyolojik tanıma elemanı kullanarak spesifik nicel veya yarı nicel analitik bilgi sağlayabilen bağımsız entegre bir cihaz olarak tanımlanır. İlk kez 1962 Clark ve Lyons tarafından temeli atılan biyosensörler teknoloji ile birlikte çevresel örnekler, gıda endüstrisi, eczacılık, biyoteknoloji biyomedikal uygulamalar gibi alanlarda araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde araştırılmış ve çok farklı yapılarda yeni biyosensörler tanımlanmıştır. Şekil 2.16’da şematik olarak bir biyosensör gösterilmiştir.



Şekil 2. 16 Şematik biyosensör Sistemi

Bir biyosensör genel olarak üç parçadan oluşur analizi edilecek ortam, analiz yapan biyosensör ve veri kaydediciden oluşur. Bu elemanları kısaca tanımlarsak

Analit: Analiz edilecek bileşenlerdir.

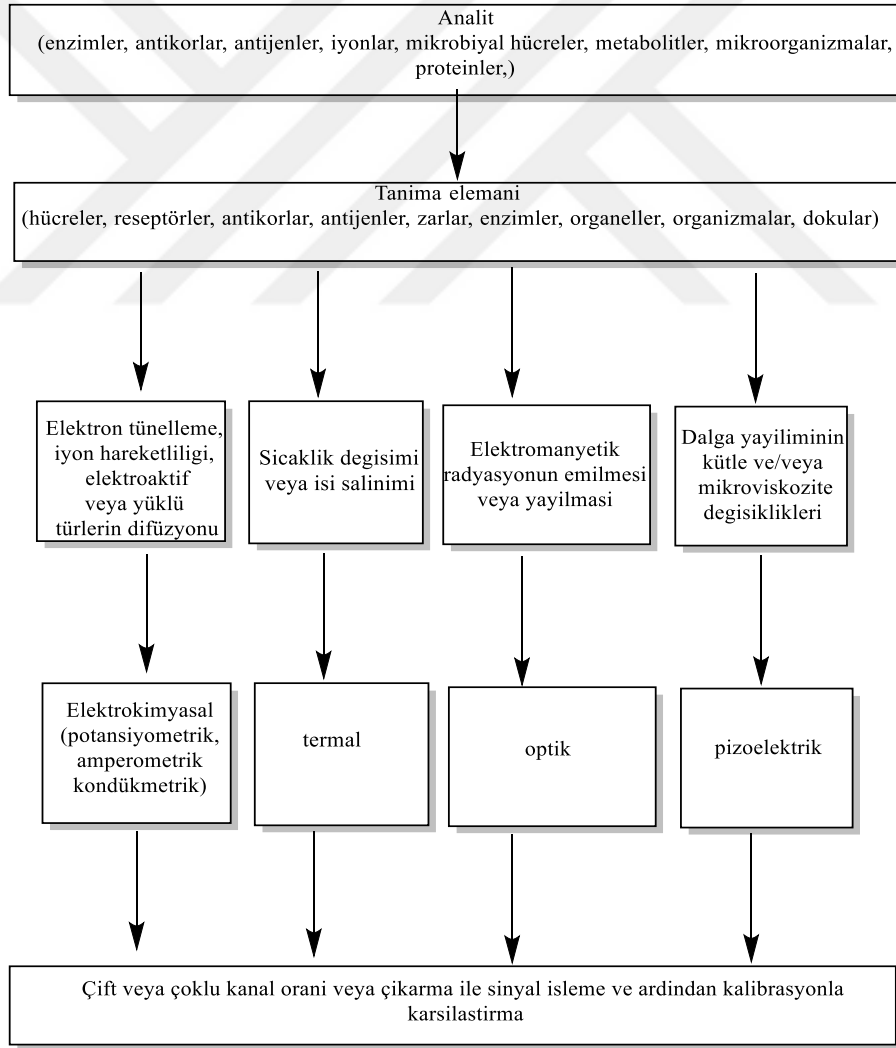
Biyoreseptör (biyobileşik): Analiz edilecek madde yani analit ile seçici olarak etkileşime giren biyolojik bileşiklerdir. Burada biyoreseptörler enzim mikroorganizmalar gibi biyolojik etmenlerde olabilir.

Dönüştürücü (Transduser): Fiziksel veya kimyasal sinyali elektriksel sinyale dönüştüren parçadır ve dönüştürücü (transduser) olarak adlandırılır.

Görüntüleyici: dönüştürücüden gelen sinyali bilgisayar ortamında gösteren cihazlardır.

2.5.1 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler, hedef analitler ile etkileşiminden ölçülebilir sinyal elde etmek ve uygun dönüştürücüleri saptamak için oldukça spesifik tanıma olaylarına dayanmaktadır. Şekil 2.17’de bir biyosensör sisteminde analiz edilmesi mümkün olan bazı analitler görülmektedir. İlgilenilen her numuneye ve ölçülecek fiziksel büyüklük türüne bağlı olarak biyolojik materyal ve dönüştürücünün çeşitli kombinasyonlarının olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle, biyosensörlerin sınıflandırılması farklı şekillerde yapılabilmektedir. Biyolojik tanıma elemanlarına veya dönüştürücülerine veya alternatif olarak bu iki yönün kombinasyonuna göre sınıflandırılabilir.



Şekil 2. 17 Bir biyosensör sisteminde biyobileşen ve dönüştürücüler (Mello ve Kubota, 2002)

Biyolojik elementler, bir biyosensör sistemindeki başlıca seçici elementleri oluşturur. Biyolojik tanıma elemanının türü, biyosensörün seçicilik veya özgünlük derecesini belirler. Biyosensör sistemindeki biyolojik tanıyıcılar, enzimler, dokular, antikorlar mikroorganizmalar olabilir (Van der Voort ve ark., 2005). Bir biyosensör sistemindeki bir dönüştürücü, biyolojik sinyali elektrik sinyaline dönüştürür. Dönüştürücü eleman birkaç gruba ayrılabilir. Başlıca gruplar elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, dalga ve termaldir (Gooding, 2006).

Elektrokimyasal biyosensörler

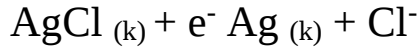
Diğer biyosensörlerin içinde en eski ve en çok kullanılan elektrokimyasal sensörler ilk zamanlarda özellikle glikoz analizi için geliştirilen enzim elektrotları şeklindeydi. İlk elektrokimyasal biyosensör Clark ve Lyson tarafından 1962 yılında glukoz molekülünün tayinine yönelik geliştirilmiştir (Clark Jr ve Lyons, 1962). Bu teknik analit konsantrasyonunu belirlemek için potansiyel akım veya yük ölçümü temeline dayanmaktadır. Genel olarak iki temel parçası bulunur. Bunlardan birincisi bir kimyasal (moleküler) tanıma sistemi ve diğeri ise kimyasal yanıtı modern elektrikli aletlerle tespit edilebilen bir sinyale dönüştüren transdüserlerdir (Tüylek, 2021). İkinci eleman transdüser elektrokimyasal biyosensörün daha belirleyici kısmını oluşturur. Elde edilen sinyalin elektrik sinyaline çevrilmesine bağlı olarak potansiyometri, amperometri, voltametri veya kondüktometri gibi yöntemler açığa çıkmıştır.

Referans elektrotlar

Potansiyometrik ölçümlerde potansiyel değişimi sabit olan yani ortam değişikliklerinden etkilenmeyen bu elektrotlara “referans” elektrotlar denir. Diğer bir deyişle referans elektrotların potansiyeli, analit çözeltisinden bağımsızdır. Yani incelenen çözeltide bulunan analitin veya diğer iyonların konsantrasyonundan etkilenmez. İdeal bir referans elektrotun potansiyel değeri tam olarak bilinmeli ve analit çözeltisinin bileşiminden etkilenmemelidir. (Skoog ve Leary, 1996). Potansiyometrik ölçümlerde yaygın olarak kullanılan referans elektrotlar Gümüş/Gümüş Klorür ve Kalomel elektrottur.

Gümüş/gümüş klorür referans elektrot

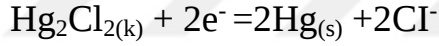
Referans elektrotlar içerisindeki en yaygın kullanılan bu elektrot bir gümüş veya platin tel yüzeyine gümüş klorür kaplanmasıyla elde edilir. Elektrot derişik KCl çözeltisine yerleştirildiğinde standart hidrojen elektroduna karşı 25 °C sıcaklıkta 198 mV'luk bir potansiyel üretmektedir. Ag/AgCl referans elektrotlarında elektrolit olarak genellikle KCl kullanılır. Elektrotun temel reaksiyonu:



$$E = E_{\text{AgCl/Ag}}^o - 0,059 \log[\text{Cl}^-] \quad (2.4)$$

Kalomel referans elektrot

Kalomel elektrot referans olarak Gümüş/Gümüş Klorür gibi yaygın kullanılan bir elektrottur. Elektrot reaksiyon şu şekildedir;



Reaksiyonda potansiyeli, Hg sıvı olarak oluştuğu için sadece klorür derişimine bağlıdır.

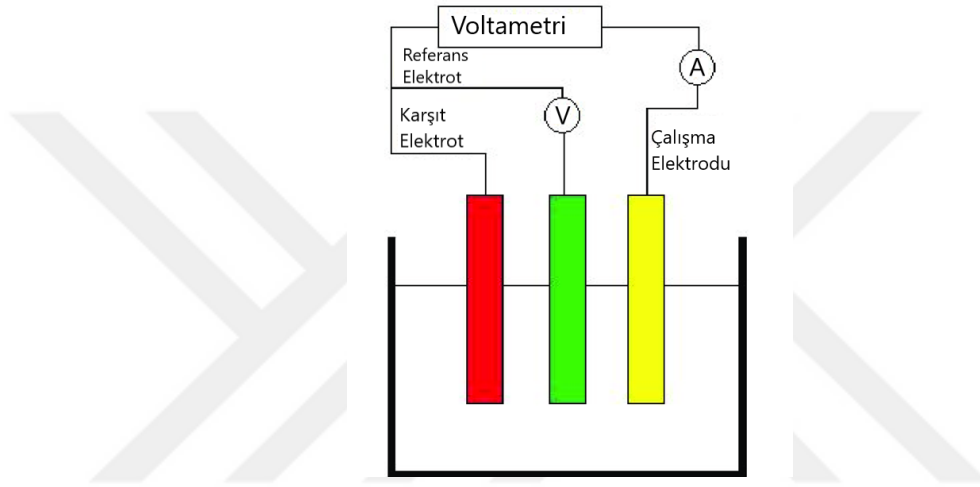
$$E = E^o - \frac{0,0592}{2} \log[\text{Cl}^-]^2 \quad (2.5)$$

Doygun Kalomel Elektrot (SCE), standart hidrojen elektroduna karşı 25 °C sıcaklıkta yaklaşık 244 mV potansiyel oluşturur.

Voltametrik biyosensörler;

Voltametri, elektroda uygulanan potansiyel değışimin ve bu değışimin akım olarak ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntemdir. Bu değışen akım değerleri ile çizilen ve voltagram adı verilen bu grafiklerle potansiyel olarak bir molekül veya maddenin potansiyeli hesaplanır. Bu yöntemler çok düşük hacimlerde kullanabildiği için spesifik patojen tespitinde, endüstriyel mikrobiyal proseslerde uygulanabilmektedir.

Voltametrik yöntemde 3 tür elektrot sistemi kullanılır. Bunlar referans elektrot, çalışma elektrodu ve karşıt (yardımcı) elektrottan oluşmaktadır (Chesney, 1996). Voltametrizde yaygın olarak kullanılan uyarma sinyallerinden ve kimyasal sistemlerin incelenmesinde uygulanan çeşitli elektrokimyasal yöntemlerden bazıları Dönüşümlü voltametri (CV), Kare-dalga voltametrisi (KDV), Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), gibi birçok farklı metodu bulunmaktadır. Şekil 2.18’de genel bir voltametri ölçüm hücresi temsil edilmiştir.



Şekil 2. 18 Voltametrik Sistemi

Amperometrik biyosensörler

Amperometri, 1962’de Clark ve Lyons tarafından tasarlanan Clark oksijen elektrotunun temeli olmuştur. Ölçüm tekniği, akımın sabit bir potansiyelde ölçülmesini içerir. En basit çalışma metodu, bir biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak elektroaktif bir ürünün salınımı veya reaktant tüketimi, amperometride doğrudan inert çalışma elektrotunda izlenir (Scott, 1998). Büyük ölçüde basitliği, seri üretim kolaylığı, düşük maliyeti ve enstrümantasyonun mevcudiyeti nedeniyle biyoalgılamada en yaygın kullanılan yöntemlerdendir. Amperometrik yöntemlerde, biri referans diğeri çalışma elektrotu (Pt, Au ve C) olmak üzere iki elektrot kullanılır. Akım şiddeti, çalışma elektrodunda yükseltgenen veya indirgenen elektrokimyasal olarak aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır.

Optik biyosensörler

Optik biyosensörler, ışığın iletimindeki değişimin ölçülmesi veya floresansın ölçülmesi temeline dayanır. Optik biyosensörlerde üç temel bileşen olan fiber gibi bir optik iletim elemanı, immobilize edilmiş biyolojik tanıma elemanı ve optik çevirici bileşenlerinden oluşmaktadır. Optik biyosensörler ile absorpsiyon, fosforesans, kemilüminesans, polarizasyon, yüzey plazma rezonans ve toplam iç yansıma gibi özelliklerin ölçümü gerçekleştirir. Sensörün optimum konfigürasyonu en önemli faktördür ve hassaslığı, dinamik aralığı, cevap süresini, seçiciliği ve kullanım ömrünü tayin eder (Çökeliler, 2006).

Kondüktometrik biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler Diğer elektrokimyasal biyosensör tekniklerine göre çok yaygın bir kullanım alanı yoktur. Ölçüm temeli elektrolit çözeltisinin elektrik akımını iletmesi iyonların kendi yükünden farklı yükteki elektrotlara göç etmesiyle temeline dayanır (Shul'ga ve ark., 1994).

Piezoelektrik biyosensörler

Piezoelektrik biyosensörler, afinite etkileşimi kaydı ilkesi üzerinde çalışan bir grup analitik cihazdır. Bir piezoelektrik sensör, piezoelektrik kristal yüzeyine bağlı bir kütle nedeniyle salınım değişikliği ilkesi üzerinde çalışan bir sensör parçasıdır. Piezoelektrik biyosensörler, virüslerin, bakterilerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, ilaçların, hormon ve pestisitlerin tayininde hızlı ve basit bir şekilde kullanım imkânı sağlarlar (Pohanka, 2018).

Kalorimetrik biyosensörler

Genel olarak enzim tabanlı olarak kullanılan kalorimetrik biyosensörler hassas termistörler kullanılarak ısı değişimlerinin belirlenmesi temeline dayanır. Dezavantaj olarak ortam sıcaklığının ölçüm boyunca sabit tutulması gerekir. Bu nedenle sistem çok iyi yalıtılmalıdır (Nguyen ve ark., 2019).

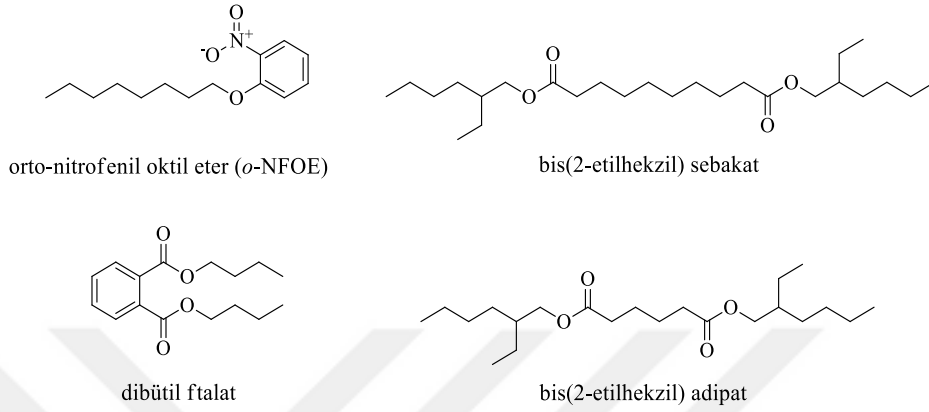
2.6 İyon Seçici Elektrotlar

İyon Seçici Elektrotlar (İSE) ortamda ki farklı iyon matriksin varlığında bile sadece tek bir iyondu duyarlı ve bu iyonu seçici olarak cevap veren elektrolardır. Farklı iyon yüklü türlerine karşı farklı maddelerden üretilen örneğin cam, katı kristal, seramik veya polimer gibi membranlar geliştirilmiştir (Johnson ve Bachas, 2003). Duyarlılığı aktiflikle doğru orantılı olduğundan dolayı iyon seçici elektrotlar iyonların aktifliğine bağlıdır. İyon seçici elektrotlar genel cam iyon seçici, kaplama tel, katı hal iyon seçici membran, gaz ve enzim, sıvı membran (polimer-membran), kompozit elektrotlar olarak sınıflandırılmaktadır.

İyon seçici elektrotlardan yaygın olarak kullanılan sıvı membran esaslı iyon seçici elektrotlar iyondu bağlı membran potansiyeli ölçülür. Bu potansiyelin oluşabilmesi için membranın her iki yüzeyinde bir iyon değişim dengesinin kurulması gerekiyor. Bu sıvı membran elektrotlar iyon değişimini sağlayan aktif organik iyon değiştiriciler, şelat halkalı yapılar ve iyonofor özelliği gösteren moleküllerdir (Özbek ve Isildak, 2021) Pozitif yüklü iyon değiştiriciler, o-fenantrolin tuzları kullanılırken negatif yüklü iyon-değiştiriciler ise, potasyum tetrakis (p-klorofenil) borat (KTPClPB) tuzu kullanılmaktadır (Wang, 2006).

İyonoforlar, molekül veya enzimler olabilir. Bu yapılar membran yapının herhangi bir türe karşı seçiciliğini belirleyen anahtar bileşendir. İyonoforlar genel olarak analitteki moleküllerle kompleks yapma eğilimde olurken diğer türlerle etkileşime girmez (Isildak ve ark., 2022). İyonoforlar miktarını membran içinde sabit ve homojen halde tutmak için, bağlanma merkezleri haricinde çok sayıda lipofilik gruplar da bulundurulmalıdır. Membranların elektrot yüzeyinde tutunması için polimer maddeler kullanılır. Bu polimer maddeler kararlı yapılar olup en iyi performans sergileyen polivinil klorür (PVC) yaygın olarak kullanılır. Bu membrana polimer özellik kazandıran PVC'ye ek olarak plastikleştiriciler kullanılır. Plastikleştiriciler membranların viskoz hale gelmesini sağlar. PVC membran yapılar ağırlıklı oranlarda ilave edilen plastikleştiricilerin tipi ve miktarı, iyon-iyonofor etkileşiminde büyük etkiye sahiptir. Yani iyonofor miktarı sabit dahi olsa plastikleştirici miktarların değiştirilmesi ile daha iyi sonuçlar elde edilebilir (İŞILDAK, 2000). Membranlarının

yapılarında orto-nitrofenil oktil eter (*o*-NFOE), bis(2-etilhekzil) sebakat (BEHS), dibütil ftalat (DBF) ve bis(2-etilhekzil) adipat (DEHA) en yaygın kullanılan plastikleştiricilerdir (Özbek ve IŞILDAK, 2021) (Şekil 2.19).



Şekil 2. 19 Yaygın olarak kullanılan plastikleştiriciler

2.7 Biyosensörlerin Performansına Etki Eden Faktörler

2.7.1 Seçicilik

Bir biyosensörün önemli karakteristiklerinden biri olan seçicilik bir numune içinde uygun bir ölçümün yapılabileceğinin ölçüsüdür. Çalışan bir elektrotun hedef molekül dışındaki herhangi bir türden etkilenmemesi veya kısmi olarak bir davranış sergilemesi gerekir. Uygulamada hiçbir elektrot sadece tek bir iyonla karşı seçicilik göstermez. Bir elektrotun en üst seçicilik sınırı, iyonoforun yalnızca analit türe bağlandığı ve bozucu türlerle etkileşmediği zaman elde edilir. Ancak, çoğu analit için böyle ideal iyonoforlar bulunmamaktadır. Genellikle elektrotların seçicilikleri iyonoforun seçiciliği ile sınırlıdır. Seçicilik katsayısı değerleri (K_{ij}), Nikolskii-Eisenman eşitliğinden türetilebilir (2.6). Aktivitesi a_i ve yükü z olan bir i türüne duyarlı elektrot, aktivitesi a_j ve yükü y olan bozucu türleri içeren bir çözeltiye daldırıldığı zaman, hücre potansiyeli aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$E = E^0 \pm RT/z_i F \ln [a_i^{\frac{1}{z_i}} + k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}}] \quad (2.6)$$

Ortamda birden fazla bozucu iyon varsa, her bir iyonun aktivitesi ve seçicilik katsayılarının çarpımı toplanabilir. Böylece eşitlik, aşağıda verilen genel hali alır:

$$E = E^0 \pm RT/z F \ln [a_i^{\frac{1}{z_i}} + \sum k_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}}] \quad (2.7)$$

Burada $k_{i,j}$; *seçicilik katsayısı*dır ve sadece i türüne cevap veren bir elektrot için $k_{i,j}$ değeri çok küçüktür. Bu değer elektrot yüzeyinde gerçekleşen iyon-değişim reaksiyonu ile ilgili bir büyüklüktür. Seçicilik, çoğunlukla $K_{i,j}^{pot}$ 'nın logaritması olarak ifade edilir. Deneysel seçicilik katsayıları aktiviteye ve tayin edildikleri yöntemle bağlı olarak değişim gösterirler. Literatürde, seçicilik katsayılarının tayininde kullanılan değişik yöntemler yer almaktadır. Bu yöntemlerden ayrı çözelti yöntemi (SSM) ve sabit bozucu yöntemi (FIM) IUPAC tarafından önerilmiştir (Anonymous 1994). Sözü edilen bu yöntemlerin hem avantajları hem de sakıncaları olabilmektedir ve bu yöntemlerden hangisinin daha doğru sonuçlar verdiği konusunda genel kurallar bulunmamaktadır (Anonymous 1994).

Ayrı çözelti metotları

Ayrı çözelti metoduyla seçicilik sabiti hesaplaması iki farklı şekilde ölçülür. Biri iki farklı çözelti içerisinde birincisinde a_A aktivitede A türü bulunurken B iyonu bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_A 'dır. Diğeri ise çözeltide ilk çözeltideki türün aktivitesine eşit aktivitede B türü (a_B) bulunurken A türünden hiç bulunmaz. Bu çözeltinin ölçülen potansiyeli E_B 'dır. Bu veriler kullanılarak seçicilik sabitleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanır. Bu yöntemde $a_A = a_B$ durumu dikkate alınır. Eşitlikten faydalanarak aynı potansiyel değişime karşılık gelen aktiviteler hesaplanarak seçicilik sabitleri belirlenir (Umezawa ve ark., 2000).

