



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SPEKTROFOTOMETRİK HOMOSİSTEİN TAYİNİ**

**Dilek SAĞDIÇ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya ProgramıProgramı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Esmâ TÜTEM**

**Haziran, 2004**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SPEKTROFOTOMETRİK HOMOSİSTEİN TAYİNİ**

**Dilek SAĞDIÇ**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya ProgramıProgramı**

**Danışman**

**Prof.Dr. Esmâ TÜTEM**

**Haziran, 2004**

**İSTANBUL**



Bu çalışma ....../...../ 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından .....  
Anabilim Dalı ..... programında Doktora / Yüksek Lisans Tezi olarak  
kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman Adı (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı  
Üniversite  
Fakülte

Jüri Adı  
Üniversite  
Fakülte

Jüri Adı  
Üniversite  
Fakülte

Jüri Adı  
Üniversite  
Fakülte

## **ÖNSÖZ**

“Spektrofotometrik Homosistein Tayini” isimli tez çalışmamın konusunu belirleyen, Yüksek Lisans tezimin hazırlanması sırasında çalışmalarımı yönlendiren, büyük ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Esmâ TÜTEM’e teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında karşılaştığım her türlü zorlukta yardımını esirgemeyen ve destek olan Analitik Kimya Anabilim Dalındaki hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca T-414/08032004 nolu proje ile tezime destek sağlayan İ.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği’ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

**Haziran, 2004**

**Dilek SAĞDIÇ**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER .....	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
TABLO LİSTESİ .....	VII
SEMBOL LİSTESİ .....	VIII
ÖZET.....	IX
SUMMARY .....	X
<b>I. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>II. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>3</b>
II.1. HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI.....	3
II.2. HOMOSİSTEİN TAYİN YÖNTEMLERİ .....	8
KAYNAK .....	10
II.2.1. Doğrudan Tayin Yöntemleri.....	11
II.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Homosistein Tayinleri .....	12
II.2.2.1. Spektrofotometrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler .....	12
II.2.2.2. Florimetrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler .....	13
II.2.2.3. Elektrokimyasal Dedeksiyonla Yapılan Tayinler.....	19
II.2.3. Gaz Kromatografisi (GC) ile Homosistein Tayinleri.....	20
II.2.4. Kapiler Elektroferez (CE) ile Homosistein Tayinleri.....	22
II.2.4.1. Spektrofotometrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler .....	22
II.2.4.2. Lazer Floresans Dedeksiyonla Yapılan Tayinler.....	23
II.2.4.3. Elektrokimyasal Dedeksiyonla Yapılan Tayinler.....	24
II.2.5. İmmünolojik Yöntemler ile Homosistein Tayini.....	24
II.3. TÜREV SPEKTROFOROMETRİSİ .....	25
II.3.1. Türev Spektrumları.....	26
II.3.1.1. Kantitatif Analizler İçin Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi .....	30
<b>III. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>32</b>

### III

III.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER .....	32
III.2. KİMYASAL MADDELER .....	32
III.3. HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER .....	32
III.4. YAPILAN DENEMELER .....	33
III.4.1. Türevlendirme İçin Uygun pH'nın Belirlenmesi .....	33
III.4.2. Uygun Tampon Çözeltinin Belirlenmesi .....	34
III.4.3. hCys-OPA Türevinin Molar Bileşiminin ve Uygun OPA Miktarının Belirlenmesi .....	34
III.4.3.1. Job Yöntemi .....	34
III.4.3.2. Mol Oranı Yöntemi .....	34
III.4.4. hCys, Cys ve met-OPA Türevlerinin Kararlılıklarının Belirlenmesi .....	35
III.4.5. hCys, Cys ve met için Çalışma Grafiklerinin Çizilmesi .....	35
III.4.6. hCys, Cys ve met Tayinlerinin % Rölatif Standart Sapma Değerleri .....	36
III.4.7. hCys, Cys ve met Tayinlerinin LOD ve LOQ Değerlerinin Belirlenmesi .....	36
III.4.8. Bazı Amino Asitlerin Bozucu Girişim Etkilerinin İncelenmesi .....	36
III.4.9. Geliştirilen Yöntemin Sentetik Karışıma Uygulanması .....	36
III.4.10 Geliştirilen Yöntemin Plazmaya Uygulanması .....	37
<b>IV. BULGULAR.....</b>	<b>38</b>
IV.1. HCYS-, CYS-, MET-OPA TÜREVLERİNİN NORMAL, 1. VE 2. TÜREV SPEKTRUMLARI .....	38
IV.2. TÜREV SPEKTRUMLARINDA UYGUN $\Delta\lambda$ DEĞERİNİN SAPTANMASI .....	39
IV.3.1. TÜREVLENDİRME İÇİN UYGUN PH VE TAMPONUN BELİRLENMESİ .....	40
IV.4. HCYS-OPA TÜREVİNİN MOLAR BİLEŞİMİNİN VE UYGUN OPA MİKTARININ BELİRLENMESİ .....	40
IV.4.1. Job Yöntemi .....	40
IV.4.2. Mol Oranı Yöntemi .....	41
IV.4.3. Önerilen reaksiyon mekanizması .....	42
IV.5. HCYS, CYS VE MET-OPA TÜREVLERİNİN KARALILIKLARININ BELİRLENMESİ .....	43
IV.6. HCYS, CYS VE MET İÇİN ÇALIŞMA GRAFİKLERİNİN ÇİZİLMESİ .....	43
IV.7. HCYS, CYS VE MET TAYİNLERİNİN % RÖLATİF STANDART SAPMA DEĞERLERİ .....	54
IV.8. HCYS, CYS VE MET TAYİNLERİNİN LOD VE LOQ DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ .....	55
IV.9 BAZI AMINO ASİTLERİN BOZUCU GİRİŞİM ETKİLERİNİN İNCELENMESİ .....	56

IV.10. GELİSTİRİLEN YÖNTEMİN SENTETİK KARISIMA UYGULANMASI.....	57
IV.11. GELİSTİRİLEN YÖNTEMİN PLAZMAYA UYGULANMASI .....	57
<b>V . TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>XV</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil II.1 Homosistein metabolizması.....	4
Şekil II.2 Metabolizmada homosisteinin bulunuş şekilleri.....	5
Şekil II.3 Plazmada toplam homosistein tayin prensipleri.....	9
Şekil II.4 DEPD'nin tiyollerle verdiği genel reaksiyon.....	11
Şekil II.5 hCys'nin CMPI ile türevlendirilme reaksiyonu.....	12
Şekil II.6 73.7 nmol/mL Cys ve 24.3 nmol/mL hCys'ne ait 312 nm'deki kromatogram.....	13
Şekil II.7 SBD-F / FD yöntemi ile tayin edilen homosistein (hCys), sistein (Cys) ve sisteinilglisin (CysGly)'e ait kromatogram (a: 6.2 ve b:18.2 µM homosistein.).....	15
Şekil II.8 mBrB'in yapısı ve hCys ile türevlenme reaksiyonu.....	16
Şekil II.9 mBrB ile türevlendirilmiş Hcy, Cys ve GSH'un RP-HPLC / FD yöntemi ile tayinine ait kromatogram. 196.8 nmol/mL Cys için 2.98 dk, 8.4 nmol/mL Hcy için 5.10 dk ve 6.3 nmol/mL için 5.43 dk . FL: 300nm uyarılma, 470 nm emisyon.....	16
Şekil II.10 hCys'nin iodoasetik asitle karboksimetilasyonu ve MCE varlığında OPA ile türevlendirilmesi. [19].....	17
Şekil II.11 Kromatogram A:5µM hCys ve 50µM Cys standart çözeltileri, Kromatogram B:5.9 toplam hCys ve 162µM toplam Cys, Kromatogram C:1.5µM serbest hCys ve 82µM Cys.....	18
Şekil 2.12 Kromatogram A: hCyS,Cys ve M'in standart çözeltilerine ait Kromatogram, B: hCyS, Cys ve M'in plazmadaki miktarlarına ait kromatogram.....	19
Şekil II.13 Üst kromatogramlar: plazmadaki GC-MS ile metiyonin ve toplam homosistein tayinine ait kromatogramlar, Alt kromatogramlar:[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]metiyonin ve [ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]homosistein standartları [52]......	21
Şekil II.14 hCys'nin ABD-F ile türevlendirme reaksiyonu.....	23
Şekil II.15 ABD-homosisteine ait kromatogram. (A) ABD-homosistein, (B) ABD-F [53].....	23
Şekil II.16 Bir pikin UV ve 1.-4. türev spektrumlarında karakteristik görünümleri.....	27
Şekil II.17 Türev derecesine bağlı olarak pik genişliğinin azalması.....	28
Şekil II.18 (a) Çakışan iki pik, (b) çakışan iki pikin UV spektrumu ve 1.-4. türev spektrumları ile ayrılması.....	29
Şekil II.19 Kantitatif analizler için türev spektrumlarını değerlendirme yöntemleri.....	30
Şekil IV.1 12.5 µM hCys, 56.0 µM Cys ve 150 µM met'in normal spektrumları.....	38
Şekil IV.2 12.5 µM hCys, 56.0 µM Cys ve 150 µM met'in birinci türev spektrumları.....	38
Şekil IV.3 12.5 µM hCys, 56.0 µM Cys ve 150 µM met'in ikinci türev spektrumları.....	38
Şekil IV.4. 12.5 µM hCys'in ikinci türev spektrumu.....	39
Şekil IV.5. , 56.0 µM Cys'in ikinci türev spektrumu.....	39
Şekil IV.6. , 150 µM met'in ikinci türev spektrumu.....	39
Şekil IV.7 Job yöntemine göre çizilen grafik.....	41
Şekil IV.8 Mol oranı yöntemine göre çizilen grafik.....	42
Şekil IV.9 2-MCE varlığında türevlendirme.....	43
Şekil IV.10 280 nm'de homosisteinin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	44
[hCys] <sub>son</sub> = 5.0x10 <sup>5</sup> M.....	44
Şekil IV.11 280 nm'de homosisteinin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	45
[hCys] <sub>son</sub> = 5.0x10 <sup>5</sup> M.....	45
Şekil IV.12 300 nm'de homosisteinin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	46
[hCys] <sub>son</sub> = 5.0x10 <sup>5</sup> M.....	46
Şekil IV.13 273 nm'de sisteinin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	47
[Cys] <sub>son</sub> = 1.5x10 <sup>4</sup> M.....	47
Şekil IV.14 265 nm'de sisteinin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	48
[Cys] <sub>son</sub> = 1.5x10 <sup>4</sup> M.....	48
Şekil IV.15 280 nm'de sisteinin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi [Cys] <sub>son</sub> = 1.5x10 <sup>4</sup> M.....	49
Şekil IV.16 300 nm'de sisteinin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	50