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A) \cdot Z_A \cdot F}{RT \ln 10} + \left(1 - \frac{Z_A}{Z_B}\right) \cdot \log a_A \quad (2.8)$$

İkinci yöntem ise, $\log a$ ve E arasındaki ilişki ana tür ve girişim yapan tür için elde edilir. Bu ilişki yardımıyla aynı potansiyel değerine karşılık gelen aktiviteler kullanılarak seçicilik katsayıları hesaplanır. Bu yöntemde ise, $E_A = E_B$ dikkate alınır (Umezawa ve ark., 2000).

$$\log K_{A,B}^{pot} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.9)$$

Karıştırılmış çözelti metotları

Sabit bozucu metodu

Bu metotun temelinde hücrenin potansiyeli, sabit tutulurken ana tür aktivelerinin değiştirilmesi hesaplanan seçicilik katsayısıdır. Burada girişim yapan türün aktivitesi (a_B) yapılan seçicilik katsayısı hesaplamalarında, ana iyon aktivitesinin (a_A)dır. Bu ölçümlerde elde edilen potansiyel değerler, $\log a_A$ 'ya karşı grafiğe geçirilir ve buradan seçicilik katsayıları hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{pot} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.10)$$

Sabit ana tür metodu

Bu metotta hücrenin potansiyeli, ana türün aktivitesinin (a_A) sabit ancak bozucu türün aktivitesinin (a_B) değiştirilerek hesaplanan seçicilik katsayısıdır. (Umezawa ve ark., 2000). Burada yine aynı Sabit bozucu metodunda olduğu gibi elde edilen potansiyel değerler, $\log a_A$ 'ya karşı grafiği çizilir.

$$K_{A,B}^{pot} = a_A / (a_B)^{Z_A/Z_B} \quad (2.11)$$

İki çözelti metodu

İki çözelti metodu ana iyon çözeltisinin potansiyeli (E_A) ile ana iyon ve girişim yapan türün karışımından oluşan çözeltinin potansiyeli (E_{A+B}) kullanılarak ($\Delta E = E_{A+B} - E_A$) formülü ile seçicilik sabiti potansiyel farkı değerinin aşağıdaki eşitlikte yerine yazılmasıyla hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{pot} = a_A \left[e^{\Delta E \cdot Z_A \cdot \frac{F}{RT}} - 1 \right] / a_B^{Z_A/Z_B} \quad (2.12)$$

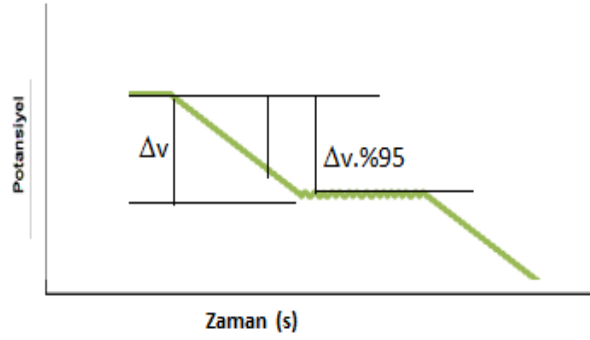
Karşılaştırmalı potansiyel metodu

Bu metot diğerlerinden farklı olarak Nikolsky–Eisenman eşitliğine bağlı değildir. Ölçüm şekli ilk olarak, ana türün bilinen aktivitedeki (a_A') karşılık potansiyel değişimi (ΔE) kaydedilir. Daha sonra, girişim yapan türün çözeltisi (a_B) aynı potansiyel değişim (ΔE) ölçülene kadar referans çözeltisine eklenir. a_B 'ye karşılık gelen potansiyel fark ölçümü süresince çözeltide a_A hiç değişmeden kalmalıdır. Bu metot ile yapılan seçicilik katsayıları aşağıdaki formülden hesaplanır (Umezawa ve ark., 2000).

$$K_{A,B}^{pot} = (a_A' - a_A) / a_B \quad (2.13)$$

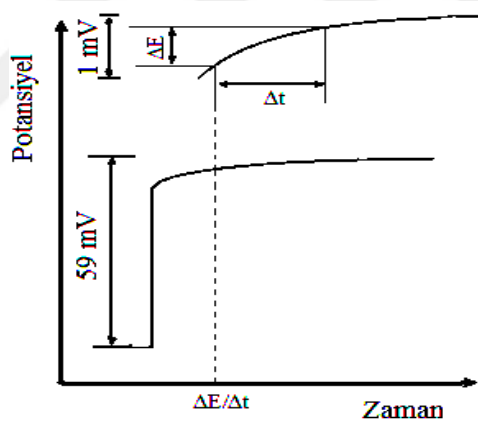
2.7.2 Cevap zamanı

Cevap zamanı bir elektrotun potansiyometrik performansını gösteren önemli parametrelerden birisidir. IUPAC cevap zamanını, potansiyelinin dengeye ulaşması için geçen süre olarak tanımlamıştır. Genel olarak oluşturulan membranın fiziksel yapısının kalın veya ince olmasına bağlıdır (Özbek ve ark., 2021). Cevap zamanını belirlemek için, IUPAC tarafından farklı hesaplama yöntemleri önerilmiştir. Bu yöntemlerden birisi denge halinde gözlenen potansiyel değişiminin % 95'inin gerçekleşmesi için geçen süre olarak tanımlanır ve t_{95} şeklinde ifade edilir (Buck ve Lindner, 1994). IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95}) grafiksel olarak Şekil 2.20'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 20 IUPAC'a göre cevap zamanı (t_{95})

IUPAC birim zaman daki potansiye değişimini $\Delta E/\Delta t < 1 \text{ mV}$ olarak ifade eder. Bu değer birim zamandaki potansiyel değişimi için diğer bir kriterdir. Bu kriterin sağlanması için geçen süre, cevap zamanı olarak değerlendirilir. Şekil 2.21'de ifade edilebilir, ama farklı deney koşullarına göre değişim gösterebilmektedir.

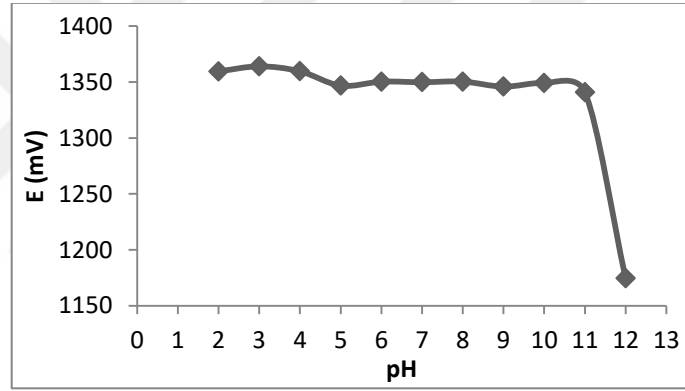


Şekil 2. 21 IUPAC'a göre cevap zamanı

Cevap zamanını daha iyi duruma getirmek ve daha kısa cevap zamanı elde etmek için bazı etkili önlemler alınabilir. Örneğin, daha homojen bir membran karşım elde etmek, membran elektrot yüzeyinin kirli olmamasını sağlamak, düşük derişimli çözeltilerden başlayarak daha derişik çözeltilere doğru ölçümleri almak olabilir. Bu gibi etkiler dikkate alınarak daha kısa zamanda cevap zamanı gerçekleştirilir. (Çoldur, 2010).

2.7.3 pH çalışma aralığı

pH çalışma aralığı bir elektrot için önemli potansiyometrik parametrelerdendir. Elektrotun asidik ve bazik ortamdan etkilenmeden analiti seçici olarak ölçebildiği pH aralığı belirlenir (Isildak ve ark., 2022). Elektrotun analite karşı belirli pH aralığında sergilediği potansiyeller ölçülür ve potansiyel (mV)–pH grafiği çizilir. Bu grafikte potansiyel olarak değişikliğin olmadığı aralık pH çalışma aralığı olarak belirlenir (Buck ve Lindner, 1994; Umezawa ve ark., 2000). Şekil 2.22’de Işıldak ve ark. (2019) yapmış olduğu bir çalışmada elde ettikleri örnek bir pH çalışma aralığı görülmektedir. Geliştirilen elektrotun pH 2.0–11.0 arasında bir çalışma aralığına sahip olduğu görülmektedir (Isildak ve ark., 2019)



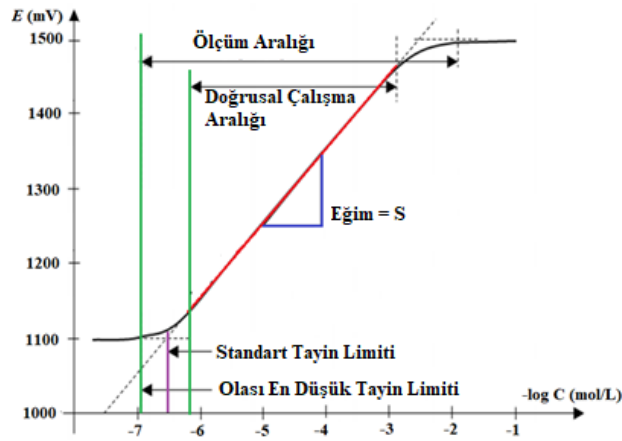
Şekil 2. 22 İyon seçici bir elektrotun pH çalışma aralığı

2.7.4 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, bir elektrotun aslında en temel gereksinimlerinden birisidir ve elektrotun kararlı davranışının bir ölçüsüdür. Tanım olarak ise farklı konsantrasyonlardaki çözeltiler arasında tekrar ölçülen potansiyel değerlerin standart sapması olarak verilebilir (Isildak ve ark., 2022). Tekrarlanabilirliğin birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi tekrar ölçüm hatayı en aza indirir ve ölçümlerin doğru potansiyel değerlerine ulaşmasını sağlar.

2.7.5 Tayin limiti

Tayin limiti, bir elektrotun analit ortamındaki hedef molekülün gözlenebildiği minimum derişim değerini ifade eder (Işıldak ve Özbek, 2021). Potansiyometrik ölçümlerde diğer metotlardan üstünlük sağladığı noktayı belirlemede yardımcı olur. Potansiyometrik bir elektrotun kalibrasyon grafiği Şekil 2.23’de görülmektedir. Kalibrasyon grafiği iki doğrusal kısımdan oluşmaktadır ve elektrotun tayin limitleri bu iki doğrusal bölgenin ekstrapolasyonlarının kesiştiği noktaya karşılık gelen aktivite değeri olarak belirlenmektedir (Buck ve Lindner, 1994; Özbek ve Işıldak 2021).



Şekil 2. 23 İyon seçici bir elektrotun tayin limiti belirleme yöntemi

2.7.6 Kullanım ömrü

Kullanım ömrü, bir elektrotun kararlılığının bir ölçüsüdür ve ne kadar uzun zaman kararlı ölçümler sergilediğini ifade etmede kullanılır. Bir elektrotun potansiyometrik davranışlarında zaman içerisinde kararlılığını gösteren bir parametredir. Elektrotların kullanım ömürleri, membran yapısı, membranın sağlamlığı, kullanım sıklığı ve saklanma koşullarına göre farklılıklar gösterebilir (Buck ve Lindner, 1994).

2.8 Kaynak Özetleri

Bitki ekstraktlarını ve moleküllerin antioksidan kapasitelerini tespit etmek için elektrokimyasal tayin yöntemlerinde literatürde en çok çalışılan yöntem Voltametrik ve Amperometrik temelli kimyasal sensör geliştirilmesi üzerinedir. Bu yöntemlerde elektrot olarak karbon çalışma elektrotu yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu elektrot sıvı (karbon pasta elektrotlarına) veya katı (basılmış karbon elektrotuna) matrikse dayalı olabilir. Karbon pasta için de anorganik veya organik maddeler kullanarak seçicilik artırabilmektedir. Literatürde mevcut antioksidan aktivite tayini için elektrokimyasal çalışmalar incelendiğinde genel olarak Voltametrik ve Amperometrik yöntemlere dayalı çalışmalar olduğu görülmektedir.

Gil ve arkadaşları tarafından geliştirilen lakkaz bazlı biyosensörü kullanılarak şarapların antioksidan aktivitesini değerlendirmek için amperometrik yeni bir metot geliştirmişlerdir. Lakkaz temelli biyosensör ile belirlenen toplam antioksidan aktivite ile biyoelektrokimyasal polifenol indeksi arasındaki doğrusal ilişkiyi kullanarak, bir şarabın Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAC) hesaplanmıştır (Gil ve Rebelo, 2010).

de Araújo Rodrigues ve arkadaşların yaptığı çalışmada şarap numunelerinin fenolik bileşik içeriği ve in vitro ortamda toplam antioksidan kapasitelerini üç farklı yöntemle (Elektrokimyasal Yöntem (Diferansiyel Puls (DP) voltametrisi), Spektrofotometrik Yöntemler ve Elektrokimyasal Algılamalı Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-EC)) belirlemişlerdir. Şarapların toplam antioksidan kapasitesi, difenilpikrilhidrazil (DPPH•) serbest radikalının “etkin konsantrasyonu” (EC₅₀) ve elektrokimyasal kantitatif indeks (EI) kullanılarak ölçülmüştür. Elektrokimyasal ölçümlerde referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu, mm çapında camsı karbon çalışma elektrotu (GCE), ve platin tel karşı elektrot kullanılmıştır (de Araújo Rodrigues ve ark., 2019).

Ignatov ve arkadaşları tarafından antioksidanların elektrokimyasal yöntemle tespiti için, sitokrom-c ile modifiye edilmiş elektrot geliştirmişler. Bu elektrot kullanılarak ksantin oksidaz bazlı süperoksit radikalleri için Amprometrik ölçümüne dayanan bir yöntem geliştirilmiştir (Ignatov ve ark., 2002).

Bourvellec ve arkadaşları, bazı flavonoidlerin antioksidan kapasitesini ölçmek için Dönüşümlü Voltametik (CV) bir yöntem önermişlerdir. Yöntem, antioksidan substratın süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ile reaksiyonunun kinetiğine dayanmaktadır (Le Bourvellec ve ark., 2008).

Mello ve arkadaşları bitki ekstraktlarında antioksidan özelliklerini belirlemek için in vitro Fenton tipi reaksiyon yoluyla $OH^{\bullet}$ radikallerinin DNA hasarını tespit etmek için elektrokimyasal yöntem ile çalışmışlardır. Çalışmada gümüş referans elektrot, grafit elektrot, çalışma elektrotu ve grafit bazlı film baskılı elektrokimyasal hücre kullanılmıştır (Mello ve ark., 2006).

Oliveira-Neto ve arkadaşları ticari kavrulmuş kahve ürünlerinin antioksidan aktivitesini elektroanaliz yöntemi ile değerlendirirken, sinamik asit markörlerinin belirlenmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanmışlar, toplam fenolik içerik (TPC) için Folin Ciocalteu deneyi ve geleneksel DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikal giderme aktivitesinin tayini için CV yöntemi kullanılmıştır (Oliveira-Neto ve ark., 2016).

Maslov ve arkadaşları epigallokateşin gallatın antioksidan aktivitesini belirlemek için potansiyometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Ölçümler referans elektrot ve platin elektrot ile gerçekleştirilmiştir. Oksitleyici olarak $K_3[Fe(CN)_6]$ kullanılmış ve $K_3[Fe(CN)_6] / K_4[Fe(CN)_6]$ oranı 0,002 / 0,0002 mol/L'ye eşittir. Doğrusal çalışma aralığı 0,002 – 0,02 mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında ve belirleme katsayısı $R^2 = 0,9992$. Geri kazanım yüzdesinin % 96,01 ila %101,61 aralığında olduğu bulunmuştur (Maslov ve ark., 2021).

Simic ve arkadaşları bir takım doğal fenoliklerin (salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, p- hidroksibenzoik asit, protokateşik asit, o-,m- asit ve p-kumarik asit, kafeik asit, kuersetin ve rutin) serbest radikal giderme aktivitesini CV yöntemi kullanarak araştırmışlardır. Çalışma elektrotu camı karbon elektrot, karşıt elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılmıştır. (Simić ve ark., 2007).

Šeruga ve arkadaşları tarafından Hırvatistan'ın üç farklı şarap yetiştirme bölgesinde üretilen kırmızı şarapların toplam polifenol (TP) içeriği antioksidan aktivite

açısından analiz edilmiştir. TP içeriği, DPV, Folin–Ciocalteu (FC) ve HPLC yöntemleri ile ölçülmüştür. Sonuçlar, TP'nin belirlenmesinde DPV'nin daha hassas bir yöntem olduğunu göstermiş ve çalışma elektrotu olarak 3 mm çapında camı karbon (GC) elektrot, referans elektrot olarak doymuş kalomel elektrot (SCE) ve karşı elektrot olarak platin gazlı bez ile standart üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücrede gerçekleştirildi. DPV, FC ve HPLC ile belirlenen TP içerikleri arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Kırmızı şaraplardaki TP içeriğini ifade etmek için standart olarak (+)-kateşin kullanılmış ve (+)-kateşinin voltamogramlarının daha pozitif potansiyel değerlere kaydığı görülmüş. Bu potansiyel farkı kullanılarak şarap numunelerindeki TP içeriği hesaplanmıştır (Šeruga ve ark., 2011).

Rodríguez-Delgado ve arkadaşları Amperometrik Yöntemi ile fenolik bileşiklerin belirlenmesinde lakkaz biyosensörünü kullanarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada endüstriyel uygulamalarda kullanılan lakkaz biyosensörlerine genel bir bakış sunulmaktadır (Rodríguez-Delgado ve ark., 2015).

Timina ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bir çalışmada ise Sulu bitki ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin *in vitro* değerlendirilmesi için hızlı, tekrarlanabilir ve uygulaması basit yeni bir akış enjeksiyon potansiyometrik (FIP) yöntemi önermişlerdir. Bu yöntemde, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ nin kompozisyon değişikliği nedeniyle oluşan negatif sinyal ölçülmüştür. Platin elektrot detektör olarak kullanılmıştır (Timina ve ark., 2019).

Buratti ve arkadaşları, sebzelerin antioksidan gücünü değerlendirmek için sebze içeriğinde bulunan karotenoidler, klorofiller, tokoferoller ve kapsaisin gibi lipofilik bileşiklerin tayini için yeni bir amperometrik yöntem önermişler. Bu çalışmada Ag / AgCl referans elektrot ile bir camı karbon çalışma elektrotu ile donatılmış elektrokimyasal detektörlü akış enjeksiyon sistemine dayanmaktadır. Sebze ekstraktlarından elde edilen ölçüm sonuçları, klasik yöntemle belirlenen ABTS radikal katyon giderme aktivite sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır (Buratti ve ark., 2001).

Blasco ve arkadaşları, doğal fenolik antioksidanların analitik karakterizasyonunda, camı bir karbon elektrot kullanarak DPV yöntemi ile tespit etmişler. pH 7,5'te flavonoidlerin seçici elektrokimyasal oksidasyonu ve pH 2,0'da

toplam fenolik asitlerin ve flavonoidlerin elektrokimyasal oksidasyonu gerçekleştirilmiştir (Blasco ve ark., 2004).

Ferreira ve arkadaşları tarafından geliştirilen serik indirgeme / Antioksidan Kapasite CRAC yönteminde birçok organik bileşik için direkt elektron transferi kullanılarak antioksidan kapasite testi yapılmıştır. Sekiz farklı antioksidan bileşiğinin Ce^{4+} 'yı, Ce^{3+} indirgeme kapasiteleri kronoamperometrik ölçümler yoluyla hesaplanmıştır. Ölçümler galvanostatın döngüsel voltametri özelliğinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrot olarak Bor Katkılı Elmas (BBD) kullanılmıştır (de Queiroz Ferreira ve Avaca, 2008).

Pisoschi ve arkadaşları ise bir çalışmada meyve suları ve şaraptaki askorbik asit konsantrasyonu Diferansiyel Puls Voltametrisi ile belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde Askorbik asidin oksidasyonu sonucu oluşan maksimum potansiyel değeri, Pt çalışma elektrotu üzerinde yaklaşık 530 mV'da (SCE'ye karşı) ve bir karbon pastası çalışma elektrotu üzerinde yaklaşık 470 mV'da meydana gelmiştir (Pisoschi ve ark., 2011).

Arteaga ve arkadaşları Baharatlarda, çeşnilerde bulunan doğal bileşiklerin antioksidan aktivitesini elektrokimyasal olarak belirlemişler ve DPPH radikal giderme aktivitesini ölçmüşlerdir. Voltametrik yöntem, oksidasyon potansiyelleri ile anti-radikal güç ($ARP = 1 / EC50$) arasında bulunan korelasyon, DPPH radikal giderme antioksidan özelliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Arteaga ve ark., 2012).

Literatürdeki potansiyometrik temelli çalışmaları inceleyecek olursak, Elbehery ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada askorbik asit ve fenolik antioksidanların tayini için iki farklı sensör geliştirmişlerdir. Birinde iyonofor olarak CuII-neocuproin / 2,6-diklorofenolindofenolat ($[Cu (Neocup)_2] [DCPIP]_2$), diğerinde metilen mavisi / 2,6-diklorofenolindofenolat (MB / DCPIP) iyon çifti kompleksleri kullanılmış ve 2,6-diklorofenolindofenolat iyonunun akış enjeksiyon analizi potansiyometrik olarak incelenmiştir. Ayrıca statik ölçümler için, bir Ag/AgCl referans elektrotu ile birlikte DCPIP membran bazlı sensörler kullanılmıştır (Elbehery ve ark., 2019).

Shpigun ve arkadaşları tarafından sulu bitki özütlerinin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için yeni bir potansiyometrik akış enjeksiyon yöntemi

geliştirilmiştir. Bu yöntem, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redoks-reaktif çözeltisinin bileşim değişikliğine bağlı olarak platin elektrot ile geçici negatif sinyal ölçümlerine dayanmaktadır. Potansiyometrik ölçümlerde, biri su, diğeri de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ bileşeninden oluşan iki fazlı bir akış enjeksiyon kullanılarak elde edilmiştir. Sistemde reaksiyon bobininde (RC) meydana gelen antioksidan türler ve $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ iyonları arasındaki redoks reaksiyonu, reaktif çözeltisinin redoks potansiyelinin değişimine sebep olmakta ve bu değişim bir platin elektrot vasıtasıyla izlenmiştir (Shpigun ve ark., 2006).

Draghi, ve Fernandes, *Musa acuminata*'dan ekstrakt edilen ve katı kontak bir dönüştürücü yüzeyine kovalent bağ ile immobilize edilen tirozinaz enzimini kullanarak etiket içermeyen bir potansiyometrik biyosensör geliştirmişlerdir. Dönüştürücü iki katmandan oluşmakta, birinci katman karboksillenmiş poli (vinil) klorür (PVC-COOH), grafit ve potasyum permanganatın karışımını içermekte ikinci katmanında, N-(3-dimetilaminopropil) -N'-etilkarbodiimid hidroklorür ile tirozinaz enzimi reaksiyona sokularak dönüştürücü yüzeyine immobilize edilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör kullanılarak bal ve propoliste toplam fenol ve toplam fenolik testi (FCR) akış enjeksiyon analizi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Draghi ve Fernandes, 2017).

Ivanova ve arkadaşları farklı maddelerin antioksidan aktivitelerini araştırmak için $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ sistemi kullanılarak potansiyometrik yöntemle incelemişlerdir. Çözeltideki antioksidan bileşenle etkileşim sonucu aracı sistem $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ bileşenlerinin oksitlenmiş ve indirgenmiş formlarının değişen oranından kaynaklanan ve Platin elektrotta oluşan potansiyelinin değişimi ölçülmüştür (Ivanova ve ark., 2015).

Cezayir'de toplanan hurmaların antioksidan potansiyelleri elektrokimyasal ve spektrofotometrik teknikler kullanılarak *in vitro* değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmada, dört yerli çeşit hurma ağacının (*Phoenix dactylifera*. L) meyvelerinin toplam fenolik içeriğin ve metanolik ekstraktının antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Elektrokimyasal hücre ($V = 25 \text{ mV}$), analit ve fazla miktarda destekleyici elektrolit içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşur. Çalışma elektrotu olarak camı karbon elektrot ($\varnothing 3.0 \text{ mm}$), yardımcı elektrot olarak platin tel ve referans elektrot olarak doymuş kalomel elektrot (SCE) kullanıldı. En yüksek etkili antioksidanı

karşılayan döngüsel voltametri yönteminde (CV) daha düşük IC50 değeri Cht'nin metanolik ekstraktında 0,006 mg mL⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Bensaci ve ark., 2021).

Ghibia ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Ouargla bölgesinde (Cezayir) yetişen beş farklı hurma çeşidindeki toplam fenolik içeriğini Döngüsel Voltametre (CV) tekniği ile tespit ederek antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. CV ölçümlerde referans elektrot olarak doymuş kalomel elektrot (SCE), yardımcı elektrot olarak platin tel ve çalışma elektrotu olarak camısı karbon elektrot kullanılmıştır (Ghiaba ve ark., 2014).

Sun ve arkadaşları şarap numunelerin toplam fenolik içeriğini belirlemek amacıyla galvanik bir elektrokimyasal hücre içerisinde potansiyometrik olarak incelemişlerdir. Bunun için yaklaşık 210 µm kalınlıktaki iyonofor içermeyen membran, ağırlıkça 200 mg %9 TDMAC, %31 PVC ve %60 o-NPOE'in 2,0 mL THF içerisinde çözünmesi suretiyle hazırlanmış ve bir cam plaka üzerine dökülmüştür. Kurutulduktan sonra 6 mm çapında membran diskler kesilerek THF / PVC bulamaçla plastikleştirilmiş bir PVC tüpe yapıştırılmıştır. Elektrot iç dolgu çözeltisi olarak 10⁻¹ M KMnO₄ kullanılmıştır. Toplam fenolik içeriği, gallik asit konsantrasyonuna bağlı olarak MnO₄⁻ ile arasında oluşan potansiyel ölçülüp kalibrasyon eğrisi elde edilerek belirlenmiştir (Sun ve ark., 2019).

El-Kosasy ve arkadaşları tarafından PVC polimerik matrisinde plastikleştirici olarak dioktil ftalat, iyonofor olarak β-siklodekstrin, ile oluşturulan iyon seçici membran sensörü kullanılarak 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH•) radikali potansiyometrik olarak ölçülmüştür. Bu amaçla 0,04 g β-siklodekstrin, 0,19 g PVC karboksilat ve 0,4 mL dioktil ftalat (DOP)'tan oluşturulan membran karışım 5,0 mL THF içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra 3,0 cm uzunluğunda, 3,0 mm çapında bir grafit çubuk kullanılarak çubuğun bir ucu bağlantı için kullanılırken, diğer ucu yaklaşık 1 cm uzunluğunda elektro-aktif membran karışımına daldırılarak uygun kalınlıkta kaplanmıştır. Grafit çubuğun kaplanmamış ucu bir poli tetra etilen tüpüne daldırılıp boru, içine bakır bir telin daldığı metalik civa ile doldurulmuştur. Bu sensör kullanılarak DPPH• radikalinin konsantrasyon değişimine karşı elde edilen sensör potansiyelleri kullanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Bu çalışmada önerilen prosedür, Persantin® tabletlerinde dipiridamolün ve Hepamol® tabletlerinde

parasetamolün DPPH• radikali ile etkileşim sonucu çözeltideki radikal değişimi belirlenerek DPPH• radikali giderme aktivitelerinin değerlendirilmesi için uygulanmıştır (El-Kosasy ve ark., 2013).

Brainina ve arkadaşları Seminal ve Foliküler sıvıların oksidan / antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesinde Seminal ilavesiyle ferrisiyanid / ferrosiyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$) mediatör sisteminde elektrot potansiyelinin keskin bir şekilde değişmesine dayanan potansiyometrik yöntemi uygulamışlardır. İndikatör elektrot olarak platin elektrot kullanılmıştır. Potansiyometrik ölçümler, çoklu potansiyometrik analizör kullanılarak yapılmıştır (Brainina ve ark., 2012).

Brainina ve arkadaşlarının diğer bir çalışmasında da yine benzer yöntem kullanılarak belirlenecek madde ile arabulucu sistemin oksitlenmiş formu arasındaki redoks kimyasal reaksiyonu sonucu elektrot potansiyel kaymasının belirlenmesine yönelik yeni bir yöntem sunulmaktadır. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için antioksidanların "redoks potansiyel kaymasına yol açan aracı sistem $K_3[Fe(CN)_6]$ / $K_4[Fe(CN)_6]$ ile kimyasal etkileşimi kullanılmıştır (Brainina ve ark., 2007).

Antioksidan özelliklerin tayinine yönelik literatür çalışmaları incelendiğinde, Voltametrik Amperometrik ve Diferansiyel Puls Voltametrisi yöntemleri ve klasik yöntemlerin yaygın kullanıldığı görülmektedir. Literatürdeki potansiyometrik temelli çalışmalar ise daha çok FCR tayinine yönelik yapılmıştır. DPPH radikal giderme ve FRAP antioksidan aktivitelerin tayinine yönelik potansiyometrik temelli biyosensör çalışmalarına ise literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışması tamamen özgün bir çalışma olmuştur. Geliştirilen yöntemler literatürdeki mevcut tayin yöntemlerine alternatif birer yöntem olacaktır ve antioksidan analizini oldukça pratik hale getirecektir. Antioksidan özelliğe sahip bir numunenin (bitki ekstraktı, gıda ekstraktı veya çözeltiden) DPPH radikal giderme, FRAP ve FCR antioksidan aktiviteleri ayrı ayrı doğrudan çözeltiye sensör daldırılarak ölçülebilecek olması bu tez çalışmamızı özgün yapmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen sensör ve biyosensörlerin maliyeti ucuz, hazırlanması kolay ve tayin metotunda uygulanabilir olması açısından önem arz etmektedir.

3 MATERYAL ve METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

1. Gallik asit	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
2. Troloks	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
3. Kuersetin	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
4. Folin-Ciocalteu -	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
5 2-2-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
6. 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
7. Askorbik asit	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
8. Dibutilftalat (%99)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
9. Bis(2-etilhekzil) sebakat ($\geq$ %97)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
10. o-nitrofeniloktileter ($\geq$ %99)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
11. Bis(2-etilhekzil) adipat %99	Acros	
12 Potasyum tetrakis (klorofenil)borat	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
13. Sodyum terafenil borat	Merck	
14. Polivinil klorür (PVC)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
15. Tetrahidrofuran (THF) ($\geq$ %99)	Merck	(Kromatografik saflıkta)
16. Nitrik Asit (HNO ₃)	Sigma Aldrich	(Analitik saflıkta)
17. Sodyum Hidroksit	Merck	
19. Sodyum Nitrat	Merck	
18. Potasyum Nitrat	Merck	
19. Kalsiyum Nitrat	Merck	
20. Demir(III) Nitrat	Merck	
21. Demir(II) Nitrat	Merck	
22. Demir(III) Klorür	Merck	
23. Bizmut(III) Nitrat	Merck	
24. Alüminyum(III) Nitrat	Merck	

25. Metanol	Merck
26. Etanol	Merck
27. Epoksi	Macroplast Su 2227
28. Grafit	Sigma Aldrich
29. Sertleştirici	Desmodur RFE
30. Sodyumkarbonat	Merck
31. Trikloroasetikasit	Merck

3.1.2 Kullanılan cihazlar

1. Potansiyometrik biyosensörler (Laboratuvar Yapımı)
2. Bilgisayar kontrollü yüksek impedanslı çok kanallı potansiyometrik ölçüm sistemi ($\pm 0,1$ mV hassaslığında) ve yazılım programı (Medisen Ar-Ge, Türkiye)
3. UV-Visible ölçüm cihazı (Hitachi U-2900/U-2910 UV-Vis)
4. Ag/AgCl referans elektrot (Thermo-Orion)
5. Terazı [WA304 Model, 300g x 0,0001g] (Avery Berkel)
6. pH metre (Mettler Toledo, Model S220-K)
7. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR) Bruker Avance DPX-400

3.2 Metot

3.2.1 Standart çözeltilerin hazırlanması

Ölçümlerde kullanılan standart tuz çözeltileri anyon ve katyonların sülfat, nitrat ve klorür tuzlarından hazırlandı. Hazırlanan tüm standart çözeltiler deionize su kullanılarak hazırlandı. Çalışmalarda kullanılan ve istenilen düşük konsantrasyondaki seyreltik çözeltiler ise derişik standart çözeltilerin deionize su ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Potansiyometrik ölçümlerde kullanılan diğer tüm standart çözeltiler her metot için farklı tip çözeltiler ve oranları deionize su veya alkol ve metanol kullanılarak hazırlandı.

3.2.2 Standart DPPH•, FCR ve FeCl₃ çözeltilerinin hazırlanması

Standart DPPH• radikal çözeltisi su ortamında çözülmediği için tüm çözeltileri etanol ortamında hazırlandı. Radikal çözeltileri her ölçümde taze olarak hazırlandı. Standart DPPH• radikal çözeltisi 300 mg L⁻¹'lik konsantrasyonlarda hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiden yarı-yarıya seyreltme yöntemiyle seri standart çözeltileri hazırlandı.

Standart Folin-Ciocalteu (FCR) çözeltilerinin hazırlanmasında reaktifinin 2,0 mol L⁻¹'lik standart çözeltisi kullanıldı. FCR'nin daha düşük konsantrasyonlardaki çözeltileri deiyonize su ile seyreltilerek hazırlandı. FCR'nin stok çözeltisinden 0,5 mol L⁻¹'lik standart çözelti hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak yarı-yarıya seyreltme yöntemiyle seri standart çözeltileri hazırlandı.

Standart FeCl₃ stok çözeltisi 1,0×10⁻¹ mol L⁻¹ olarak hazırlandı. Hazırlanan standart çözeltiden seyreltme yöntemiyle 1,0×10⁻¹ – 1,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹'lik çözeltileri hazırlanarak potansiyel ölçümlerinde kullanıldı.

3.2.3 Diğer iyon çözeltilerinin hazırlanması

Ölçümlerde kullanılan standart katyon çözeltileri analitik saflıktaki nitrat tuzları kullanılarak hazırlandı. İlk olarak, her bir katyonun 1,0 × 10⁻¹ mol L⁻¹ derişimdeki standart çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltiler kullanılarak katyonun 1,0 × 10⁻¹ – 1,0 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ derişimlerdeki standart çözeltileri deionize su ile seyreltilmesi ile hazırlandı.

3.2.4 Bitki örneklerinin hazırlanması

Üç farklı *Origanum onites*, *Origanum bilgeri* ve *Thymus praecox* bitki örneğinden 100 gr alınarak 100 mL metanol içerisinde ekstrakte edildi. Elde edilen üç farklı stok metanol ekstraktları analiz edilene kadar +4 °C muhafaza edildi.

3.2.5 Biyosensörlerin hazırlanması

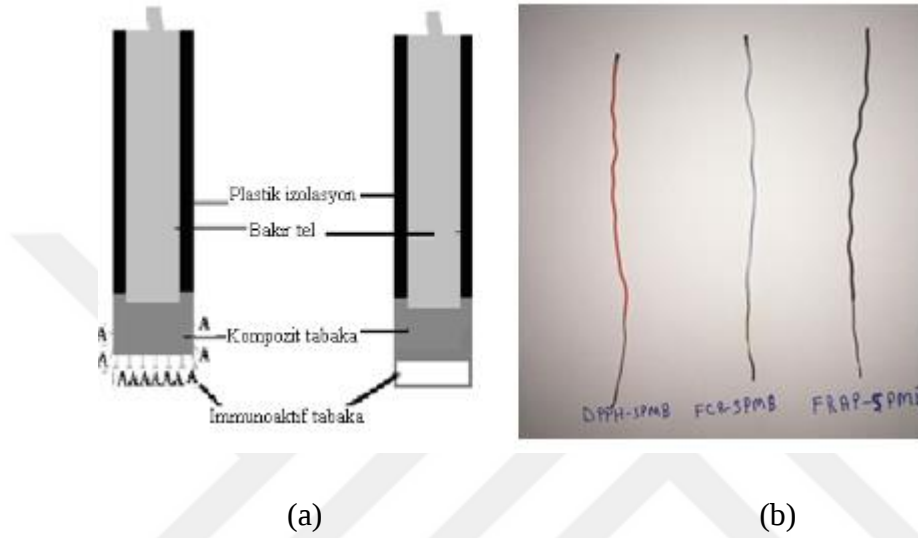
DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün hazırlanışı

Antioksidan aktivite testlerinden DPPH• radikal giderme tayininde kullanılacak olan PVC membran DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün (DPPH-SPMB) hazırlanması için önce membran ile elektrot arasındaki iletimi artırmayı sağlayacak olan katı kontak elektrotları hazırlandı. Daha sonra katı kontak üzerine seçici membran karışımlar hazırlanarak kaplandı. DPPH-SPMB hazırlandıktan sonra Ag/AgCl referans elektrotun yer aldığı hücre sistemi ile potansiyometrik performans özellikleri tespit edildi.

Katı kontakların hazırlanışı; Katı kontaklar çapı (1,0 mm) ve 10-15 cm uzunluğuna sahip olan bakır tellerin uç kısmına belirli oranda grafit, epoksi ve sertleştirici kaplanarak elde edildi. Bunun için grafit, epoksi ve sertleştiriciden oluşan karışım sırasıyla %50 (w/w) grafit, % 35 (w/w) epoksi ve % 15 (w/w) sertleştirici yaklaşık 3 mL THF ilave edilerek homojen olacak şekilde iyice karıştırıldı. Sonra uygun viskoziteye ulaşan katı-kontak karışımına bakır teller 3-4 kez daldırılarak kaplandı. Bakır tellerin uç yüzeyleri katı kontak ile kaplandıktan sonra kuruması için 24 saat süreyle karanlık ortamda bekletildi. Daha sonra katı kontak yüzeylerine membran hazırlanıp kullanıldı. (Işıldak ve Özbek, 2020; Işıldak ve ark., 2019). FCR-seçici ve FRAP-seçici PVC-Membran Biyosensörlerin hazırlanmasında da bu katı kontaklar kullanıldı.

DPPH•-seçici membranların hazırlanışı; toplam ağırlığı 100 mg ve oranları farklı miktarlarda olan membran bileşimi iyonofor, PVC, plastikleştirici ve iletkenlik artırıcı bileşenlerinden oluşmaktadır. İyonofor olarak klasik yöntemde referans olarak kullanılan Gallik asit kullanıldı. Toplamda 12 farklı oranlarda membran karışımı hazırlandı ve her birinin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti ve korelasyon değeri (R^2) belirlenerek optimum bileşenine sahip membran yapı belirlendi. Aktif bileşenin gallic asit kullanıldığı membranlarda plastikleştirici olarak (*o*-NFOE, BEHS, DBF ve DEHA), iletkenlik arttırıcı özelliğe sahip bileşenler (KTpCIPB veya NaTPB)'in farklı oranlarda kullanılmasıyla elde edildi. Farklı oranlarda hazırlanan membran bileşenleri üzerine yaklaşık 3 mL THF eklendi ve homojen bir karışım olana kadar karıştırıldı. THF

içindeki membranlar 4-5 saat şartlanması sağlandı. Uygun viskozite sağlandıktan sonra bir gece önceden hazırlanan katı kontak elektrotların bu membrana daldırılmasıyla DPPH-SPMB hazırlandı. Hazırlanan biyosensörler yaklaşık 12–15 saat aralığında karanlık bir ortamda kurutuldu ve ölçümler yapılana kadar karanlık ortamda bekletildi. Şekil 3.1’de membran tabaka ile kaplanmış bir elektrot şematik olarak gösterilmiştir.



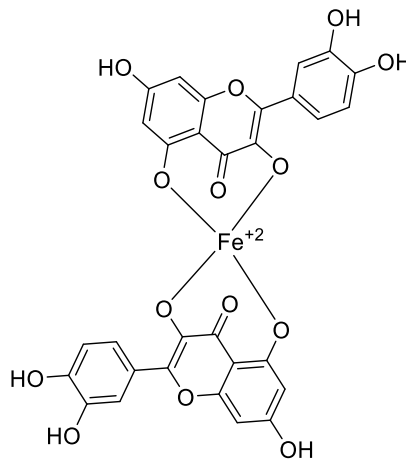
Şekil 3. 1 (a) Potansiyometrik bir biyosensörün şematik gösterimi (b) Çalışma süresince geliştirilen biyosensörler

FCR-seçici PVC membran biyosensörünün hazırlanışı

FCR seçici PVC membran biyosensörler (FCR-SPMB) de DPPH•-seçici membrandaki gibi toplam ağırlığı 100 mg ve oranları farklı miktarlarda olan membran bileşimi iyonofor, PVC, plastikleştirici ve iletkenlik artırıcı bileşenlerinden oluşmaktadır. İyonoforun galik asit olduğu bu sensörlerde toplamda 9 farklı oranlarda membran karışımı hazırlandı ve her birinin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti ve korelasyon değeri (R^2) belirlenerek optimum membran bileşenine sahip membranlar belirlendi. Hazırlanan sensörler yaklaşık 12–15 saat aralığında karanlık bir ortamda kurutuldu ve ölçümler yapılana kadar karanlık ortamda bekletildi.

FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün hazırlanışı

FRAP seçici PVC membran biyosensörlerin (FRAP-SPMB) hazırlanmasında diğeri metotlarda olduğı gibi nötrai taşıyıcı olarak gallik asit, troloks ve kuersetin ayrı ayrı kullanıldı. Hazırlanan biyosensörler ile ölçümler esnasında $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} arasındaki konsantrasyon değışimlerine karşı Fe(III) iyonunun indirgenme sonucu bir potansiyel fark gözlemlendi. Ancak membran yapıdaki iyonoforun analit ortamdaki Fe(III) iyonları ile etkileşimi sonucu membran yüzeyinde bir salınma ve kimyasal bir reaksiyon gerçekleşti. Bu etkileşim neticesinde membran yapıdaki iyonofor giderek aktivitesini kaybetti ve cevap sergilemedi. Bu durumu ortadan kaldırmak için kuersetin-demir kompleksleri elde edilip membran yapıda iyonofor olarak kullanıldı. Bunun için kuersetin ve demir(II) reaksiyona sokularak demir(II)kuersetin kompleksi elde edildi (Şekil 3.2). 1,0 mmol (0,302 g) kuersetin beherde 25 mL metanol içinde çözüldü. İçerisine 1,0 mmol (0,278 g) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Metanol evaprotör ile uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen kompleks hacimce 1:1 oranında bütanol-kloroform karışımı ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra etüvde 24 saat kurutuldu ve koyu renkli cam şişeye koyularak $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı.



Şekil 3. 2 Demir(II)kuersetin kompleksi

FRAP-SPMB membranını hazırlamak için toplam ağırlık 100 mg olacak şekilde demir(II)kuersetin kompleksinin iyonofor olarak kullanıldığı ve PVC ve plastikleştiriciden oluşan membran kompozisyonu hazırlandı. Farklı iyonofor ve plastikleştirici oranlarında toplam 9 farklı membran hazırlandı. Hazırlanan tüm

biyosensörlerin korelasyon (R^2) değerlendirildi ve optimum membran bileşimi belirlendi.

3.2.6 Biyosensörlerin EMF ölçümleri

Tüm potansiyometrik ölçümler oda sıcaklığında ($25 \pm 1,0$ °C), laboratuvar yapımı bilgisayar kontrollü yüksek giriş empedansına sahip dört kanallı bir potansiyometrik ölçüm sistemi ile yapıldı. Bu ölçümlerde referans elektrot olarak, Ag/AgCl elektrodu kullanıldı. Tüm potansiyel ölçümler, aşağıdaki hücre düzeneği kullanılarak gerçekleştirildi.

- Ag/AgCl; KCl (doygun) || DPPH çözeltisi | DPPH•-seçici biyosensör
- Ag/AgCl; KCl (doygun) || FCR çözeltisi | FCR-seçici biyosensör
- Ag/AgCl; KCl (doygun) || FeCl₃ çözeltisi | FRAP-seçici biyosensör

DPPH• radikal giderme aktivite testi

DPPH-SPMB ile çözelti ortamında DPPH• radikal süpürme aktivitesi (DPPH-RSA) ölçümü başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmamızda antioksidan türlerin etkileşim sonucu ortamda söndürülmeyen DPPH• aktivitesi ölçülerek DPPH-RSA değerlendirilmiştir. Üç farklı bitki ekstraktından 10'ar mL hacimlerde alınmış ve bunlara 10'ar mL $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ DPPH• çözeltisi eklenmiştir. Bitki içeriğindeki antioksidan türlerin DPPH• ile etkileşim reaksiyonunun tamamlanması için 30 dakika beklendi ve DPPH-SPMB ile doğrudan bu numunelere daldırılarak potansiyel değerler ölçüldü. Sonuçları karşılaştırmak için standart olarak gallik asit örnekleri de aynı prosedürlere tabi tutuldu. Bu işlem her numune için 3 kez tekrarlanmıştır. Ölçülen potansiyel değerlerin ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Her bitki örneğinin DPPH-RSA değerlendirmek için bizim türettiğimiz aşağıdaki eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplandı. Bu denklem literatürde var olan eşitlik (3.2)'deki parametreler dikkate alınarak türetilmiştir (Isildak ve ark., 2022).

$$\%RSA = \frac{[(E_1 - E_0) - (E_2 - E_0)]}{E_1 - E_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Burada E_0 , bitki örneğinin potansiyel değeridir. E_1 , standart DPPH• çözeltisinin potansiyel değeridir ve E_2 , 30 dakikalık reaksiyondan sonra ortamda kalan DPPH• aktivitesinin potansiyel değeridir.

Literatürde yaygın olarak uygulanan DPPH-RSA tayin yöntemini bizim elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırmak için kullandık. Bu amaçla DPPH• stok çözeltisi etanol içerisinde son konsantrasyonu 1000 mg L^{-1} olacak şekilde hazırlandı ve kullanılabileceği kadar oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edildi. Çalışma çözeltileri, bu stok çözeltisinin seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Her bir bitki ekstraktı etanol kullanılarak 100 mg L^{-1} ($0,26 \text{ } \mu\text{M}$) olacak şekilde seyreltilmiştir. Sonra analizi edilecek numuneler 5, 10, 20, 40 mg L^{-1} olacak şekilde seyreltilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu bitki çözeltilerin üzerine $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ DPPH• çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımlar reaksiyonun tamamlanması için karanlık bir ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda oluşan renkli ürünün absorbanları 517 nm dalga boyunda UV-spektrofotometrede okundu. Her bir deney 3 tekrarlı yapıldı. Kör olarak 100 mg L^{-1} DPPH• çözeltisinin kendisi kullanılmıştır. Hesaplama literatürde kullanılan eşitlik (3.2) kullanılarak yapılmıştır (Jiang ve ark., 2017).

$$\%RSA = \frac{[A_0 - (A_1 - A_2)]}{A_0} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada A_0 , standart DPPH• çözeltinin absorbanı ve A_1 , 30 dakikalık reaksiyondan sonra ölçülen çözeltinin absorbanıdır. A_2 , örneğin kendisinin absorbanıdır.

FCR toplam fenolik bileşik tayin testi

FCR-SPMB ile çözelti ortamında toplam fenolik bileşik miktarı belirlenmesi başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bu çalışmamızda antioksidan türlerin toplam fenolik bileşik miktarları ölçülerek antioksidan kapasitesi değerlendirilmiştir. Çözelti ortamında antioksidan varlığında ortamdaki FCR'yi indirgemesi sonucunda indirgenmeden kalan FCR miktarı ölçülerek toplam fenolik bileşik miktarı tayin edilmiştir.

Spektrometre ölçümlerinde toplam fenolik bileşik miktarı test sonuçları gallik asit (mg/gr ekstrakt) eşdeğeri olarak verilmektedir. Bizde çalışmamızda sonuçlarımızı eşdeğer gallik asit miktarı olarak değerlendirdik. Bu amaç için ortamda antioksidan tür tarafından indirgenen FCR miktarına karşılık gelen gallik asit eşdeğerini belirlemek için GA-FCR kalibrasyon grafiği elde edildi. Bunun için stok olarak 50 mL 1,0 mg mL⁻¹ GA çözeltisi ve 0,5 mmol L⁻¹ 50,0 mL FCR çözeltisi hazırlandı. Sonra stok GA çözeltisinden 1,0- 0,75 - 0,50 - 0,375 - 0,250 - 0,125 - 0,050 - 0,025 mg mL⁻¹ konsantrasyonlarda olacak şekilde GA çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 5'er mL alınarak üzerlerine 40,0 mL deionize su ve 5,0 mL stok 0,5 mmol/L FCR çözeltisinden eklenerek toplam hacim 50,0 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltilerin potansiyometrik cevapları ölçülerek potansiyel değerler elde edildi. Daha sonra GA-FCR kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.17). Kalibrasyon grafiği kullanılarak bitki ekstraktlarının Toplam Fenolik Bileşik miktarını tayin etmek için 5,0, 0,25, 0,125 mg mL⁻¹ olacak şekilde ve 50,0 mL hacimlerde bitkilerin çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bitki çözeltilerden 5'er mL alındı ve üzerlerine 40,0 mL deionize su ve 5,0 mL 0,5 mmol L⁻¹ FCR çözeltisi ilave edilerek vortekslendi. İndirgeme reaksiyonu gerçekleşikten sonra bitki çözeltilerinin potansiyel değerleri ölçüldü. GA-FCR kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemine ölçülen potansiyel değerler yerine koyularak her bir bitkinin Toplam Fenolik Bileşik miktarı GA eşdeğeri (FCR-GAE) olarak hesaplandı.

Toplam Fenolik Bileşik miktarı analizi için literatürde yaygın olarak uygulanan spektroskopik yöntemi ile elde edilen sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırmak için kullanıldı. Bunun için 10 mL'lik 1000 mg L⁻¹ stok bitki ekstraktları hazırlandı. Stok çözeltilerden 100 µL alınarak üzerlerine 4,5 mL olacak şekilde deionize su ilave edildi. Daha sonra 100 µL FC reaktifi eklendi ve 3 dakika sonra 300 µl %2'lik Na₂CO₃ ilave edildi. Her bitki ekstraktının son hacim 5,0 mL'ye tamamlanarak vortekslendi. Numuneler karanlık ortamda 2 saat boyunca indirgenme reaksiyonunun tamamlanması için bekletildi. Daha sonra 760 nm dalga boyunda absorban değerleri okundu. Son olarak GA kalibrasyon grafiğinde yerine konularak bitki ekstraktlarının toplam fenolik miktarları eş değer FCR-GAE miktarı olarak hesaplandı (Elmastas ve ark., 2018).

FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi

FRAP seçici PVC membran biyosensörler (FRAP-SPMB) ile çözelti ortamında Fe(III) iyonunun aktivitesi başarılı bir şekilde ölçülmüştür. Çalışmamızda antioksidan türlerin Fe(III) iyonunu Fe(II) iyonuna indirgemesi sonucu ortamda indirgenmeden kalan Fe(III) iyon aktivitesi ölçülerek demir(III) indirgenme aktivitesi değerlendirilmiştir.