[Cys] <sub>son</sub> = 1.5x10 <sup>-4</sup> M.....	50
Şekil IV.17 244 nm’de metiyoninin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	51
[Met] <sub>son</sub> = 2.3x10 <sup>-4</sup> M.....	51
Şekil IV.18 280 nm’de metiyoninin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi .....	52
[Met] <sub>son</sub> = 2.3x10 <sup>-4</sup> M.....	52
Şekil IV.19 14 300 nm’de metiyoninin ikinci türev ( <sup>2</sup> T) spektrumuna ait çalışma eğrisi.....	53
[Met] <sub>son</sub> = 2.3x10 <sup>-4</sup> M.....	53
Şekil IV.20 plazma örneğinin hCys eklenmeden önceki ve eklendiktanten sonraki .....	58
normal spektrumları.....	58
Şekil IV.21 plazma örneğinin hCys eklenmeden önceki ve eklendiktanten sonraki .....	58
ikinci türev spektrumaları.....	58

## TABLO LİSTESİ

Tablo II.1 Yüksek miktardaki homosisteinin sebepleri .....	6
Tablo II.2 Homosistein tayini için kullanılan indirgenler, ayırma yöntemleri türevlendirme ayırıcıları ve dedeksiyon yöntemleri .....	10
Tablo II.3 CE yönteminde kullanılan bazı florojenik ayırıcılara ait karakteristikler .....	24
Tablo II.4 İmmünojenik yöntemlere ait bazı karakteristik özellikler .....	25
Tablo IV.1 Farklı pH 10 tamponların absorpsiyon üzerine etkileri .....	40
Tablo IV.2 pH ile absorpsiyon değişimi .....	40
Tablo IV.3 Amino asitlerin karalılığın belirlenmesi .....	43
Tablo IV.4 Amino asitlerin normal spektrumlarına ait doğru denklemleri .....	54
Tablo IV.5 Amino asitlerin ikinci türev spektrumlarına ait doğru denklemleri .....	54
Tablo IV.6 Amino asitlerin normal spektrumlarına ait % Rölatif Standart Sapmalar .....	55
Tablo IV.7 Amino asitlerin ikinci türev spektrumlarına ait % Rölatif Standart Sapmalar .....	55
Tablo IV.8 Normal spektrumlara ait LOD ve LOQ değerleri .....	55
Tablo IV.9 İkinci türev spektrumlarına ait LOD ve LOQ değerleri .....	56
Tablo IV.10 Bazı amino asitlerin hCys tayinine bozucu etkileri .....	56
.....	