Spektrometre ölçümlerinde Fe(III) indirgeme aktivitesi sonuçları troloks (mg/gr ekstrakt) eşdeğeri olarak verilmektedir. Bu nedenle bizde çalışmamızda sonuçlarımızı troloks eşdeğeri olarak verdik. Bunun için Fe(III) – eşdeğer troloks kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Elde ettiğimiz bu kalibrasyon eğrisinden bitki ekstraktlarının Fe(III) indirgeme aktivitesi potansiyometrik olarak hesaplandı. İlk önce Fe(III) – troloks kalibrasyon grafiğini elde etmek için 50,0 mL 8,0 mg mL⁻¹ Fe(III) ve 8,0 mg mL⁻¹ 20,0 mL troloks stok çözeltileri hazırlandı. Sonra stok olarak hazırlanan troloks çözeltisinden 8,0 - 6,0 - 4,0 - 2,0 - 1,0 - 0,5 - 0,25 mg mL⁻¹ konsantrasyonlarda troloks standart çözeltileri hazırlandı. Daha sonra her bir çözeltiden 5'er mL alınarak üzerlerine 40,0 mL deionize su ve 5,0 mL stok 8,0 mg mL⁻¹ Fe(III) çözeltisinden eklenerek toplam hacim 50,0 mL tamamlandı ve vorteks ile karıştırıldı. Hazırlanan çözeltilerin potansiyel değerleri ölçülerek Fe(III) – eşdeğer troloks kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 4.20). Kalibrasyon grafiği kullanılarak bitki ekstraktlarının Fe(III) indirgeme kapasitesini test etmek için 1,0 - 5,0 ve 2,5 mg mL⁻¹ olacak şekilde ve 50,0 mL hacimlerde bitkilerin çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bitki çözeltilerden 5'er mL alındı ve üzerlerine 40,0 mL deionize su ve 5,0 mL 8,0 mg mL⁻¹ Fe(III) çözeltisi ilave edilerek vortekslendi. İndirgeme reaksiyonu gerçekleştikten sonra bitki çözeltilerinin potansiyel değerleri ölçüldü. Fe(III) – troloks kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denkleminde ölçülen potansiyel değerler yerine koyularak her bir bitkinin Fe(III) indirgeme gücü troloks eşdeğer aktivitesi hesaplandı.

FRAP analizi için literatürde yaygın olarak uygulanan spektroskopik yöntemi ile elde edilen sonuçlar bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile karşılaştırmak için kullanıldı. Bunun için 1,0 mg mL⁻¹ stok bitki ekstraktları hazırlandı. Stok çözeltilerden 100 µl alınarak üzerleri pH=6,6 olan fosfat tampon çözeltisi ile 1,25 mL'ye tamamlandı. Daha

sonra % 1,0'lik potasyum ferriksiyonit ($K_3Fe(CN)_6$) 1,25 mL eklendi. 20 dakika 50 °C'de inkübe edildikten sonra % 10'luk triklorikasit (TCA) ilave edildi ve son olarak % 0,1'lik $FeCl_3$ 'den 0,25 mL ilave edilerek vortekslendi. Bitki ekstraktlarının 700 nm de okunan absorban değerleri troloks kalibrasyon grafiğinde yerine konularak her bir bitki içerisindeki eşdeğer troloks miktarı hesaplandı (Elmastas ve ark., 2018).



4 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, antioksidan kapasitelerin değerlendirilmesinde kullanılan testlerden DPPH radikal süpürme, demir (III) indirgeme (FRAP) ve toplam fenolik testi (FCR) için tümüyle katı–hal kontak PVC membran biyosensörler geliştirildi. Hazırlanan biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, seçiciliği, cevap zamanı, tekrarlanabilirliği, tayin limiti gibi potansiyometrik performans özellikleri laboratuvar koşullarında incelendi. Ayrıca geliştirilen her bir potansiyometrik biyosensörlerin gerçek bitki ekstraktlarının üzerinde ki ölçümleri yapıldı. Klasik yöntemle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak sonuçlar kıyaslandı.

Literatürde potansiyometrik sensörler kullanılarak antioksidan özelliklerin tayinlerinin yapıldığı çalışmalara rastlanmakla birlikte özellikle DPPH• radikali giderme aktivite üzerine bir çalışmaya pek rastlanmamıştır. Bununla beraber bizim çalışmamıza benzer bir çalışma El-Kosasy ve arkadaşları tarafından sunulmuştur. Bu çalışmada, PVC polimerik membran yapıda plastikleştirici olarak dioktil ftalat, iyonofor olarak β -siklodekstrin ile oluşturulan seçici membran sensörü ve Ag / AgCl referans elektrotu kullanılarak DPPH• potansiyometrik olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada önerilen yöntem, Persantin® tabletlerinde dipiridamolün ve Hepamol® tabletlerinde parasetamolün DPPH• ile etkileşim sonucu çözeltideki radikal derişimindeki değişim belirlenerek DPPH• giderme aktivitesinin değerlendirilmesi için uygulanmıştır (El-Kosasy ve ark., 2013).

Biz çalışmamızda antioksidanlar ile oksidanlar arasındaki indirgenme/yükseltgenme etkileşimlerinden faydalanarak tümüyle katı–hal kontak PVC membran biyosensörler geliştirdik. Geliştirilen bu biyosensörler farklı oranlarda iyonofor ve lipofilik tuz potasyum tetrakis(4–klorofenil) borat (KTpClPB), o-nitrofeniloktil eter (o-NFOE), bis(2–etilhekzil) sebakat (BEHS), dibutil ftalat (DBF), bis(2–etilhekzil) adipat ve PVC maddelerinin değişik oranlarda kullanılmasıyla gerçekleştirildi.

4.1 DPPH•-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları

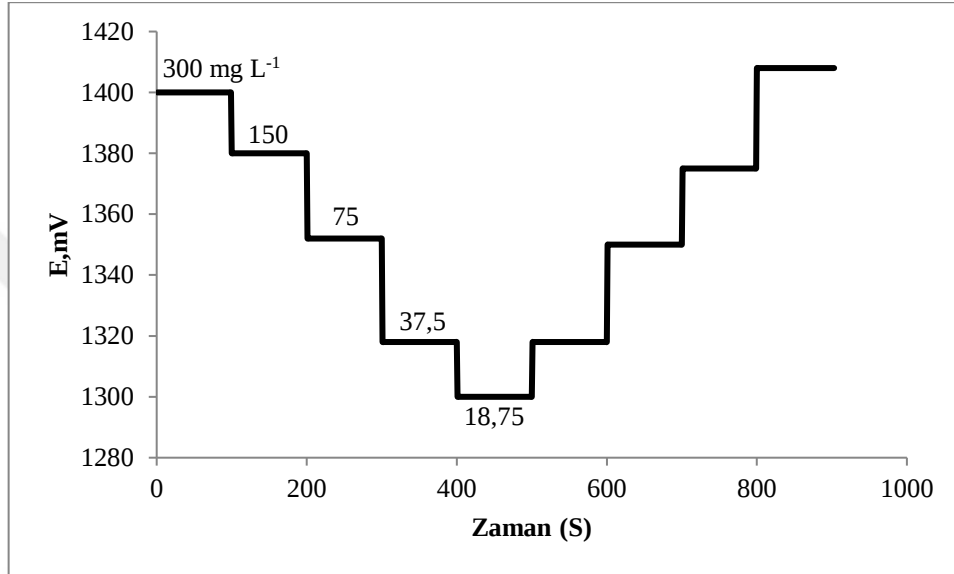
DPPH• radikal giderme testi için geliştirilen katı-kontak PVC membran biyosensörlerin, optimum membran bileşim oranları belirlendi. Bunun için her bir bileşenin membran karışımındaki oranı değiştirilerek biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, korelasyon değeri (R^2) gibi özellikleri ölçüldü. Hazırlanan biyosensörlerin performans özellikleri çizelge 4.1’de ifade edilmiştir. DPPH-SPMB optimum oranları % 17,5 Gallik asit, % 45,0 PVC, % 37,5 DBF sahip 6 numaralı membran karışımı olduğu belirlendi. Bu membran karışımının DPPH• çözeltisinin 18,75 – 300 mg L⁻¹ konsantrasyon aralığında en iyi R^2 (0,9984) değerine sahip olduğu elde edilmiştir.

Çizelge 4. 1 DPPH-SPMB % bileşim oranları ve R^2 değerleri

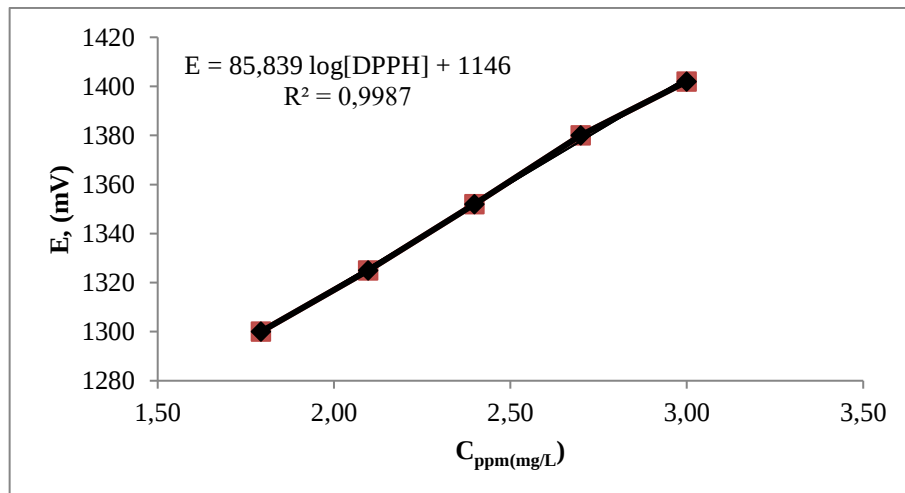
	Gallik Asit (mg)	PVC (mg)	DEHA (mg)	DBF (mg)	NPOE (mg)	BEHS (mg)	R^2
1	12,5	45,0	42,5		-	-	0,9778
2	15,0	45,0	40		-	-	0,9800
3	17,5	45,0	37,5		-	-	0,9894
4	12,5	45,0		42,5	-	-	0,9854
5	15,0	45,0		40	-	-	0,9817
6	17,5	45,0		37,5	-	-	0,9984
7	12,5	45,0		-	42,5	-	0,9179
8	15,0	45,0	-		40	-	0,9282
9	17,5	45,0	-	-	37,5		0,9545
10	12,5	45,0	-	-		42,5	0,9365
11	15,0	45,0				40	0,9312
12	17,5	45,0				37,5	0,9333

Çalışmamızın bundan sonraki tüm aşamalarında 6 numaralı membran bileşimine sahip biyosensör kullanılarak potansiyometrik ölçümler gerçekleştirildi. DPPH-SPMB ile DPPH• çözeltisinin derişimi 18,75 – 300,0 mg L⁻¹ arasında değişen standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Elde edilen potansiyometrik değerler ile potansiyel (mV) – zaman (s) grafiği oluşturuldu. Grafikten DPPH-SPMB’ün doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti gibi önemli potansiyometrik performans

özellikleri belirlendi. Belirlenen doğru denklemi, $E = 107,37 \log[\text{DPPH}(\text{mg/L})] + 1085,2$ ve $R^2 = 0,9984$ olarak elde edildi. Potansiyometrik ölçümler sonucunda DPPH-SPMB, DPPH• çözeltisinin derişimi 18,75 – 300,0 mg L⁻¹ arasında her yarı yarıya seyreltme sonucunda elde edilmiştir (şekil 4.1).



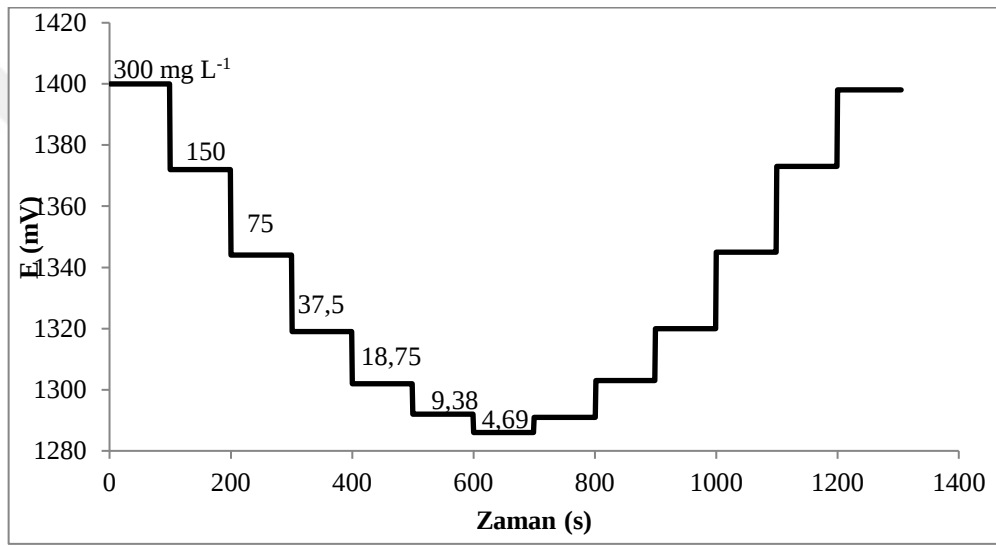
Şekil 4. 1 DPPH-SPMB'ün potansiyometrik davranışı



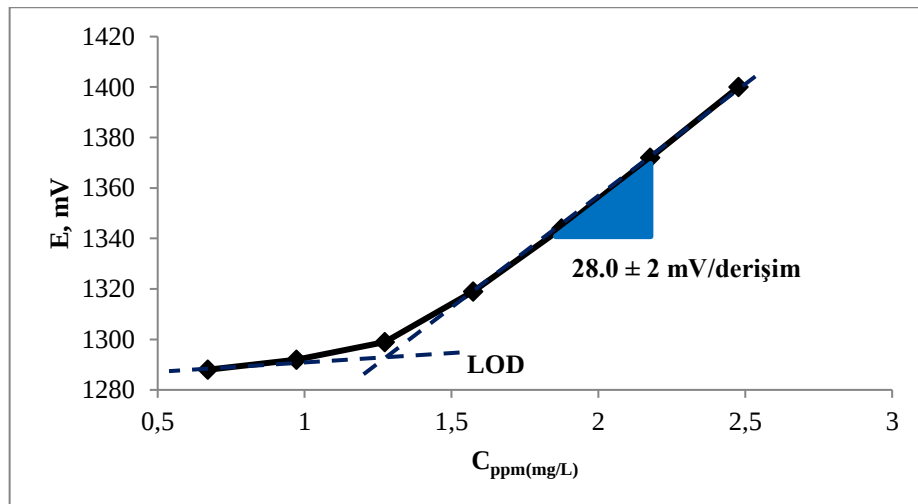
Şekil 4. 2 DPPH-SPMB'ü ile elde edilen kalibrasyon grafiği

4.1.1 DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti

Tayin limiti grafikteki iki doğrusal eğimin kesiştiği noktaya karşılık gelen potansiyel değeri elde edilen doğru denkleminde hesaplandı. $28,0 \pm 2,0$ mV/derişim’lik bir potansiyel değişim sergilediği ve tayin limitinin $12,75 \text{ mg L}^{-1}$ olduğu hesaplandı (Isildak ve ark., 2022). Şekil 4.3’de DPPH-SPMB $4,69 - 300 \text{ mg L}^{-1}$ konsantrasyon aralığındaki potansiyometrik davranışı verilmiştir. Şekil 4.4 de ise, tayin limiti hesaplanmıştır.



Şekil 4. 3 DPPH-SPMB’ün tayin limiti potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 4 DPPH-SPMB tayin limiti grafiği

4.1.2 DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliği

Seçicilik, bir biyosensörün istenen önemli parametrelerinden birisidir. Bitki ekstraktlarında bulunan ve antioksidan özellik göstermeyen ve girişim yapma ihtimali olan bazı organik ve inorganik türlerin varlığında DPPH-SPMB cevabına etkilerini belirlemek amacıyla seçicilik katsayıları belirlendi. DPPH-SPMB seçiciliğinin belirlenmesinde ayrı çözelti metodu kullanıldı. Seçicilik çalışmaları için girişim yapan türlerin $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ derişim aralığındaki çözeltileri kullanıldı. Ölçümlerden elde edilen veriler ile her iyonun $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ derişiminde elde edilen potansiyel değeri aşağıdaki eşitlikte (4.1) yerine yazılarak seçicilik katsayıları ($K_{A,B}^{pot}$) hesaplandı (Buck ve Lindner, 1994).

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + (1 - \frac{Z_A}{Z_B}) \log a_A \quad (4.1)$$

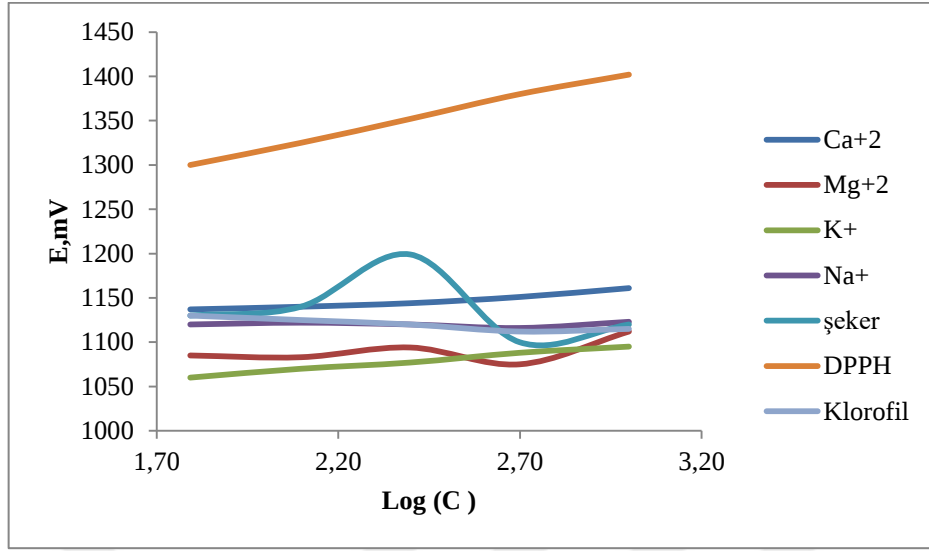
a_A = DPPH• radikalinin aktivitesi a_B = Girişim yapan türün aktivitesi Z_A = DPPH radikal yükü Z_B = Girişim yapan türün yükü

Hesaplanan seçicilik katsayıları çizelge 4.2’de verilmiştir. DPPH-SPMB bitki ekstraktlarında girişim yapabilecek diğer moleküllere ve farklı inorganik iyonlara göre DPPH radikale daha seçici davrandığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 4. 2 DPPH-SPMB seçicilik katsayıları

Girişim Yapan Tür	Ca ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺²	Şeker	Klorofil
$\log K_{DPPH,j}^{pot}$	-3,61	-4,00	-3,72	-3,62	-3,68	-3,68
$K_{DPPH,j}^{pot}$	$2,45 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-4}$	$2,09 \times 10^{-4}$

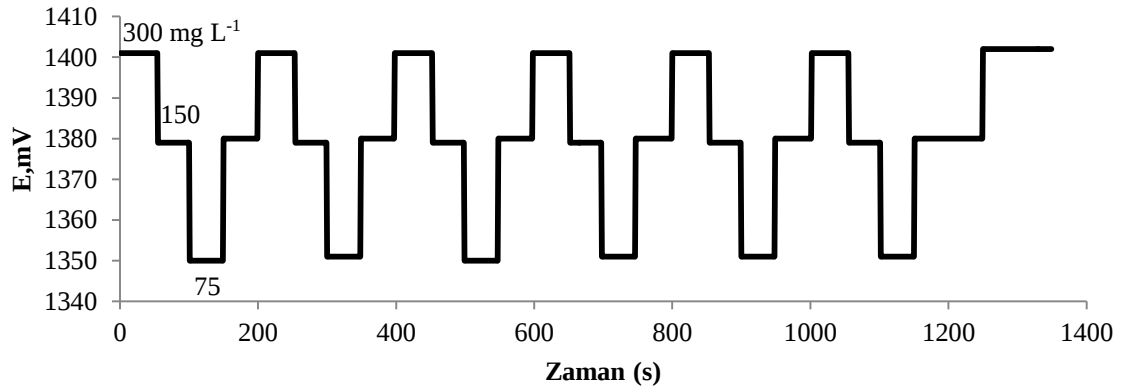
Çizelge 4.2 incelendiğinde girişim yapacak türlerin varlığında DPPH-SPMB’ü DPPH radikale yaklaşık 10000 kat daha seçici davrandığı görülmektedir. Seçicilik katsayısı $K_{x,y}^{pot}$ büyüdükçe biyosensörün ölçülecek türe karşı duyarlılığı azalır. Örneğin; DPPH-seçici biyosensör için Na⁺ girişimi söz konusu ise ve biyosensörün DPPH radikale Na⁺ iyonundan 10000 kez daha duyarlı olduğu sonucu çıkarılır.



Şekil 4. 5 DPPH-SPMB'nün girişim yapan türlere verdiği potansiyel cevabı

4.1.3 DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliği

Tekrarlanabilirlik biyosensörün kararlılığının bir göstergesidir. Tekrar ölçümler sonucunda aynı cevabı sergilemesi beklenir. Bunun için DPPH-SPMB'nün tekrarlanabilirlik çalışması standart DPPH• çözeltilerinin 75 – 150 – 300 mg L⁻¹ derişimlerinde sırasıyla tekrar ölçümler alınarak yapıldı. Bir derişimden diğer bir derişim çözeltilisine geçişlerde biyosensörün yüzeyi yıkandı ve temizlenerek yapıldı. Elde edilen veriler ile Potansiyel (mV) – zaman grafiği elde edildi. DPPH-SPMB tekrarlanabilirlik grafiği Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4. 6 DPPH-SPMB tekrarlanabilirliği

Çizelge 4. 3 DPPH-SPMB’nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri

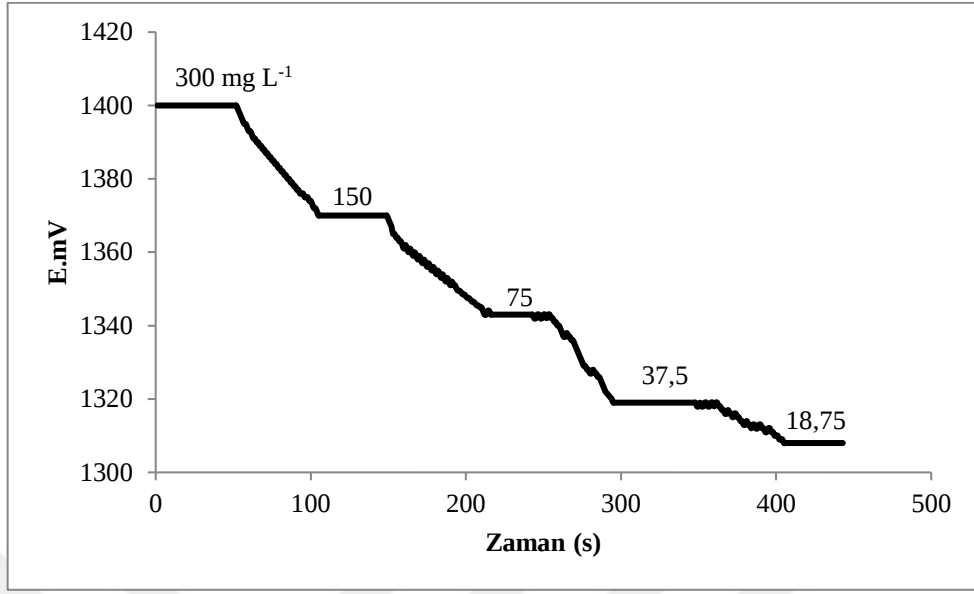
DPPH (mg)	Ölçümler(mV)						$\bar{X} \pm S^*$
	1	2	3	4	5	6	
300,0	1401	1401	1401	1400	1402	1400	1401 $\pm$ 0,82
150,0	1379	1380	1379	1378	1380	1379	1379,1 $\pm$ 0,90
75,0	1352	1351	1350	1352	1351	1352	1351,9 $\pm$ 1,86

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 6 için verilmiştir.

DPPH-SPMB’nün tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen verilerle, çizelge 4.3’de ortalama standart sapma değerleri hesaplanarak gösterilmiştir. Çizelge 4.3’de DPPH-SPMB’nün iyi bir tekrarlanabilirlik sergilediği ve standart sapma değerlerinin az olduğu görülmektedir.