## SEMBOL LİSTESİ

<b>ABD-F</b>	: 4-aminosülfonil-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol
<b>5-BMF</b>	: bromometil floresein
<b>CBS</b>	: sistatyonin $\beta$ -sentaz
<b>CE</b>	: kapiler elektroforez
<b>CMPI</b>	: 2-kloro-1-metilpiridinyum iyodür
<b>CMQT</b>	: 2-kloro-1-metilkinolinyum tetrafloroborat
<b>Cys</b>	: sistein
<b>CZE</b>	: kapiler kılcal bölge elektroforezi
<b>DTT</b>	: ditiyotreitol
<b>ECF</b>	: etilkloroformat
<b>FITC</b>	: floresein izitiyosiyonat
<b>FM</b>	: floresein-5-maleimid
<b>GC</b>	: gaz kromatografisi
<b>hCys</b>	: homosistein
<b>HPLC</b>	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>6-IAF</b>	: 6-iodoasetamidofloresein
<b>LIF</b>	: lazer indüksiyonlu floresans
<b>mBrB</b>	: monobrombiman
<b>MCE</b>	: 2-merkaptoetanol
<b>met</b>	: metiyonin
<b>MS</b>	: metiyonin sentaz
<b>MTBSTFA</b>	: N-(tersiyer-bütildimetilsilil)-N-metiltrifloroasetamid
<b>MTHFR</b>	: metilenterafolat redüktaz
<b>OPA</b>	: o-fitalaldehit
<b>SAH</b>	: S-adenozil homosistein
<b>SAM</b>	: S-adenozil metiyonin
<b>TBP</b>	: tri-n-bütilfosfin
<b>TCA</b>	: trikloroasetik asit
<b>TCEP</b>	: tris(2-karboksietil)fosfin
<b>TPP</b>	: trifenilfosfin