4.1.4 DPPH-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı

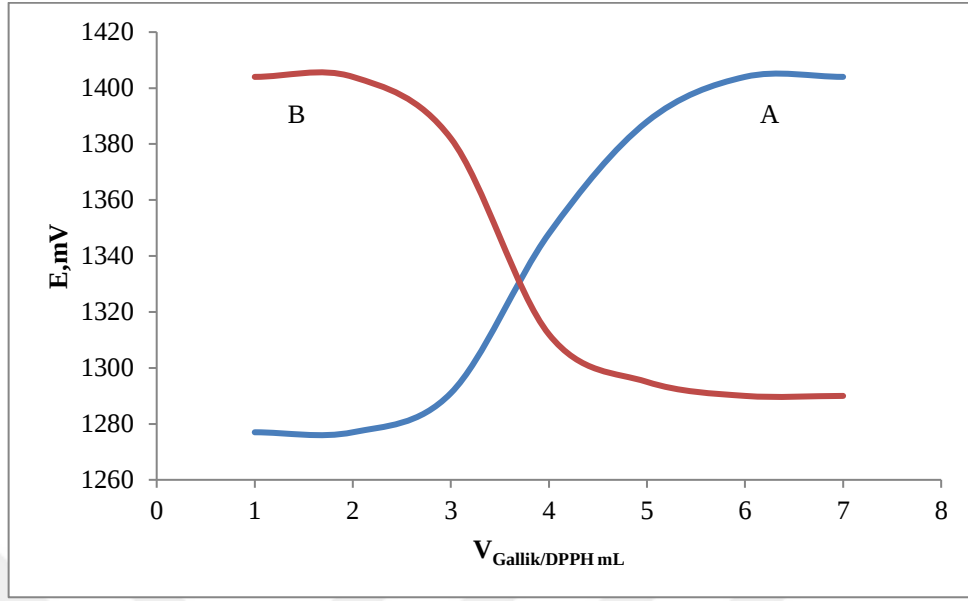
Çalışmamızda DPPH-SPMB’nün cevap zamanını belirleyebilmek için 18,75 – 300 mg L⁻¹ konsantrasyon aralığındaki standart DPPH çözeltileri kullanıldı. Bir çözeltiden diğerine geçişlerde biyosensörün dengeye ulaşma süreleri ölçüldü. Elde edilen veriler kullanılarak Şekil 4.7’deki potansiyel (mV) – zaman grafiği elde edildi. DPPH-SPMB’nün hızlı bir şekilde dengeye geldiği ve cevap zamanının 50-55 saniye arasında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4. 7 DPPH-SPMB cevap zamanı

4.1.5 DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu

Bu çalışmada geliştirdiğimiz DPPH-SPMB Gallik asit ile DPPH• çözeltilerin titrasyonunda indikatör elektrot olarak kullanıldı. DPPH-SPMB sergilemiş olduğu potansiyometrik davranışını incelemek amacıyla iki farklı titrasyon işlemi yapılmıştır. İlk olarak 50,0 mL $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ Gallik asit standart çözeltisine $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ DPPH• çözeltisi eklenerek titrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.8A). Titrant ilavesi ile azalan Gallik asit konsantrasyonundan dolayı potansiyelde azalma meydana gelmiş ve Gallik asit tükenene kadar devam etmiştir. İkinci potansiyometrik titrasyon ise 50,0 mL $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ DPPH• çözeltisine $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ Gallik asit standart çözeltisi eklenerek titrasyon grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.8B). Gerçekleştirilen iki potansiyometrik tirasyonda ilk dönüm noktasına 25,0 mL, ikinci dönüm noktasına da 50,0 mL reaktif eklenmesi sonucunda ulaşılmıştır. Yapılan titrasyonda beklenen hacimlerde dönüm noktaları elde edilmiştir.



Şekil 4. 8 Gallik asitin DPPH• çözeltisi ile titrasyonu (A) ve DPPH• çözeltisinin Gallik asit ile titrasyonu (B)

Titrasyon grafiklerinden de görüldüğü üzere, geliştirilen DPPH-SPMB'nün, yapılan potansiyometrik titrasyonlarda indikatör elektrot olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Titrasyonun son noktasından önce ölçülen potansiyel değerleri, eklenen titrantın miktarı ile genel olarak logaritmik bir değişim göstermiştir. Son noktadan sonra potansiyel cevabı, çözeltideki titre edilen türün düşük konsantrasyonundan dolayı, hemen hemen sabit kalmaktadır. Bu yüzden, son nokta ve çözeltideki DPPH• miktarı titrasyon eğrisinin iki doğrusal kısmının ekstrapolasyonu ile doğru bir şekilde tayin edilebileceği görülmektedir.

4.1.6 DPPH•-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması

DPPH-SPMB'ü gerçek bitki numunelerine uygulanarak DPPH-RSA ölçüldü. Potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik DPPH-RSA test sonuçları karşılaştırıldı. Deneylerde üç farklı kekik türü olan *Origanum onites*, *Origanum bilgeri* ve *Thymus praecox* metanol ekstraktları kullanıldı.

Potansiyometrik ve spektroskopik DPPH-RSA test sonuçları çizelge 4.4'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Sonuçlar incelediğinde DPPH-SPMB ile elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca DPPH-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derişimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöntemle oranla daha hassas olduğu belirlendi. Standart DPPH• çözeltileri kullanılarak ölçülen absorban sonuçları, spektroskopi yönteminin tayin limiti (LOD) değerinin potansiyometrik yöntemle göre oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4. 4 DPPH radikal giderme testinin potansiyometrik ve spektroskopik yöntemlerin kıyaslanması

	Konsantrasyon ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Potansiyel Değer (mV)	Potansiyometrik aktivite (%)	Absorbans	Spektroskopik aktivite(%)	Fark %
<i>Origanum onites l.</i>	5	1343.33 $\pm$ 0.58	8.56 $\pm$ 0.78	0.78 $\pm$ 0.004	7.73 $\pm$ 0.45	0.38
	10	1336.33 $\pm$ 0.58	18.47 $\pm$ 0.78	0.71 $\pm$ 0.005	16.47 $\pm$ 0.59	2.45
	20	1332.67 $\pm$ 0.58	23.52 $\pm$ 1.56	0.69 $\pm$ 0.003	19.02 $\pm$ 0.34	5.30
	40	1312.67 $\pm$ 0.58	50.45 $\pm$ 0.78	0.42 $\pm$ 0.017	50.78 $\pm$ 2.06	-0.33
<i>Thymus praecox</i>	5	1332.33 $\pm$ 0.58	23.87 $\pm$ 0.78	0.66 $\pm$ 0.012	22.43 $\pm$ 1.42	1.44
	10	1311.00 $\pm$ 1.00	51.80 $\pm$ 0.78	0.41 $\pm$ 0.017	51.96 $\pm$ 2.01	-0.16
	20	1279.67 $\pm$ 0.58	95.05 $\pm$ 0.78	0.00	100.00	-4.95
	40	1276.33 $\pm$ 0.58	99.55 $\pm$ 0.78	0.00	100.00	-0.45
<i>Origanum bilgeri l.</i>	5	1346.33 $\pm$ 0.58	4.95 $\pm$ 0.78	0.81 $\pm$ 0.002	4.35 $\pm$ 0.20	0.60
	10	1338.00 $\pm$ 1.00	16.22 $\pm$ 1.35	0.71 $\pm$ 0.008	16.67 $\pm$ 0.90	-0.45
	20	1332.67 $\pm$ 0.58	22.97 $\pm$ 1.35	0.68 $\pm$ 0.002	20.24 $\pm$ 0.20	2.74
	40	1310.33 $\pm$ 0.58	52.25 $\pm$ 0.78	0.41 $\pm$ 0.006	52.08 $\pm$ 0.76	0.17
Troloks	5	1336.33 $\pm$ 0.58	18.47 $\pm$ 0.78	0.69 $\pm$ 0.004	18.63 $\pm$ 0.45	-0.16
	10	1312.00 $\pm$ 0.00	51.35 $\pm$ 0.00	0.41 $\pm$ 0.02	51.92 $\pm$ 2.39	-0.57
	20	1276.67 $\pm$ 0.58	97.75 $\pm$ 0.78	0.00	100.00	-2.25
	40	1276.67 $\pm$ 0.58	99.10 $\pm$ 0.78	0.00	100.00	-0.90
Gallik asit	2,5	1305.00 $\pm$ 0.00	60.81 $\pm$ 0.00	0.34 $\pm$ 0.01	59.65 $\pm$ 1.23	1.16
	5	1278.67 $\pm$ 0.58	96.40 $\pm$ 0.78	0.00	100.00	-3.60
	10	1278.33 $\pm$ 0.58	98.20 $\pm$ 1.56	0.00	100.00	-1.80
	20	1276.33 $\pm$ 0.58	100.00	0.00	100.00	0.0

DPPH-SPMB'nün hassasiyetini elde ettiğimiz sonuçlar göstermektedir. *Thymus praecox* bitkisinin 20,0 ve 40,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ çözeltilerinin spektroskopik yöntemde aktivite %100 olarak ölçülmüştür. Ancak geliştirdiğimiz potansiyometrik DPPH-SPMB'ü ile ölçtüğümüz aktivite değerleri sırasıyla %95,05 ve %99,55 olarak bulunmuştur (çizelge

4.4). Aynı şekilde spektroskopik yöntemde Troloks ve Gallik asit için %100 aktivite bulunurken, potansiyometrik DPPH-SPMB'ü ile DPPH-aktivite değerleri Troloks için sırasıyla 97,75 ve 99,10 ve Gallik asit için 96,40 ve 98,20 olarak bulunmuştur (Isildak ve ark., 2022).

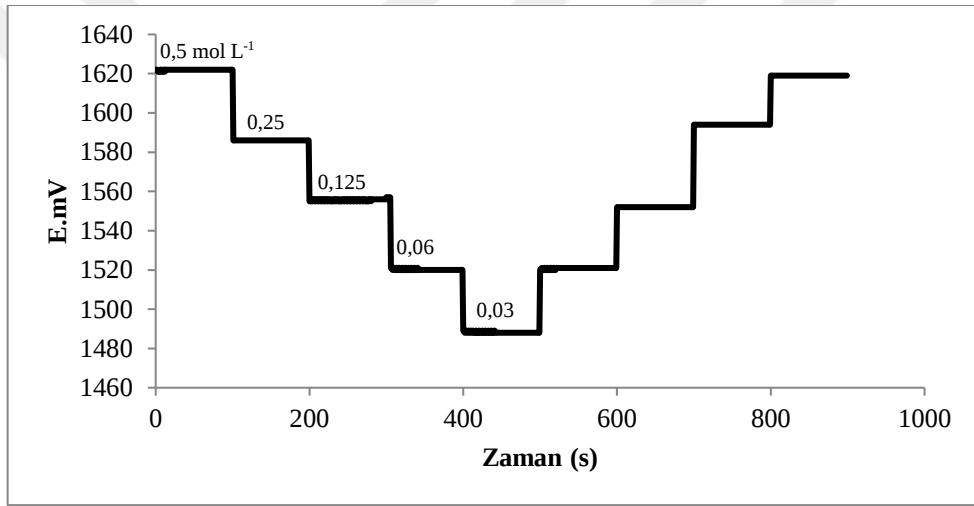
4.2 FCR-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları

Toplam fenolik bileşik testi için geliştirilen katı-kontak PVC membran biyosensörlerin, optimum membran bileşim oranları belirlendi. Bunun için her bir bileşenin membran karışımındaki oranı değiştirilerek biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, korelasyon değeri (R^2) gibi özellikleri ölçüldü. Hazırlanan biyosensörlerin performans özellikleri çizelge 4.5'de ifade edilmiştir. FCR-seçici PVC membran biyosensörün (FCR-SPMB) optimum membran bileşim oranları % 5,0 Gallik asit, % 30,0 PVC, % 65,0 DBF sahip 3 numaralı membran karışımı olduğu belirlendi. FCR-SPMB'ü çözelti ortamında Folin-Ciocalteu reaktifine (FCR) karşı seçici davranmaktadır. Bu nedenle ölçüm mekanizması şu şekildedir. Antioksidan özelliğe sahip fenolik türler FCR'yi indirgemektedir ve bu etkileşim stokiyometrisine dikkate alınarak ortamdaki toplam fenolik bileşik miktarı belirlenmektedir. Numune ortamına eklenen ve miktarı bilinen FCR'deki azalmaya bağlı olarak antioksidan özellik olan toplam fenolik miktarı ölçülmektedir.

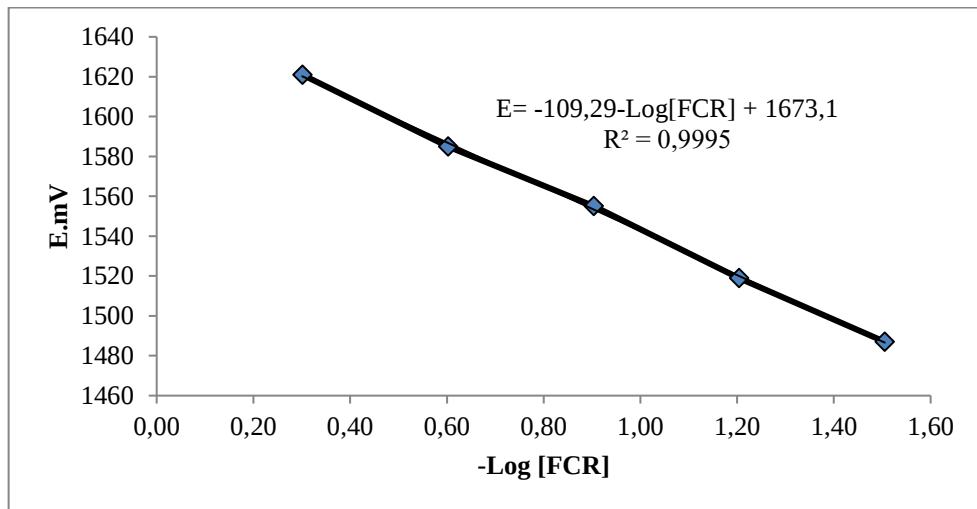
Çizelge 4. 5 FCR-SPMB'nün % bileşim oranları ve R^2 değerleri

	Gallik Asit (mg)	PVC (mg)	DBF (mg)	DEHA (mg)	NPOE (mg)	BEHS (mg)	R^2
1	5,00	30,00	-	65,00	-	-	0,956
2	2,50	30,00	-	67,50	-	-	0,958
3	5,00	30,00	65,00	-	-	-	0,9995
4	2,50	30,00	67,50	-	-	-	0,9246
5	7,50	30,00	62,50	-	-	-	0,9596
6	10,00	30,00	60,00	-	-	-	0,9845
7	5,00	30,00	-	-	-	65,00	0,8996
8	5,00	30,00	-	-	65,00	-	0,985
9	7,50	30,00	-	-	62,50	-	0,988

Çalışmamızın bundan sonraki tüm aşamalarında 3 numaralı membran bileşimine sahip biyosensör kullanılarak potansiyometrik ölçümler gerçekleştirildi. FCR-SPMB'ü ile FCR çözeltisinin derişimi 0,031 – 0,5 mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında değişen standart çözeltileri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı. Elde edilen potansiyometrik değerler ile potansiyel (mV) – zaman (s) grafiğı oluşturuldu (Şekil 4.9). Grafikten FCR-SPMB doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti gibi önemli potansiyometrik performans özellikleri belirlendi. Belirlenen doğru denklemi, $E = 109,29 \text{ Log[FCR]} + 1673,1$ ve $R^2 = 0,9995$ olarak elde edildi (şekil 4.10).



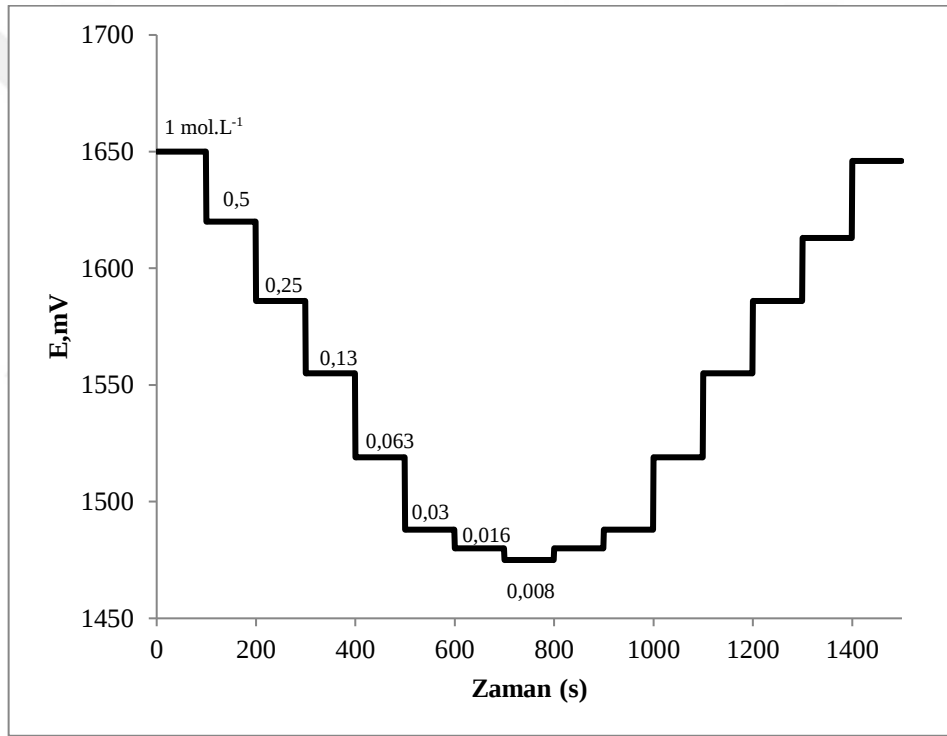
Şekil 4. 9 FCR-SPMB'ün potansiyometrik davranışı



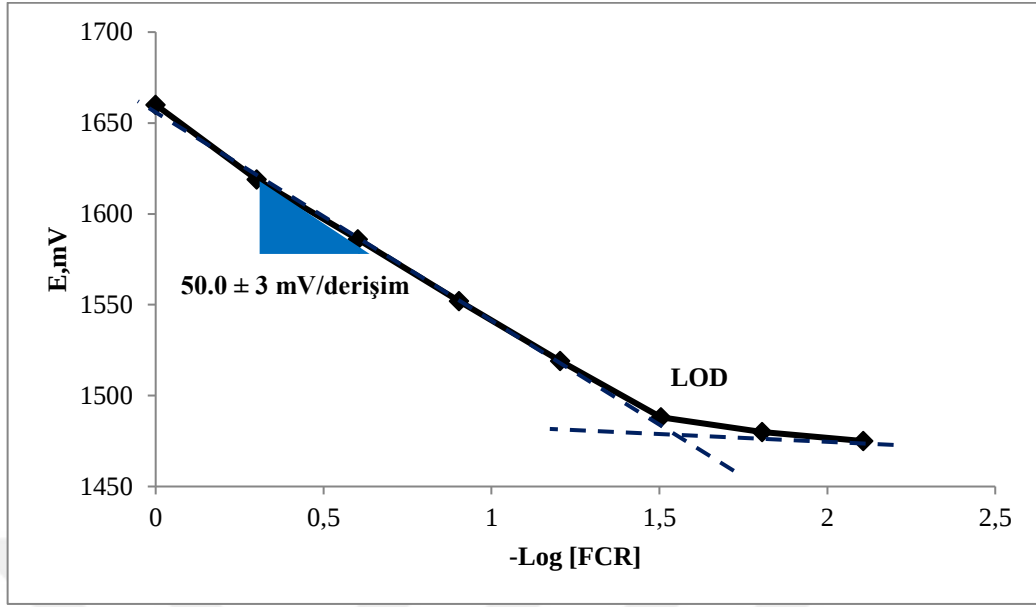
Şekil 4. 10 FCR-SPMB'ü ile elde edilen FCR kalibrasyon eğrisi

4.2.1 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti

Tayin limiti grafikteki iki doğrusal eğimin kesiştiğı noktaya karşılık gelen potansiyel değeri elde edilen doğru denkleminde hesaplandı. Potansiyometrik ölçümler sonucunda FCR-SPMB, FCR çözeltisinin derişimi $0,008 - 1 \text{ mol L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında her yarı yarıya seyreltme sonucunda $50,0 \pm 3,0 \text{ mV/derişim}$ 'lik bir doğrusal potansiyel değışim sergilediğı ve tayin limitinin $0,022 \text{ mol L}^{-1}$ olduğı hesaplandı. Şekil 4.11'de FCR-SPMB'nün $0,008 - 1,0 \text{ mol L}^{-1}$ konsantrasyon aralığındaki potansiyometrik davranış verilmekmiştir. Şekil 4.12'de ise, tayin limiti hesaplanmıştır.



Şekil 4. 11 FCR-SPMB'ün tayin limiti potansiyometrik davranış



Şekil 4. 12 FCR-SPMB'ün tayin limiti ve LOD değeri

4.2.2 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliği

Bitki ekstraktlarında bulunan ve antioksidan özellik göstermeyen ve girişim yapma ihtimali olan bazı organik ve inorganik türlerin varlığında FCR-SPMB cevabına etkilerini belirlemek amacıyla seçicilik katsayıları belirlendi. FCR-SPMB'nün seçiciliğinin belirlenmesinde ayrı çözelti metodu kullanıldı. Seçicilik çalışmaları için girişim yapan türlerin $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ derişim aralığındaki çözeltileri kullanıldı (Şekil 4.13). Ölçümlerden elde edilen veriler ile her iyonun $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ derişiminde elde edilen potansiyel değeri aşağıdaki eşitlikte (4.1) yerine yazılarak seçicilik katsayıları ($K_{A,B}^{\text{pot}}$) hesaplandı (Buck ve Lindner, 1994).

$$\log K_{A,B}^{\text{pot}} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + \left(1 - \frac{Z_A}{Z_B}\right) \log a_A \quad (4.1)$$

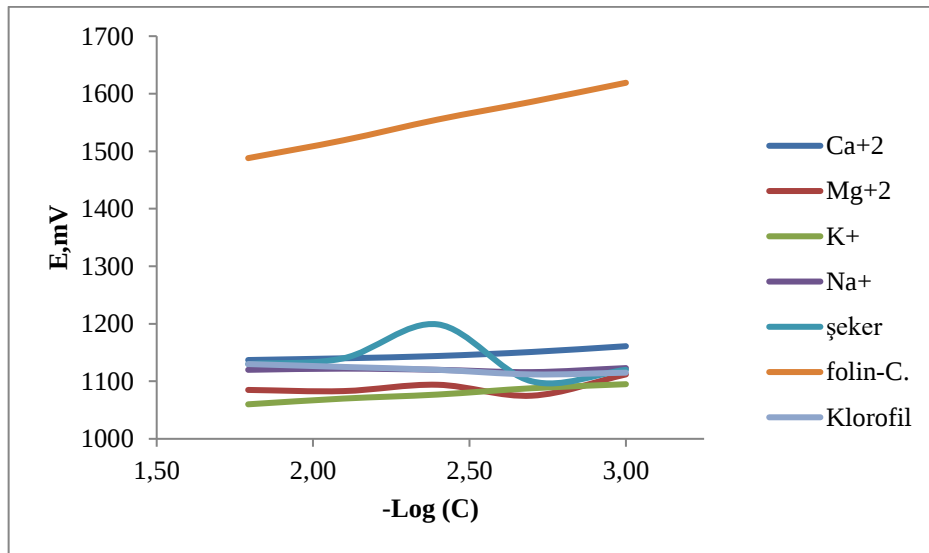
a_A = FCR'nin aktivitesi a_B = Girişim yapan türün aktivitesi Z_A = FCR'nin yükü Z_B = Girişim yapan türün yükü

Hesaplanan seçicilik katsayıları çizelge 4.6'da verilmiştir. FCR-SPMB'ünün bitki eksraktlarında girişim yapabilecek diğer moleküllere ve farklı inorganik iyonlara göre FCR'ne daha seçici davrandığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 4. 6 FCR-SPMB seçicilik katsayıları

Girişim Yapan Tür	Ca ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺²	Şeker	Klorofil
$\log K_{FCR,j}^{pot}$	-8,35	-8,42	-7,95	-9,64	-9,21	-9,02
$K_{FCR,j}^{pot}$	$4,47 \times 10^{-9}$	$3,8 \times 10^{-9}$	$1,12 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^{-10}$	$6,17 \times 10^{-10}$	$9,55 \times 10^{-10}$

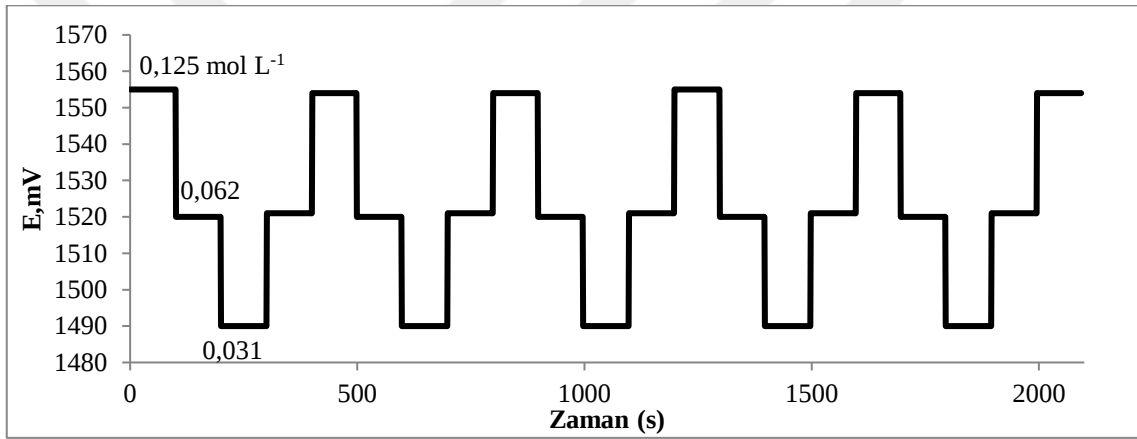
Çizelge 4.6 incelendiğinde girişim yapacak türlerin varlığında FCR-SPMB'ü FCR'ye yaklaşık $10^8 - 10^{10}$ kat daha seçici davrandığı görülmektedir. Spektroskopik ölçümlerde antioksidan aktivite göstermeyip ancak çalışılan dalga boyunda absorpsiyon yapabilen türlerin girişimi söz konusu olabilir. Bizim önerdiğimiz yöntemde ise biyosensörün yüksek seçiciliğinden dolayı bu tür maddelerin girişim etkilerinin bulunmaması bir üstünlüktür.



Şekil 4. 13 FCR-SPMB'nün girişim yapan türlere verdiği potansiyel cevabı

4.2.3 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliği

FCR-SPMB'nün kararlılığını belirlemek için tekrar ölçümler alındı. Bunun için FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik çalışması standart FCR çözeltilerinin 0,031, 0,062 ve 0,125 mol L⁻¹ derişimlerinde sırasıyla tekrar ölçümler alınarak yapıldı. Bir derişimden diğer bir derişim çözeltisine geçişlerde biyosensörün yüzeyi yıkandı ve temizlenerek yapıldı. Elde edilen veriler ile Potansiyel (mV) – zaman grafiğı elde edildi. FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik grafiğı Şekil 4.14'de görölmektedir.



Şekil 4. 14 FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirliği

Çizelge 4. 7 FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri

FCR (mol L ⁻¹)	Ölçümler (mV)					
	1	2	3	4	5	$\bar{X} \pm S^*$
0,125	1555	1555	1554	1555	1555	1554,6 $\pm$ 0,55
0,062	1519	1520	1519	1520	1521	1520,2 $\pm$ 0,84
0,031	1489	1490	1488	1490	1490	1489,2 $\pm$ 1,10

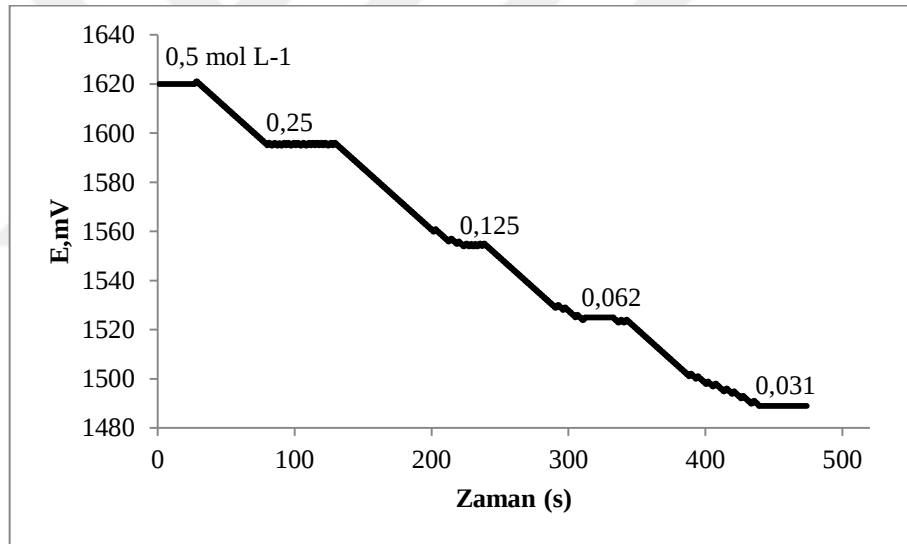
*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 5 için verilmiştir.

FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen verilerle, çizelge 4.7'de ortalama standart sapma değerleri hesaplanarak gösterilmiştir. Çizelge 4.7'de

FCR-SPMB'nün iyi bir tekrarlanabilirlik sergilediği ve standart sapma değerlerinin az olduğu görülmektedir.

4.2.4 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı

Çalışmamızda FCR-SPMB'nün cevap zamanını belirleyebilmek için 0,031 – 0.5 mol L⁻¹ konsantrasyon aralığındaki standart FCR çözeltileri kullanıldı. Bir çözeltiden diğerine geçişlerde biyosensörün dengeye ulaşma süreleri ölçüldü. Elde edilen veriler kullanılarak Şekil 4.15'deki potansiyel (mV) – zaman grafiği elde edildi. FCR-SPMB'nün hızlı bir şekilde dengeye geldiği ve cevap zamanının 45-50 saniye arasında olduğu bulunmuştur.

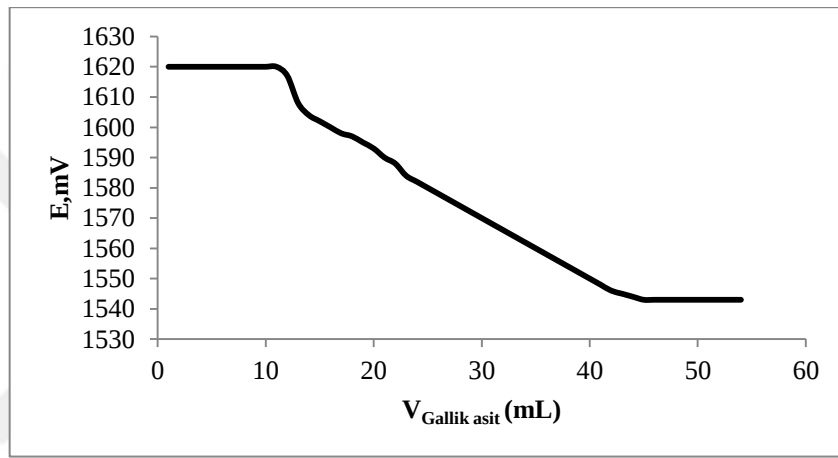


Şekil 4. 15 FCR-SPMB'nün cevap zamanı

4.2.5 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu

Bu çalışmada geliştirdiğimiz FCR-SPMB'ü FCR ile Gallik asit çözeltilerinin titrasyonunda indikatör elektrot olarak kullanıldı. 0,5 mol L⁻¹ 50,0 mL FCR çözeltisi 1,0×10⁻² mol L⁻¹ Gallik asit ile titre edildi ve 21 mL Gallik asit eklenmesi sonucu dönüm noktasına ulaşıldı. Yapılan titrasyonda beklenen hacimde dönüm noktası elde edilmiştir. Titrasyon sonucu elde edilen grafik Şekil 4.16'da görülmektedir. Titrant ilavesi ile azalan FCR konsantrasyonundan dolayı potansiyelde azalma meydana gelmiş

ve FCR tükenene kadar devam etmiştir. Titrasyonun son noktasından önce ölçülen potansiyel değerleri, eklenen tirandın miktarı ile genel olarak logaritmik bir değişim göstermiştir. Son noktadan sonra potansiyel cevabı, titre edilen FCR'nin düşük konsantrasyonundan dolayı, hemen hemen sabit kalmaktadır. Bu yüzden, son nokta ve çözeltideki FCR miktarı titrasyon eğrisinin iki doğrusal kısmının ekstrapolasyonu ile doğru bir şekilde tayin edilebileceğini göstermektedir. Titrasyon grafiğinden de görüldüğü gibi, geliştirilen FCR-SPMB'ü ile yapılan potansiyometrik titrasyonda indikatör elektrot olarak kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

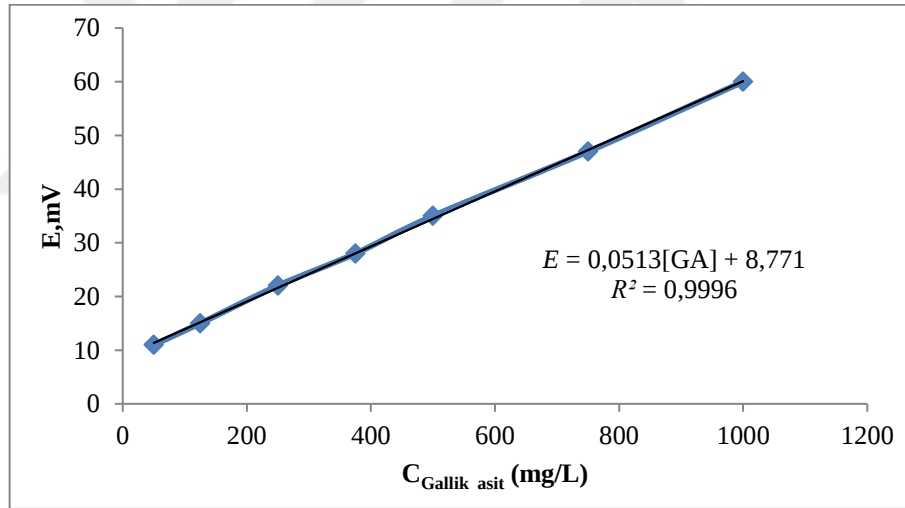


Şekil 4. 16 FCR'nin Gallik asit ile titrasyonu

4.2.6 FCR-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması

FCR-SPMB'ü gerçek bitki numunelerinde toplam fenolik bileşik miktarlarının tayini için kullanıldı. Potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektrometrik FCR-GAE test sonuçları ile karşılaştırıldı. Deneylerde üç farklı kekik türü olan *Origanum onites*, *Origanum bilgeri* ve *Thymus praecox* metanol ekstraları kullanıldı.

Spektrometre ölçümlerinde toplam fenolik bileşik miktarı test sonuçları gallik asit (mg/gr ekstrakt) eşdeğeri olarak verilmektedir. Bu nedenle bizde çalışmamızda 0,5 mol L⁻¹ FCR çözeltisine farklı derişimlerde (0,050 – 0,100 – 0,125 – 0,250 – 0,375 – 0,500 – 0,750 – 1,00 mg mL⁻¹) gallik asit çözeltisi eklenerek potansiyel değerler elde edildi. Elde edilen potansiyel değerler kullanılarak Şekil 4.17'deki FCR – gallik asit kalibrasyon grafiğı çizildi. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemi ($E = 0,0513 [GA] + 8,771$) $R^2 = 0,9996$ kullanarak FCR – gallik asit eşdeğeri (FCR-GAE) toplam fenolik bileşik miktarı hesaplandı. Sonuçlar bitki ekstraktında toplam fenolik miktarı spektrometrik analizde olduğu gibi mg/g ekstrakt olacak şekilde hesaplandı. Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerle elde edilen FCR-GAE test sonuçları çizelge 4.8'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4. 17 FCR – gallik asit kalibrasyon grafiğı

Çizelge 4. 8 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerle elde edilen FCR-GAE test sonuçları

	Spektrometrik yöntem			Potansiyometrik yöntem		
	mg GAE/g Ekstrakt	Ortalama	Std. Sapma*	mg GAE/g Ekstrakt	Ortalama	Std. sapma
<i>Thymus praecox</i>	384,03	390,86	6,13	394,00	393,93	0,07
	392,66			393,85		
	395,90			393,95		
<i>Origanum bilgeri</i>	100,32	101,76	1,65	101,92	101,52	0,48
	101,40			100,98		
	103,56			101,65		
<i>Origanum onites</i>	166,13	169,72	4,49	179,82	179,64	0,16
	168,28			179,60		
	174,76			179,50		

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 3 için verilmiştir.

Çizelge 4. 9 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerin Bağımsız Örneklem T testi sonuçları

					Ortalamanın %95 Güven Aralığı		Sig. (p)
Bitki	Yöntem	Ortalama mg GAE/g Ekstrakt	Std. Sapma*	Aralık	En Küçük	En Yüksek	
<i>Thymus praecox</i>	Spektrometrik	390,86	6,14	11,87	375,62	406,15	0,477
	Potansiyometrik	393,93	0,07	0,15	393,74	394,12	
<i>Origanum bilgeri</i>	Spektrometrik	101,76	6,13	3,24	97,66	105,86	0,818
	Potansiyometrik	101,52	0,48	0,15	100,31	102,72	
<i>Origanum onites</i>	Spektrometrik	169,72	1,64	8,63	158,56	180,88	0,062
	Potansiyometrik	179,64	0,16	0,94	179,23	180,05	

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 3 için verilmiştir.

Shapiro-wilk testi ile her bir grup için normallik incelemesi yapıldı. Sig. (p)>0,05 olduğundan normallik şartı sağlanmıştır. Bu nedenle Bağımsız Örneklem T testi kullanılarak iki yöntem ekstrakt ortalamaları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı incelenmiştir. İncelemeler sonucunda testlerin uygulamasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Sig. (p)>0.05). Ayrıca geliştirdiğimiz potansiyometrik yöntem ile bitki ekstraktlarında diğer yonteme göre daha düşük standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Hesaplarımızda elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç: önerdiğimiz yöntemdeki gözlemlerin aralığının diğer yöntemden düşük olmasıdır. Bu durum standart sapmanın önerdiğimiz potansiyometrik yöntemde daha düşük çıkmasına sebep olmuştur. Dolayısıyla önerilen yöntem daha kararlı bir yapı izlemektedir.

Sonuçlar incelendiğinde FCR-SPMB'ü ile elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca FCR-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derşimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöneme oranla daha duyarlı olduğu belirlendi. Aynı zamanda spektroskopik analizde standart sapma değeri çok yüksek elde edilmişken FCR-SPMB'ü ile kesinliği daha net ölçümler alınarak standart sapma değerlerinin çok düşük olduğu belirlendi.

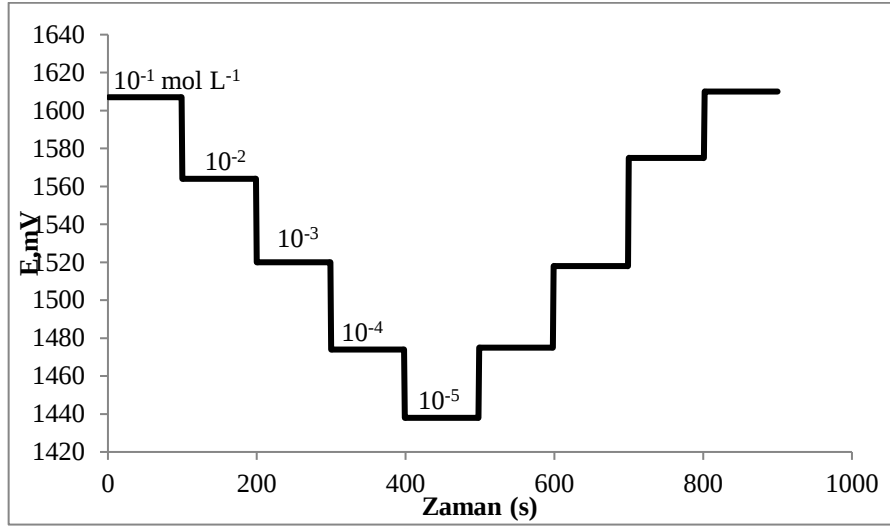
4.3 FRAP-seçici PVC Membran Biyosensörünün Potansiyometrik Davranışları

FRAP testi için geliştirilen katı–kontak PVC membran biyosensörlerin, optimum membran bileşim oranları belirlendi. Bunun için her bir bileşenin membran karışımındaki oranı değiştirilerek biyosensörlerin doğrusal çalışma aralığı, tayin limiti, korelasyon değeri (R^2) gibi özellikleri ölçüldü. Hazırlanan biyosensörlerin performans özellikleri çizelge 4.9'de ifade edilmiştir. FRAP–seçici PVC membran biyosensörün (FRAP–SPMB) optimum membran bileşim oranları % 7,0 demir(II)kuersetin, % 34,0 PVC, % 59,0 BEHS sahip 6 numaralı membran karışımı olduğu belirlendi. FRAP–SPMB'ü çözelti ortamında Fe(III) iyonuna karşı seçici davranmaktadır. Bu nedenle ölçüm mekanizması şu şekildedir. Antioksidan özelliğe sahip türlerin Fe(III) iyonunu Fe(II) iyonuna indirgemektedir ve bu etkileşim stokiometrisi dikkate alınarak numune ortamına eklenen ve miktarı bilinen Fe(III) iyonundaki konsantrasyon azalmasına bağlı olarak demir indirgeme kapasitesi ölçülmektedir.

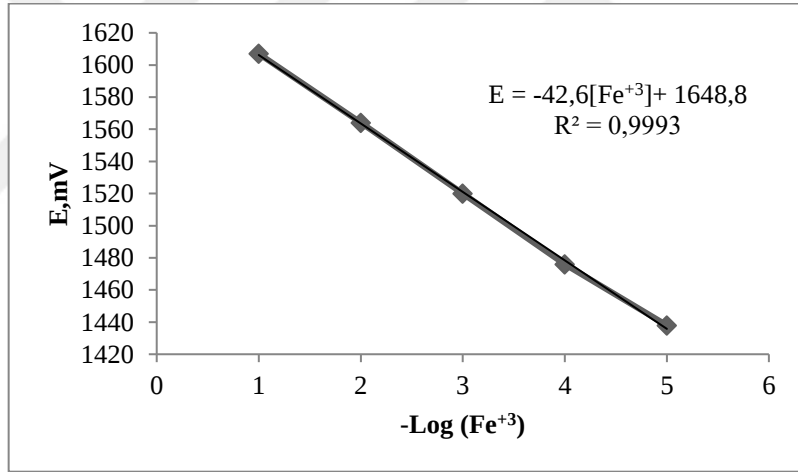
Çizelge 4. 10 FRAP-SPMB'nün % bileşim oranları ve R^2 değerleri

	Kue+Fe⁺² (mg)	PVC (mg)	DEHA (mg)	DBF (mg)	BEHS (mg)	R²
1	3.00	34.0	63		-	0.9846
2	5.00	34.0	61		-	0.9967
3	7.00	34.0	59		-	0.9933
4	3.00	34.0	-	-	63	0.9865
5	5.00	34.0			61	0.9912
6	7.00	34.0			59	0.9993
7	3.00	34.0		63	-	0.9854
8	5.00	34.0		61	-	0.9917
9	7.00	34.0		59	-	0.9982

Çalışmamızın bundan sonraki tüm aşamalarında 6 numaralı membran bileşimine sahip biyosensör kullanılarak potansiyometrik ölçümler gerçekleştirildi. FRAP-SPMB'ü ile Fe(III) çözeltisinin derişimi $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında değişen standart FeCl₃ çözeltileri kullanılarak kalibrasyon çalışması yapıldı (Şekil 4. 18). Elde edilen potansiyometrik değerler ile potansiyel (mV) – zaman (s) grafiğı oluşturuldu. Belirlenen doğru denklemi, $E = -42,6 \text{ Log}[\text{Fe}^{3+}] + 1648,8$ ve $R^2 = 0,9993$ olarak elde edildi. Potansiyometrik ölçümler sonucunda FRAP-SPMB'nün $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ arasında her on katlık derişim değişimi sonuncunda $43 \pm 1,0$ mV/derişim'lik bir potansiyel değişim sergilediğı belirlendi. Şekil 4.18'de FRAP-SPMB'nün potansiyometrik davranışı ve Şekil 4.19'de kalibrasyon eğrisi verilmiştir.



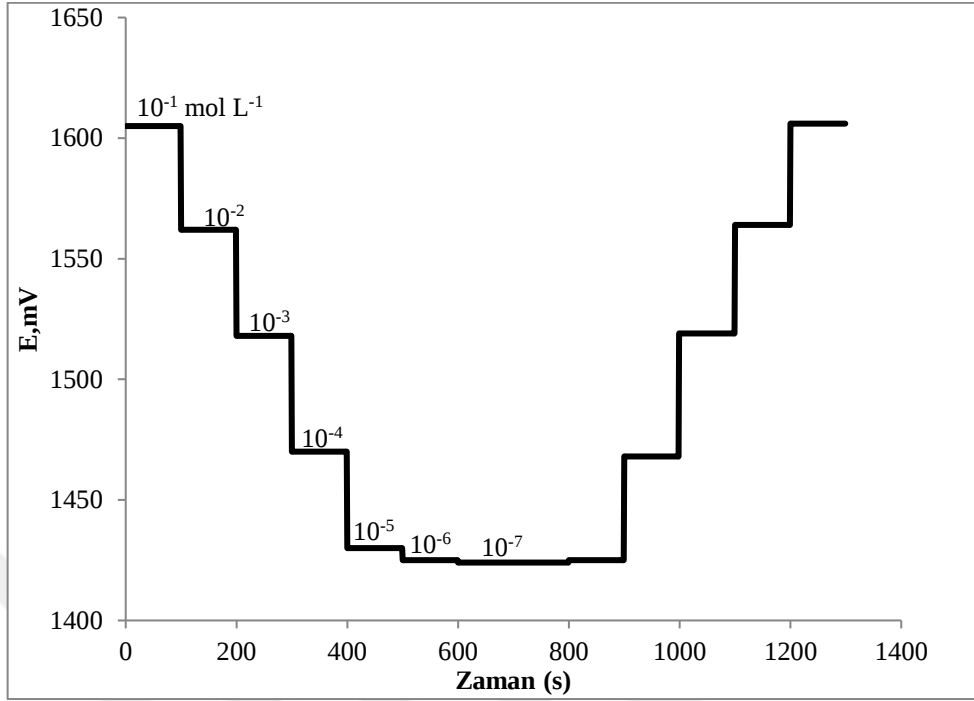
Şekil 4. 18 FRAP-SPMB'ün potansiyometrik davranışı



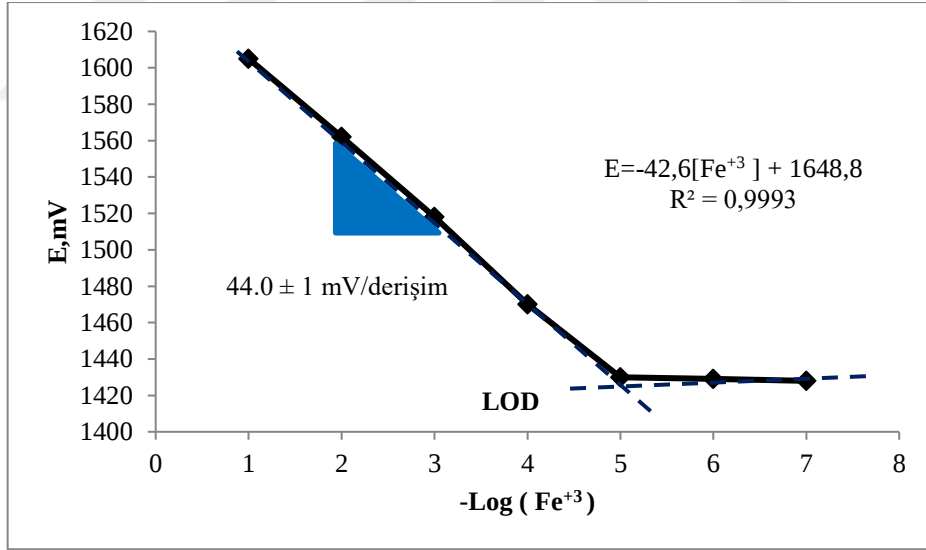
Şekil 4. 19 FRAP-SPMB'ü ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

4.3.1 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün tayin limiti

FRAP-SPMB'ün doğrusal çalışma aralığı ve tayin limiti gibi önemli potansiyometrik performans özellikleri belirlendi (Şekil 4.20). Tayin limiti grafikteki iki doğrusal eğimin kesiştiği noktaya karşılık gelen potansiyel değeri elde edilen doğru denkleminde hesaplandı ve tayin limiti $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ olarak hesaplandı.



Şekil 4. 20 FRAP-SPMB'ün tayin limiti potansiyometrik davranışı



Şekil 4. 21 FRAP-SPMB'nün tayin limiti

4.3.2 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün seçiciliği

Bitki ekstraktlarında bulunan ve antioksidan özellik göstermeyen ve girişim yapma ihtimali olan bazı organik ve inorganik türlerin varlığında FRAP-SPMB'nün cevabına etkilerini belirlemek amacıyla seçicilik katsayıları belirlendi. FRAP-

SPMB'nün seçiciliğinin belirlenmesinde ayrı çözelti metodu kullanıldı. Seçicilik çalışmaları için girişim yapan türlerin $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ derişim aralığındaki çözeltileri kullanıldı (Şekil 4.22). Ölçümlerden elde edilen veriler ile her iyonun $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ derişiminde elde edilen potansiyel değeri aşağıdaki eşitlikte (4.1) yerine yazılarak seçicilik katsayıları ($K_{A,B}^{pot}$) hesaplandı (Buck ve Lindner, 1994).

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{RT \ln 10} + \left(1 - \frac{Z_A}{Z_B}\right) \log a_A \quad (4.1)$$

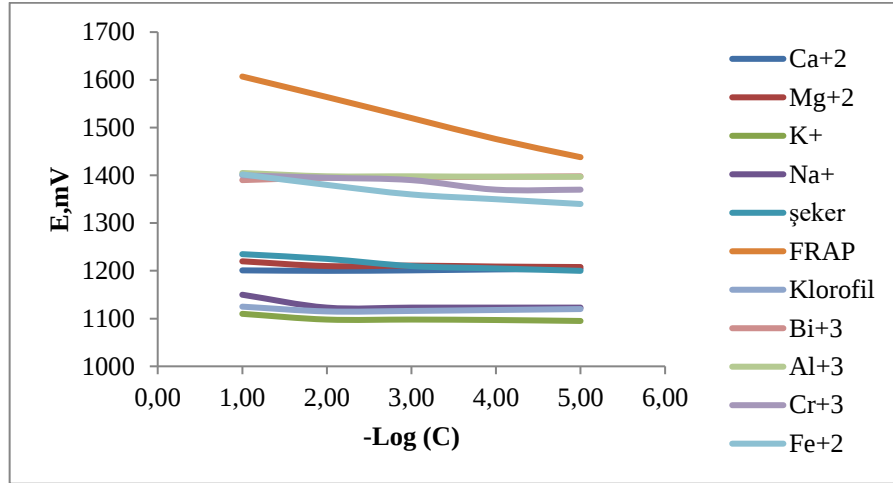
$a_A = \text{Fe}^{3+}$ iyonunun aktivitesi $a_B =$ Girişim yapan türün aktivitesi, $Z_A = \text{Fe}^{3+}$ iyonunun yükü, $Z_B =$ Girişim yapan türün yükü

Hesaplanan seçicilik katsayıları çizelge 4.10'da verilmiştir. FRAP-SPMB'ünün bitki eksraktlarında girişim yapabilecek diğer moleküllere ve farklı inorganik iyonlara göre Fe(III) iyonuna daha seçici davrandığı açıkça görülmektedir.

Çizelge 4. 11 FRAP-SPMB'nün seçicilik katsayıları

Girişim Yapan Tür	$\log K_{FRAP,j}^{pot}$	$K_{FRAP,j}^{pot}$
Mg⁺²	-6,98	$1,05 \times 10^{-7}$
K⁺	-8,88	$1,32 \times 10^{-9}$
Na⁺	-7,45	$3,55 \times 10^{-7}$
Şeker	-5,73	$1,86 \times 10^{-6}$
Klorofil	-8,59	$2,57 \times 10^{-9}$
Bi⁺³	-4,19	$6,46 \times 10^{-5}$
Al⁺³	-4,14	$7,24 \times 10^{-5}$
Cr⁺³	-4,19	$6,46 \times 10^{-5}$
Fe⁺²	-4,44	$3,63 \times 10^{-5}$

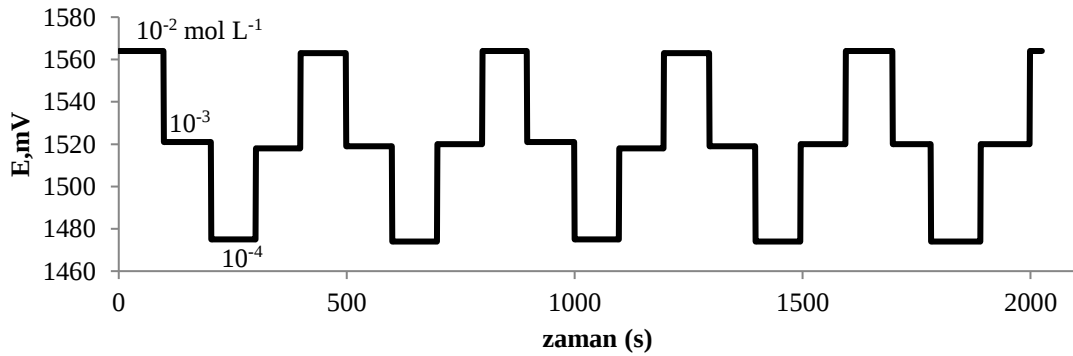
Çizelge 4.10 incelendiğinde girişim yapacak türlerin varlığında FRAP-SPMB'ü Fe(III) iyonlarına yaklaşık $10^5 - 10^8$ kat daha seçici davrandığı görülmektedir.



Şekil 4. 22 FRAP-SPMB'nün seçicilik davranışı

4.3.3 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün tekrarlanabilirliği

FRAP-SPMB'nün kararlılığını belirlemek için tekrar ölçümler alındı. Bunun için FCR-SPMB'nün tekrarlanabilirlik çalışması standart Fe(III) çözeltilerinin $1,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$ ve $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ derişimlerinde sırasıyla tekrar ölçümler alınarak yapıldı. Bir derişimden diğer bir derişim çözeltilisine geçişlerde biyosensörün yüzeyi yıkandı ve temizlenerek ölçüm yapıldı. Elde edilen veriler ile Potansiyel (mV) – zaman grafiği elde edildi. FRAP-SPMB'nün tekrarlanabilirlik grafiği Şekil 4.23'de görülmektedir.



Şekil 4. 23 FRAP-SPMB'nün tekrarlanabilirliği

Çizelge 4. 12 FRAP-SPMB'nün tekrarlanabilirlik ortalama ve standart sapma değerleri

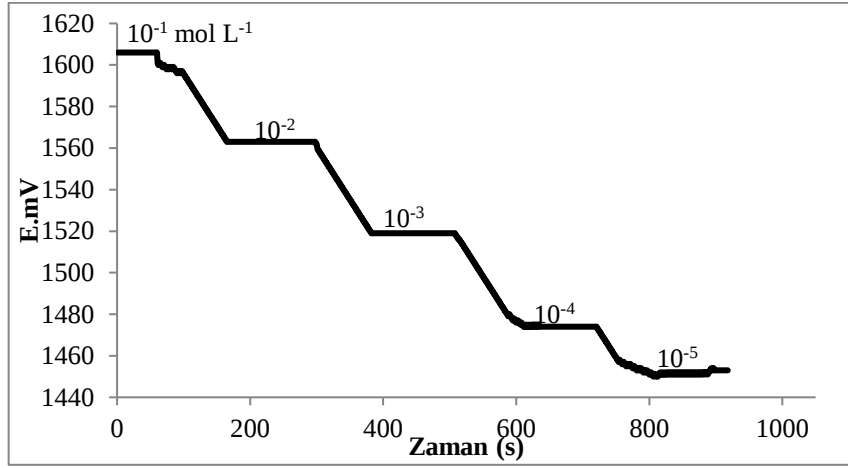
FeCl ₃ (mol L ⁻¹)	Ölçümler (mV)					
	1	2	3	4	5	$\bar{X} \pm S^*$
1,0×10⁻²	1564	1563	1564	1563	1564	1563,2±0,51
1,0×10⁻³	1521	1519	1520	1521	1520	1520,7±0,75
1,0×10⁻⁴	1475	1474	1475	1474	1474	1474,3±0,82

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 5 için verilmiştir.

FRAP-SPMB'nün tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen verilerle, çizelge 4.11'de ortalama standart sapma değerleri hesaplanarak gösterilmiştir. Çizelge 4.11'de FRAP-SPMB'nün iyi bir tekrarlanabilirlik sergilediği ve standart sapma değerlerinin az olduğu görülmektedir. FRAP-SPMB'nün membran yapısında iyonofor olarak kullandığımız kuersetin-Fe(II) kompleksi beş altı ölçümden sonra kuersetin-Fe(III) kompleksine dönüşmektedir. Bu durumda ölçümlerde elde edilen potansiyel değerler tersine dönmektedir. FRAP-SPMB'ü bu sefer Fe(II) iyonuna karşı duyarlı hale gelmektedir.

4.3.4 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün cevap zamanı

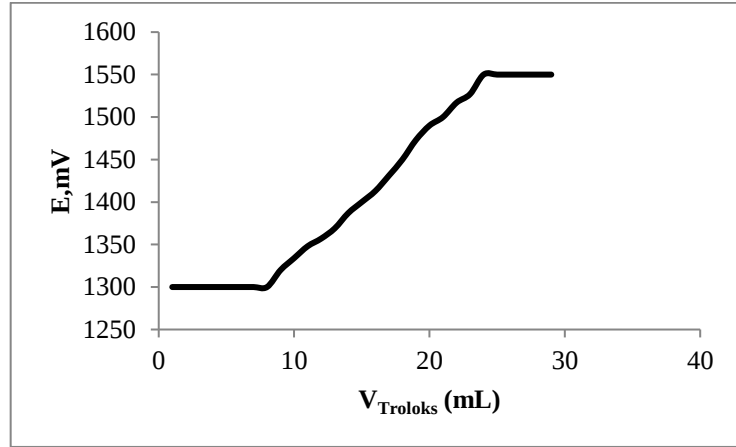
Çalışmamızda FRAP-SPMB'nün cevap zamanını belirleyebilmek için $1,0 \times 10^{-1}$ – $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ derişim aralığındaki standart FeCl₃ çözeltileri kullanıldı. Bir çözeltiden diğerine geçişlerde biyosensörün dengeye ulaşma süreleri ölçüldü. Elde edilen veriler kullanılarak Şekil 4.24'deki potansiyel (mV) – zaman grafiği elde edildi. FRAP-SPMB'ün hızlı bir şekilde dengeye geldiği ve cevap zamanının 40-45 saniye arasında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4. 24 FRAP-SPMB'nün cevap zamanı

4.3.5 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün potansiyometrik titrasyonu

Bu çalışmada geliştirdiğimiz FRAP-SPMB'ü FeCl_3 ile Troloks çözeltilerinin titrasyonunda indikatör elektrot olarak kullanıldı. $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 50,0 mL Troloks çözeltisi $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ FeCl_3 çözeltisi ile titre edildi ve 25,0 mL Fe(III) çözeltisi eklenmesi sonucu dönüm noktasına ulaşıldı. Yapılan titrasyonda beklenen hacimde dönüm noktası elde edilmiştir. Titrasyon sonucu çizilen grafik Şekil 4.25'de görülmektedir. Yaklaşık 8,0 mL titrant ilavesinden sonra artan Fe(III) konsantrasyonundan dolayı potansiyelde artma meydana gelmiş ve Troloks tükenene kadar devam etmiştir. Titrasyonun son noktasından önce ölçülen potansiyel değerleri ve eklenen titrant miktarı ile genel olarak beklenen bir değişim meydana gelmiştir. Son noktadan sonra potansiyel cevabı, eklenen titrantın $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ konsantrasyonuna ulaştığından dolayı, hemen hemen sabit kalmıştır. Bu yüzden, son nokta ve çözeltideki türlerin miktarları titrasyon eğrisinin iki doğrusal kısmının ekstrapolasyonu ile doğru bir şekilde tayin edilebileceğini göstermektedir. Titrasyon grafiğinde de görüldüğü gibi, geliştirilen FRAP-SPMB'ü ile yapılan potansiyometrik titrasyonda indikatör elektrot olarak kullanılabileceği ve FRAP'ın hesaplanabileceği anlaşılmaktadır.

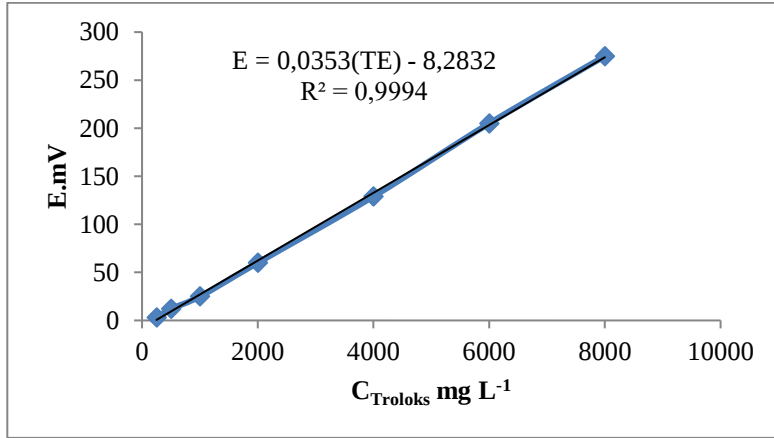


Şekil 4. 25 Troloksun Fe(III) çözeltisi ile titrasyonu

4.3.6 FRAP-seçici PVC membran biyosensörünün bitki ekstraktlarına uygulanması

FRAP-SPMB'ü gerçek bitki numunelerine uygulanarak FRAP-TE miktarı ölçüldü. Potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik FRAP-TE test sonuçları karşılaştırıldı. Deneylerde üç farklı kekik türü olan *Origanum onites*, *Origanum bilgeri* ve *Thymus praecox* metanol ekstraktları kullanıldı.

Spektrometre ölçümlerinde toplam Fe(III) indirgeme gücü test sonuçları Troloks (mg/gr ekstrakt) eşdeğeri olarak verilmektedir. Bizde çalışmamızda $8,0 \text{ mg mL}^{-1}$ Fe(III) çözeltisine farklı derişimlerde (8,0, 6,0, 4,0, 2,0, 1,0, 0,50, 0,25 mg mL^{-1}) troloks çözeltisi eklenerek potansiyel değerler elde edildi. Elde edilen potansiyel değerler kullanılarak Şekil 4.26'deki Fe(III) – troloks kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen doğru denklemi ($E = 0,0353(\text{TE}) - 8,2832$) $R^2 = 0,9994$ kullanarak Fe(III) – troloks eşdeğeri (FRAP-TE) miktarı hesaplandı. Sonuçlar bitki ekstraktında FRAP sonuçları spektrometrik analizde olduğu gibi mg/g ekstrakt olacak şekilde hesaplandı.



Şekil 4. 26 FRAP-TE miktarının kalibrasyon grafiği

Potansiyometrik ve spektroskopik FRAP-TE test sonuçları çizelge 4.12'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Sonuçlar incelediğinde FRAP-SPMB'ü ile elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Ayrıca FRAP-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derşimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöneme oranla daha hassas olduğu belirlendi. Aynı zamanda spektroskopik analizde standart sapma çok değeri çok yüksekken bizim çalışmamızda kesinliği daha net ölçümler olarak standart sapma çok düşük olduğu belirlendi.

Çizelge 4. 13 FRAP Fe(III) indirgeme gücü testi potansiyometrik ve spektroskopik yöntemlerin kıyaslanması

	Spektroskopi analizi			Potansiyometri analizi		
	µmol TE/mg eksrakt	Ortalama	std sapma*	µmol TE/mg eksrakt	Ortalama	std sapma
<i>Thymus praecox</i>	7,14	7,04	0,10	6,92	6,88	0,07
	7,04			6,81		
	6,94			6,92		
<i>Origanum bilgeri</i>	1,77	1,73	0,04	1,60	1,59	0,11
	1,72			1,48		
	1,70			1,71		
<i>Origanum onites</i>	3,39	3,49	0,10	3,18	3,14	0,07
	3,50			3,07		
	3,60			3,18		

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 3 için verilmiştir.

Çizelge 4. 14 Potansiyometrik ve spektrometrik yöntemlerin Bağımsız Örneklem T testi sonuçları

					Ortalamanın %95 Güven Aralığı		
Bitki	Yöntem	$\mu\text{mol TE/mg}$ eksrakt Ortalama	Sdt. Sapma*	Aralık	En Küçük	En Yüksek	Sig. (p)
<i>Thymus praecox</i>	Spektrometrik	7,04	0,10	0,20	6,79	7,28	0,077
	Potansiyometrik	6,88	0,06	0,11	6,72	7,03	
<i>Origanum bilgeri</i>	Spektrometrik	1,73	0,04	0,07	1,64	1,82	0,123
	Potansiyometrik	1,59	0,11	0,23	1,33	1,88	
<i>Origanum onites</i>	Spektrometrik	3,49	0,10	0,21	3,23	3,75	0,008
	Potansiyometrik	3,14	0,07	0,12	2,98	3,31	

*Ortalama ve standart sapma değerleri belirli bir aralıkta n = 3 için verilmiştir.

Shapiro-wilk testi ile her bir grup için normallik incelemesi yapıldı. Sig. (p)>0,05 olduğundan normallik şartı sağlanmıştır. Bu nedenle Bağımsız Örneklem T testi kullanılarak iki yöntem ekstrakt ortalamaları arasında anlamlı bir fark olup olmadığı incelenmiştir. İncelemeler sonucunda *Thymus praecox* ve *Origanum bilgeri* bitkileri için yöntem sonuçlarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (Sig. (p)>0.05). Ancak *Origanum onites* bitkisi için yöntem sonuçlarının ortalamaları arasında anlamlı bir fark vardır (Sig. (p)<0.008). Bu sonuca göre potansiyometrik yöntemin ölçüm ortalaması Spektrometrik yöntemin ölçüm ortalamasından daha düşük olduğundan daha kararlı sonuçların verildiği bir yöntemdir. Ayrıca geliştirdiğimiz potansiyometrik yöntem tüm bitki ekstraktlarında diğer yönteme göre daha düşük standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Hesaplarımızda elde ettiğimiz bir diğer önemli sonuç: önerdiğimiz yöntemdeki gözlemlerin aralığının diğer yöntemden düşük olmasıdır. Bu durum standart sapmanın önerilen yöntemde daha düşük çıkmasına sebep olmuştur. Dolayısıyla önerilen yöntem daha kararlı bir yapı izlemektedir.

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Antioksidan moleküllerin, hücre metabolizması sırasında üretilen serbest radikalleri, özellikle reaktif oksijen türlerini temizleyerek kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkları önleyebileceği iyi bilinmektedir. İnsanlar antioksidanların bu etkilerinden dolayı oksidasyonu azaltan veya engelleyen polifenolik bileşikler, vitaminler ve karotenoidler gibi antioksidan etkili yiyecek ve içecekleri tüketmektedirler (Bartosz, 2013; Morales-Gonzalez, 2013; Bansal ve Kaushal, 2014; Shahidi, 2015; Das ve Eun, 2016). Bu amaçla doğal ürünlerden antioksidan kapasitesi yüksek olanların tespit edilebilmesi için antioksidan aktivite testlerinin yapılması önem arz etmektedir. Literatürde antioksidan aktivite tayini için UV-Vis ve florometri gibi spektrofotometrik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (Prior ve Cao, 1999; Dávalos ve ark., 2004; Huang ve ark., 2005; Magalhães ve ark., 2008; Magalhães ve ark., 2009; Craft ve ark., 2012; Apak ve ark., 2013; López-Alarcón ve Denicola, 2013). Ancak bu yöntemlerin zaman alıcı ön işlemlerin olması ve yüksek maliyetli pahalı cihazları gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca bu yöntemler, çeşitli girişimlere yatkın olan ve bulanık çözeltilere de uygulanamamaktadır. Aksine, potansiyometrik ölçüm yöntemler pahalı aletler gerektirmez ve potansiyometrik sensörlerin basit tasarımı, kimyasal inert olması, sağlamlık, yenilenebilirlik, uygun seçicilik, hızlı yanıt süresi, renkli ve bulanık çözeltilerde uygulanabilirlik ve bilgisayarlı otomasyon sistemlere adapte edilebilmesi gibi pek çok avantajları bulunmaktadır (İbrahim ve ark., 2004; Issa ve ark., 2005; Santini ve ark., 2008; Abu-Shawish ve ark., 2011). Bitkilerin karmaşık yapılar içermesi ve antioksidan bileşiklerin birbiriyle etkileşimlerinden dolayı, maddelerin içeriğindeki antioksidan bileşiklerin özel olarak izolasyonu, tanımlanması uzun bir süreç, pahalı ve zordur. Bu yüzden araştırmacılar antioksidan etkinliğin hızlı, güvenilir biçimde ve doğrudan ölçülmesini sağlayabilecek yöntemler geliştirme arzusundadırlar. Potansiyometrik temelli ISE'ler ile çözelti ortamında doğrudan ölçümler yapılabildiğinden dolayı önem kazanmaktadır.

Önerdiğimiz bu tez çalışmasında klasik analiz yöntemlerindeki sınırlamaları elimine edecek daha ucuz, iyi çalışma aralığı olan, düşük hacimlere uygulanabilen, hızlı ve daha kararlı ölçümler alınabilen mikro boyutlarda yeni tip potansiyometrik temelli tümüyle katı-hal-kontak PVC membran biyosensörler geliştirildi. Bitki ekstraktlarında

antioksidan maddelerin varlığını tespit etmek amacıyla DPPH, FRAP ve FCR testlerinin her biri için ayrı ve seçici biyosensörler tasarlandı. Geliştirilen antioksidan–seçici biyosensör ile elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

DPPH• radikal giderme aktivite testi için; tümüyle katı kontak PVC membran potansiyometrik biyosensör geliştirildi. PVC membran yapıda iyonofor olarak Gallik asit kullanıldı. Hazırlanan biyosensörlerin potansiyometrik performans özellikleri incelendi. Performans özellikleri belirlenen DPPH-SPMB'ü ile bitki ekstraktlarında DPPH• giderme aktivite testlerinde kullanılıp kullanılamayacağı da araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre çalışmada önerilen DPPH-SPMB'ünün başarılı bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. DPPH-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik DPPH-RSA test sonuçları karşılaştırıldı. Potansiyometrik ölçümle elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmüştür. Ayrıca DPPH-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derişimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöneme oranla daha hassas olduğu bulundu. Standart DPPH• çözeltileri kullanılarak ölçülen absorban sonuçları, spektroskopi yönteminin tayin limiti (LOD) değerinin potansiyometrik yöneme göre oldukça yüksek olduğu bulunmuştur. Geliştirilen DPPH-SPMB'ü 18,75 – 300 mg L⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusal bir potansiyel değışim sergilemiş ve R² değeri 0,9984 elde edilmiştir. Tayin limitinin 15,75 mg L⁻¹ ve potansiyel farkların da yaklaşık 28,0 ± 2,0 mV/derişim olduğu bulunmuştur.

Geliştirilen DPPH-SPMB'ü üç farklı bitki ekstraktına başarılı bir şekilde uygulanmış ve DPPH• giderme aktivitelerin hesaplanması için potansiyometrik yöneme uyarlanmış yeni bir eşitlik (3.1) türetilmiştir. Bu eşitlik kullanılarak bitki ekstraktlarının DPPH• giderme aktiviteleri başarılı bir şekilde hesaplanmıştır. Sonuç olarak DPPH• giderme aktivite tayini için kolay uygulanabilir, basit, düşük maliyetli ve hassas ölçüm yapılabilen alternatif olabilecek bir metot geliştirildi. DPPH-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik DPPH-RSA test sonuçları karşılaştırıldı. Potansiyometrik ölçümle elde edilen değerlerin spektroskopik yöntem ile elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmüştür.

FCR toplam fenolik bileşik testi için; tümüyle katı kontak PVC membran potansiyometrik biyosensör geliştirildi. Spektroskopik yöntemde FCR toplam fenolik bileşik testinin temeli FCR içeriğindeki tungsten ve molibdenin indirgemesi temeline dayanmaktadır. Bizim geliştirdiğimiz potansiyometrik yöntemde de çözelti ortamında antioksidan türlerin varlığında ortamdaki FCR'yi indirgemesi ve ortamda indirgenmeden kalan FCR miktarı ölçülerek toplam fenolik bileşik miktarı tayin edilmiştir. FCR toplam fenolik bileşik testi için geliştirilen biyosensörün PVC membran yapısında iyonofor olarak yine Gallik asit kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin potansiyometrik performans özellikleri incelenmiş ve bitki ekstraktlarında FCR toplam fenolik bileşik testlerinde kullanılıp kullanılamayacağı da araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre önerilen FCR-SPMB'ünün başarılı bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. FCR-SPMB'ü ile elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Literatürde kullanılan spektroskopik yöneme kıyasla daha az kimyasal sarfiyatı, kısa reaksiyon süresi ve daha pratik uygulanabilirliği yönünden avantajları bulunmaktadır. Ayrıca FCR-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derişimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöneme oranla daha duyarlı olduğu belirlendi. Aynı zamanda spektroskopik analizde standart sapma değeri çok yüksek elde edilmişken FCR-SPMB'ü ile kesinliği daha net ölçümler alınarak standart sapma değerlerinin çok düşük olduğu belirlendi. Geliştirilen FCR-SPMB'ü ile FCR çözeltisinin derişimi 0,031 – 0,5 mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusal ve yaklaşık 50,0 ± 2,0 mV/derişim'lik bir potansiyel fark sergilemiş, tayin limiti 0,022 mol L⁻¹ ve R² değeri 0,9996 elde edilmiştir.

Geliştirilen FCR-SPMB'ü üç farklı bitki ektsraktına başarılı bir şekilde uygulanmış ve FCR toplam fenolik bileşik miktarları potansiyometrik yöntemle gallik asit eşdeğeri olarak sonuçlar hesaplanmıştır. Sonuç olarak FCR toplam fenolik bileşik tayini için kolay uygulanabilir, basit, düşük maliyetli ve hassas ölçüm yapılabilen alternatif olabilecek bir metot geliştirildi. FCR-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik FCR toplam fenolik bileşik sonuçları karşılaştırıldı. Potansiyometrik ölçümle elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmüştür.

FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi için; tümüyle katı kontak PVC membran potansiyometrik biyosensör geliştirildi. Spektroskopik yöntemde FRAP demir(III) indirgeme aktivite testinin temeli Fe(III) iyonunun Fe(II) iyonuna indirgemesine dayanmaktadır. Bizim geliştirdiğimiz potansiyometrik yöntemde de çözelti ortamında antioksidan türlerin varlığında ortamdaki Fe(III) iyonunu Fe(II) iyonuna indirgemesi sonucu ortamda indirgenmeden kalan Fe(III) iyon aktivitesi ölçülerek demir(III) indirgenme aktivitesi değerlendirilmiştir. FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi için geliştirilen biyosensörün PVC membran yapısında iyonofor olarak kuersetin-demir(II) kompleksi kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörlerin potansiyometrik performans özellikleri incelenmiş ve bitki ekstraktlarında FRAP demir(III) indirgeme aktivite tayininde kullanılıp kullanılamayacağı da araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre önerilen FRAP-SPMB'ünün başarılı bir şekilde kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. FRAP-SPMB'ü ile elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmektedir. Literatürde kullanılan spektroskopik yöntemle kıyasla daha az kimyasal sarfıyatı, kısa reaksiyon süresi ve daha pratik uygulanabilirliği yönünden avantajları bulunmaktadır. Ayrıca FRAP-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak çok daha düşük derişimlerde ölçüm alınabildiğinden dolayı spektroskopik yöntemle oranla daha duyarlı olduğu belirlendi. Aynı zamanda spektroskopik analizde standart sapma değeri çok yüksek elde edilmişken FRAP-SPMB'ü ile kesinliği daha net ölçümler alınarak standart sapma değerlerinin çok düşük olduğu belirlendi. Geliştirilen FRAP-SPMB'ü ile Fe(III) çözeltisinin derişimi $1,0 \times 10^{-1} - 1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ konsantrasyon aralığında doğrusal ve yaklaşık 43 ± 1 mV/derişim'lik bir potansiyel fark sergilemiş, tayin limiti $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ve R^2 değeri 0,9993 elde edilmiştir.

Geliştirilen FRAP-SPMB'ü üç farklı bitki ekstraktına başarılı bir şekilde uygulanmış ve FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi potansiyometrik yöntemle troloks eşdeğeri olarak sonuçlar hesaplanmıştır. Sonuç olarak FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi için kolay uygulanabilir, basit, düşük maliyetli ve hassas ölçüm yapılabilen alternatif olabilecek bir metot geliştirildi. FRAP-SPMB'ü ile potansiyometrik olarak elde edilen sonuçlar ile literatürde kullanılan spektroskopik FRAP demir(III) indirgeme aktivite testi sonuçları karşılaştırıldı. Potansiyometrik

ölçümle elde edilen değerlerin spektroskopik yöntemde elde edilen değerlerle uyum içinde olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışmamızda DPPH• giderme aktivite, FCR toplam fenolik bileşik ve FRAP demir(III) indirgeme aktivite testleri için potansiyometrik temelli biyosensörler geliştirildi ve literatüre yeni alternatif antioksidan aktivite tayin yöntemleri kazandırılmış oldu. Geliştirilen antioksidan-seçici biyosensörler kolay tasarım edilmesinin yanı sıra, ekonomik, hızlı cevap zamanı, seçici, tayin limitleri düşük ve tekrarlanabilir sonuçlar sergilemektedir. Ayrıca pahalı, daha fazla zaman, deneyimli personel, pahalı ölçüm sistemleri ve laboratuvar koşulları gerektiren karmaşık ölçüm tekniklerine göre önerilen yöntemlerin daha kolay uygulanabilir avantajlara ve alternatif olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Çalışmada önerilen yöntemlerin literatüre önemli bir katkı sağlayacağı açıktır.

6 KAYNAKLAR

- Abu-Shawish, H. M., N. Abu Ghalwa, G. I. Khraish, J. Hammad, 2011. A new potentiometric sensor for determination of pethidine hydrochloride in ampoules and urine. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(01).
- Ali, S. S., N. Kasoju, A. Luthra, A. Singh, H. Sharanabasava, A. Sahu, U. Bora, 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food research international*, 41(1), 1-15.
- Altiner, A., H. Atalay, T. Bilal, 2017. Bir antioksidan olarak E vitamini. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(3), 149-157.
- Apak, R., S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü, 2013. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.
- Arteaga, J. F., M. Ruiz-Montoya, A. Palma, G. Alonso-Garrido, S. Pintado, J. M. Rodríguez-Mellado, 2012. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules*, 17(5), 5126-5138.
- Atan, Ç., 2013. ZnO nanorod temelli glukoz biyosensörü hazırlanması ve kan serumunda glukoz tayininde kullanılması.
- Bansal, M., N. Kaushal 2014. *Oxidative stress mechanisms and their modulation* Springer.
- Bartosz, G. 2013. *Food oxidants and antioxidants: chemical, biological, and functional properties* CRC press.
- Benavente-Garcia, O., J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuño, J. Del Rio, 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food chemistry*, 68(4), 457-462.
- Bensaci, C., Z. Ghiaba, M. Dakmouche, A. Belfar, M. Belguidoum, F. Z. Bentebba, M. Saidi, M. Hadjadj, 2021. In Vitro Evaluation of Antioxidant Potential of Date Palm Collected in Algeria using Electrochemical and Spectrophotometrical Techniques. *Korean Chemical Engineering Research*, 59(2), 153-158.
- Benzie, I. F., M. Devaki, 2018. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: Concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications* Wiley, New York, 11 77-106.
- Blasco, A. J., M. a. C. González, A. Escarpa, 2004. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), 71-81.
- Brainina, K. Z., A. Ivanova, E. Sharafutdinova, E. Lozovskaya, E. Shkarina, 2007. Potentiometry as a method of antioxidant activity investigation. *Talanta*, 71(1), 13-18.
- Brainina, Z., E. L. Gerasimova, D. P. Varzakova, S. L. Balezin, I. G. Portnov, V. A. Makutina, E. V. Tyrchaninova, 2012. Potentiometric method for evaluating the oxidant/antioxidant activity of seminal and follicular fluids and clinical

- significance of this parameter for human reproductive function. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, 5(1).
- Buck, R. P., E. Lindner, 1994. Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, 66(12), 2527-2536.
- Buratti, S., N. Pellegrini, O. V. Brenna, S. Mannino, 2001. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5136-5141.
- Carocho, M., I. C. Ferreira, 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51 15-25.
- Chesney, D. J. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Edited by Peter T. Kissinger (Purdue University) and William R. Heineman (University of Cincinnati). Dekker: Monticello, NY. 1996. xxii+ 986 pp. \$79. ISBN 0-8247-9445-1, ACS Publications.
- Childs, A., C. Jacobs, T. Kaminski, B. Halliwell, C. Leeuwenburgh, 2001. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(6), 745-753.
- Clark Jr, L. C., C. Lyons, 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45.
- Craft, B. D., A. L. Kerrihard, R. Amarowicz, R. B. Pegg, 2012. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 148-173.
- Cremer, M. 1906. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten. R. Oldenbourg.
- Çökeliler, D. 2006. Aflatoksin tayini için plazma polimerizasyon yöntemi ile kütle hassas immünosensör hazırlanması, doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi
- Das, P., J. Eun, 2016. Phenolic Acids: Properties, food sources and health effects. *Phenolic acids in tea and coffee and their health benefits* 129-194.
- Dávalos, A., C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC– fluorescein) assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(1), 48-54.
- de Araújo Rodrigues, I., S. M. Gomes, I. P. G. Fernandes, A. M. Oliveira-Brett, 2019. Phenolic Composition and Total Antioxidant Capacity by Electrochemical, Spectrophotometric and HPLC-EC Evaluation in Portuguese Red and White Wines. *Electroanalysis*, 31(5), 936-945.
- de Queiroz Ferreira, R., L. A. Avaca, 2008. Electrochemical determination of the antioxidant capacity: the ceric reducing/antioxidant capacity (CRAC) assay. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 20(12), 1323-1329.
- Draghi, P. F., J. C. B. Fernandes, 2017. Label-free potentiometric biosensor based on solid-contact for determination of total phenols in honey and propolis. *Talanta*, 164 413-417.

- El-Kosasy, M., L. Hussien, M. Abdel-Rahman, 2013. New approach for measuring antioxidant activity via graphite sensor. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(9), 71.
- Elbehery, N. H., A. E.-G. E. Amr, A. H. Kamel, E. A. Elsayed, S. S. Hassan, 2019. Novel potentiometric 2, 6-dichlorophenolindo-phenolate (dcpip) membrane-based sensors: Assessment of their input in the determination of total phenolics and ascorbic acid in beverages. *Sensors*, 19(9), 2058.
- Elmastas, M., S. M. Celik, N. Genc, H. Aksit, R. Erenler, İ. Gulcin, 2018. Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea—*Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *International journal of food properties*, 21(1), 374-384.
- Ghiaba, Z., M. Yousfi, M. Hadjadj, M. Saidi, 2014. Study of antioxidant properties of five Algerian date (*Phoenix dactylifera* L) cultivars by cyclic voltammetric technique.
- Gil, D. M., M. J. Rebelo, 2010. Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach. *European Food Research and Technology*, 231(2), 303-308.
- Gooding, J. J., 2006. Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends. *Analytica chimica acta*, 559(2), 137-151.
- Halliwell, B., 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 107-112.
- Huang, D., B. Ou, R. L. Prior, 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Ibrahim, H., Y. Issa, H. M. Abu-Shawish, 2004. Chemically modified carbon paste electrode for the potentiometric determination of dicylomine hydrochloride in batch and in FIA conditions. *Analytical sciences*, 20(6), 911-916.
- Ignatov, S., D. Shishniashvili, B. Ge, F. W. Scheller, F. Lisdat, 2002. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(3), 191-199.
- Isildak, Ö., O. Özbek, 2020. Application of potentiometric sensors in real samples. *Critical reviews in analytical chemistry* 1-14.
- Isildak, Ö., O. Özbek, K. M. Yigit, 2019. Zinc (II)-selective PVC membrane potentiometric sensor for analysis of Zn^{2+} in drug sample and different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 1-11.
- Isildak, Ö., I. Yildiz, N. Genc, 2022. A new Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of DPPH Radical Scavenging Activity of plant extracts. *Food Chemistry* 131420.
- Issa, Y. M., H. Ibrahim, H. M. Abu-Shawish, 2005. Carbon paste electrode for the potentiometric flow injection analysis of drotaverine hydrochloride in serum and urine. *Microchimica Acta*, 150(1), 47-54.
- İŞILDAK, İ., 2000. All solid-state contact lead (II) ion-selective PVC membrane electrode using dimethylene bis (4-methylpiperidinedithiocarbamate) neutral ionophore. *Turkish Journal of Chemistry*, 24(4), 389-394.
- Ivanova, A., E. Gerasimova, K. Z. Brainina, 2015. Potentiometric study of antioxidant activity: development and prospects. *Critical reviews in analytical chemistry*, 45(4), 311-322.

- Jiang, L., X. Li, D. Wang, 2017. Development of a Rapid Method for the Evaluation of DPPH Radical Scavenging Activity of Ginger (*Zingiber officinale*) Foods Based on Cyclic Voltammetry. *Food Analytical Methods*, 10(5), 1419-1429.
- Johnson, R. D., L. G. Bachas, 2003. Ionophore-based ion-selective potentiometric and optical sensors. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 376(3), 328-341.
- Kim, J. W., J. K. No, Y. Ikeno, B. P. Yu, J. S. Choi, T. Yokozawa, H. Y. Chung, 2002. Age-related changes in redox status of rat serum. *Archives of gerontology and geriatrics*, 34(1), 9-17.
- Laguerre, M., J. Lecomte, P. Villeneuve, 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.
- Le Bourvellec, C., D. Hauchard, A. Darchen, J.-L. Burgot, M.-L. Abasq, 2008. Validation of a new method using the reactivity of electrogenerated superoxide radical in the antioxidant capacity determination of flavonoids. *Talanta*, 75(4), 1098-1103.
- López-Alarcón, C., A. Denicola, 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica chimica acta*, 763 1-10.
- Lussignoli, S., M. Fraccaroli, G. Andrioli, G. Brocco, P. Bellavite, 1999. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry*, 269(1), 38-44.
- Magalhães, L. M., M. Santos, M. A. Segundo, S. Reis, J. L. Lima, 2009. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77(5), 1559-1566.
- Magalhães, L. M., M. A. Segundo, S. Reis, J. L. Lima, 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1-19.
- Makris, D. P., J. T. Rossiter, 2002. Hydroxyl free radical-mediated oxidative degradation of quercetin and morin: a preliminary investigation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(1), 103-113.
- Maslov, O. Y., S. Kolisnyk, N. Komissarenko, T. Kostina, 2021. DEVELOPMENT AND VALIDATION POTENTIOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EPIGALLOCATECHIN-3-O-GALLATE. *DEVELOPMENT*, 2 35-42.
- Mello, L. D., S. Hernandez, G. Marrazza, M. Mascini, L. T. Kubota, 2006. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1374-1382.
- Mello, L. D., L. T. Kubota, 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food chemistry*, 77(2), 237-256.
- Morales-Gonzalez, J. A. 2013. Oxidative stress and chronic degenerative diseases: A role for antioxidants. *BoD—Books on Demand*.
- Nguyen, H. H., S. H. Lee, U. J. Lee, C. D. Fermin, M. Kim, 2019. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.
- OKAN, O. T., H. VARLIBAŞ, Ö. Mehmet, İ. DENİZ, 2013. Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 13(1), 48-59.

- Okan, O. T., H. Varlıbaş, Ö. Mehmet, İ. DENİZ, 2013. Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 13(1), 48-59.
- Oliveira-Neto, J. R., S. G. Rezende, C. de Fátima Reis, S. R. Benjamin, M. L. Rocha, E. de Souza Gil, 2016. Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190 506-512.
- Ou, B., D. Huang, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, E. K. Deemer, 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- Özbek, O., Ö. Isildak, 2021. Polymer-based cadmium (II)-selective potentiometric sensors for the analysis of Cd²⁺ in different environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 1-14.
- Özbek, O., Ö. Isildak, I. Isildak, 2021. A potentiometric biosensor for the determination of valproic acid: Human blood-based study of an anti-epileptic drug. *Biochemical Engineering Journal*, 176 108181.
- Özbek, O., Ö. İŞILDAK, 2021. All-solid-state poly (vinyl chloride) membrane thiocyanate-selective potentiometric electrode. *Journal of New Results in Science*, 10(2), 33-39.
- Pisoschi, A. M., A. Pop, G. P. Negulescu, A. Pisoschi, 2011. Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules*, 16(2), 1349-1365.
- Pohanka, M., 2018. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. *Materials*, 11(3), 448.
- Prior, R. L., G. Cao, 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods1. *Free radical biology and medicine*, 27(11-12), 1173-1181.
- Prior, R. L., X. Wu, K. Schaich, 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Rodríguez-Delgado, M. M., G. S. Alemán-Nava, J. M. Rodríguez-Delgado, G. Dieck-Assad, S. O. Martínez-Chapa, D. Barceló, R. Parra, 2015. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74 21-45.
- Santini, A., H. R. Pezza, J. De Oliveira, L. Pezza, 2008. Development of a potentiometric flufenamate ISE and its application to pharmaceutical and clinical analyses. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 19(1), 162-168.
- Scott, A. O., 1998. Biosensors for food analysis.
- Šeruga, M., I. Novak, L. Jakobek, 2011. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208-1216.
- Shahidi, F. 2015. *Handbook of antioxidants for food preservation* Woodhead Publishing.
- Shpigun, L. K., M. A. Arharova, K. Z. Brainina, A. V. Ivanova, 2006. Flow injection potentiometric determination of total antioxidant activity of plant extracts. *Analytica chimica acta*, 573 419-426.

- Shul'ga, A., A. Soldatkin, A. El'skaya, S. Dzyadevich, S. Patskovsky, V. Strikha, 1994. Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(3), 217-223.
- Simić, A., D. Manojlović, D. Šegan, M. Todorović, 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327-2340.
- Simone, C. B., 1992. *Free Radicals in Cancer and Nutrition*. Simone Health Series New York: Elsevier Science Publishing Company Inc 146-149.
- Skoog, D. A., J. J. Leary 1996. *Potentiometrische Methoden*. Instrumentelle Analytik, Springer: 528-557.
- Sun, Z., Y. Zhang, X. Xu, M. Wang, L. Kou, 2019. Determination of the Total Phenolic Content in Wine Samples Using Potentiometric Method Based on Permanganate Ion as an Indicator. *Molecules*, 24(18), 3279.
- Timina, D., M. Borisova, E. Gazizullina, E. Gerasimova, A. Ivanova, 2019. Potentiometric method for investigation the antioxidant capacity of food and pharmacy objects. *AIP Conference Proceedings*.
- Topcu, C., F. Coldur, M. Andac, I. Isildak, N. Senyuz, H. Bati, 2011. Ag⁺-selective poly (vinyl chloride) Membrane Electrode Based on [N, N'-ethylenebis-(3-methoxy salicylaldehyde)]. *Current Analytical Chemistry*, 7(2), 136-145.
- Tüylek, Z., 2021. *Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları*. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(3), 468-490.
- Umezawa, Y., P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, 2000. Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. Inorganic cations (technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 72(10), 1851-2082.
- Van der Voort, D., C. McNeil, R. Renneberg, J. Korf, W. Hermens, J. Glatz, 2005. Biosensors: basic features and application for fatty acid-binding protein, an early plasma marker of myocardial injury. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 105(1), 50-59.
- Wang, A., 2006. Advertising engagement: A driver of message involvement on message effects. *Journal of Advertising Research*, 46(4), 355-368.

ÖZGEÇMİŞ

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. *Origanum Solymicum* P.H. Davis, *Origanum Husnucan-Basari*, *Origanum Bilgeri* P.H. Davis., *Origanum Rotundifolium* Boiss., *Origanum Onites* L., *Origanum Cyriacum* L. Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Kontrollü İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması Ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi. 1001-TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 22/05/2015-01/01/2016
2. *Cynanchum Acutum* L. Subsp. *Sibiricum* (Wild) Kech. F Bitkisindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi, 1002-TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 01/04/2014-01/04/2015

1. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Isildak, Ö., **Yildiz, I.**, & Genc, N. (2022). A new Potentiometric PVC membrane sensor for the determination of DPPH Radical Scavenging Activity of plant extracts. *Food Chemistry*, 131420.
2. **Yildiz, I.**, Sen, O., Erenler, R., Demirtas, I., & Behcet, L. (2017). Bioactivity-guided isolation of flavonoids from *Cynanchum acutum* L. subsp. *sibiricum* (willd.) Rech. f. and investigation of their antiproliferative activity. *Natural product research*, 31(22), 2629-2633.
3. Gecer, E. N., Erenler, R., Temiz, C., Genc, N., & **Yildiz, I.** (2021). Green synthesis of silver nanoparticles from *Echinacea purpurea* (L.) Moench with antioxidant profile. *Particulate Science and Technology*, 1-8.
4. Boulechfar, S., Zellagui, A., Asan-Ozusaglam, M., Bensouici, C., Erenler, R., **Yildiz, I.**, & Demirtas, I. (2021). Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of two essential oils from Algerian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C*.
5. Genc, N., **Yildiz, I.**, Chaoui, R., Erenler, R., Temiz, C., & Elmastas, M. (2020). Biosynthesis, characterization and antioxidant activity of oleuropein-mediated silver nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 51(3), 411-419.
6. Karan, T., **Yildiz, I.**, Aydin, A., & Erenler, R. (2018). Inhibition of various cancer cells proliferation of bornyl acetate and essential oil from *Inula graveolens* (Linnaeus) Desf. *Records of Natural Products*, 12(3).

7. Erenler, R., Sen, O., **Yildiz, I.**, & Aydin, A. (2016). Antiproliferative activities of chemical constituents isolated from *Thymus praecox subsp grossheimii* (Ronniger) Jasas. *Records of Natural Products*, 10(6), 766-770.
8. Karan, T., Simsek, S., **Yildiz, I.**, & Erenler, R. (2018). Chemical composition and insecticidal activity of Origanum syriacum L. essential oil against Sitophilus oryzae and Rhyzopertha dominica. *International Journal of Secondary Metabolite*, 5(2), 87-93.
9. Erenler, R., Tugba, A. D. A. K., Karan, T., Elmastas, M., **Yildiz, I.**, Aksit, H., ... & Sanda, M. A. (2017). Chemical constituents isolated from Origanum solymicum with antioxidant activities. *The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics*, (1), 139-145.
10. Erenler, R., Temiz, C., **Yildiz, I.**, Yanar, Y., & Ozyigit, C. (2021). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles from Tagetes erecta flowers. *JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS*, 23(9-10), 503-507.

2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında(proceedings) basılan bildiriler :

1. Erenler Ramazan, Adak Tuğba, Karan Tunay, Elmastaş Mahfuz, **Yıldız İlyas**, Şanda Murad Aydın (2017). Chemical Constituents Isolated From Origanum Solymicum With Antioxidant Activities. ICONTES2017: International Conference on Technology, Engineering and Science (Tam Metin Bildiri) (Yayın No:4019182)
2. Erenler Ramazan, Karan Tunay, Genç Nusret, **Yıldız İlyas**, Işıldak Ömer, Elmastaş Mahfuz (2018). Antioxidant Activity of Origanum vulgare. 6. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi (Özet Bildiri) (Yayın No:4636065)
3. Erenler Ramazan, **Yildiz İlyas**, Tünay Karan, Aydın Ali (2017). Anti-tumor Effect of Essential Oil from Inula graveolens (Linnaeus) Desf. on Human Cervical Carcinoma HeLa cells. 3rd International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies (ITWCCST 2017) (Özet Bildiri) (Yayın No:3744423)
4. Erenler Ramazan, Elmastaş Mahfuz, Şen Özkan, İsnaç Beşir, Akşit Hüseyin, **Yıldız İlyas**, Telci İsa, Topçu Gülaçtı (2014). Antioxidant Activities of Chemical Constituents Isolated From Some Origanum Species. BIT's 5th Annual International Congress of Medichem-2014 (ICM-2014) (Özet Bildiri) (Yayın No:1256901)
5. Erenler Ramazan, Şen Özkan, Akşit Hüseyin, **Yıldız İlyas**, Elmastaş Mahfuz, Demirtaş İbrahim (2014). Antioxidant Activities of Chemical Constituents

Isolated from *Origanum syriacum* L. BIT's 5th Annual International Congress of Medichem-2014 (ICM-2014) (Özet Bildiri) (Yayın No:1256905)

3.Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. **YILDIZ İLYAS**, ŞEN ÖZKAN, ERENLER RAMAZAN (2015). *Cynanchum acutum* L Subsp *Sibiricum* wild Kech F bitkisinden sekonder metabolitlerin izolasyonu. 15. Kromatografi Kongresi, Uşak (Özet Bildiri) (Yayın No:1814611)
2. ŞEN ÖZKAN, **YILDIZ İLYAS**, ERENLER RAMAZAN *Thymus praecox* subsp *grossheimii* Ronniger Jalas Bitkisinden Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu. KROMATOĞRAFİ 2015 (Özet Bildiri) (Yayın No:2532592)
3. **İlyas YILDIZ** (Proje Yöneticisi) Ömer IŞILDAK Ramazan ERENLER Rosmarinik Asit Tayini İçin Biyosensör Geliştirilmesi Bartın Biyomedikal / Biyoteknoloji Bartın Üniversitesi II. Ar-Ge Proje Pazarı, 10-11 Mayıs 2018,
4. **İlyas YILDIZ** (Proje Yöneticisi) Ömer IŞILDAK Ramazan ERENLER 1-8-Bis[2-(4-antipriliminometin) fenoksi]-3-oksaoktan İyonofor Olarak Kullanıldığı Potansiyometrik Temelli Hg(II) PVC Membran Sensörü, Yıldız Teknik Üniversitesi Davutpaşa Kampüsü, 10-13 EYLÜL 2019, İSTANBUL