## ÖZET<sup>1</sup>

### SPEKTROFOTOMETRİK HOMOSİSTEİN TAYİNİ

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit), metabolizmada metiyoninin demetilasyonu sonucu açığa çıkan endojen bir amino asittir. Genetik hastalıklara ya da yanlış beslenme sonucu B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> vitamini eksikliğine bağlı olan enzimatik bozukluklar, kronik böbrek hastalıkları, yaş, cinsiyet gibi fizyolojik faktörler, yaşam alışkanlıkları (alkol, sigara tüketimi), bazı ilaçların kullanımı gibi sebeplerden ötürü plazmadaki homosistein miktarının 15 µM'ı geçmesi hiperhomosisteinemi olarak adlandırılır. Hiperhomosisteinemi, folat ve kobalamin (B<sub>12</sub> vit) eksikliğinin duyarlı bir belirteci ve kalp-damar hastalıkları için bağımsız bir risk faktörüdür. Plazmadaki toplam homosistein derişimi ayrıca hamilelik komplikasyonları, akıl hastalıkları ve yaşlılıkta görülen zihinsel bozukluklarla da ilişkilidir. Bu nedenlerden dolayı başta plazma olmak üzere biyolojik sıvılarda homosistein tayini giderek önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda homosistein (hCys), yapısındaki serbest tiyol grubundan faydalanılarak pH 9.2'de en çok kullanılan türevlendirme ayıraçlarından olan *o*-fitalaldehit (OPA) ile türevlendirildi. Oda sıcaklığında hemen oluşan ve en az ½ saat kararlılığını koruyabilen hCys-OPA türevinin 600 -200 nm arası spektrumu çizilerek homosisteinin tek başına bulunduğu durumda 280 nm'deki absorbansından yararlanılarak tayin edilebileceği görüldü. Homosisteinin organizmada transmetilasyon reaksiyonları ile sistein veya tekrar metiyonine metabolize olduğu bilindiğinden homosisteinin sistein ve metiyonin ile yan yana analizi şartları da incelendi. Aynı türevlendirme koşullarında Cys-OPA ve met-OPA türevleri hazırlanarak spektrumları çizildiğinde sistein için 273 nm'de metiyonin için ise 244 nm'de maksimum absorbanslar elde edilmesine rağmen spektrumlarda girişimler olduğu görüldü. Her üç amino asit-OPA türevine ait ikinci türev spektrumları alındığında homosistein ve metiyoninin düğüm noktalarının bulunduğu 265 nm'de sistein tayini, 280 ve 300 nm'lerdeki toplam türev absorbans değerlerinden ise homosistein ve metiyonin tayininin yapılabileceği sonucuna varıldı. hCys, Cys ve met için ikinci türev absorbans değerleri ile elde edilen LOD değerleri, hCys için 280 ve 300 nm'lerde sırasıyla 0.8 ppm ve 1.05 ppm, Cys için 265 nm'de 5.34 ppm ve met için 300 nm'de 0.6 ppm'dir. Geliştirilen yöntemin homosistein tayin sınırı, hiperhomosisteineminin ilk evresi içindedir. Teşhis açısından büyük önemi olan bu mertebedeki homosistein miktarını, sistein ve metiyonin miktarları ile birarada tayin edebilen bu yöntem, üç amino asidin sentetik karışımlarına başarıyla uygulanabilmektedir. Yöntemin, hCys tayininin önemli olduğu plazma gibi karmaşık bir matrikse klasik kromatografik ve immünolojik yöntemlerin çoğundan daha basit, ucuz ve hızlı bir şekilde uygulanabilmesi için diğer amino asitlerin bozucu etkilerinin kemometrik bir yaklaşımla ortadan kaldırılması gerekmektedir.

---

<sup>1</sup> Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından T-414/08032004 sayılı proje ile desteklenmiştir.

## SUMMARY<sup>1</sup>

### SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE

Homocysteine (2-amino-4-mercaptobutyric acid) is an endogenous amino acid, which is generated by the demethylation of methionine. Hyperhomocysteinemia is described for upper levels than 15  $\mu$ M plasma hCys level in due to the enzymatic failures, which was the results of the inherited disorders of the main enzymes of homocysteine metabolism or the nutritional deficiencies of the vitamin cofactors such as B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> or the diseases (i.e. chronic renal failure, cancer), the physiological factors (i.e., age, sex), the lifestyle determinants (smoking, coffee consumption), the usage of some medicines, etc. Hyperhomocysteinemia is a sensitive marker of folate and cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) deficiencies and independent risk factor for cardiovascular diseases (CVDs). Plasma total (thCys) concentrations are also related pregnancy complications, psychiatric disorders and cognitive impairment in the elderly. Because of these reasons, the measurement of thCys in the biological fluids (especially in plasma) is potentially of great importance.

In our study, homocysteine (hCys) was derivatized with o-phthaldehyde (OPA), the common derivatizing reagent, at pH 9.2 utilizing from free thiol moiety of its structure. It was observed that hCys that was alone could be determined by using the absorbance at 280 nm drawing the spectrum of hCys-OPA derivative, which was formed immediately, and stable at least ½ hour at room temperature. Because it was known that homocysteine metabolized to cysteine or methionine by transmethylation reactions, the conditions of simultaneous determination of hCys, Cys and met were investigated. The spectra of Cys-OPA and met-OPA derivatives prepared at the same derivatization conditions had maxima at 273 nm for Cys and at 244 nm for met but there were interferences. It was concluded that Cys could be determined at 265 nm, crossing point for hCys and met spectra, hCys and met could be determined using total derivative absorbance values at 280 nm and 300 nm from the second-derivative spectra of each of three amino acid-OPA derivatives. Limit of detection values (LOD) obtained from second derivative absorbance values were, 0.8 ppm and 1.05 ppm for hCys at 280 and 300 nm, respectively 5.34 ppm for Cys at 265 nm and 0.6 ppm. for met at 300 nm. Limit of quantitation of the developed method was in the first interval of hyperhomocysteinemia (moderate hyperhomocysteinemia). This method that could simultaneous determine the moderate amount of hCys that was important for diagnosis with Cys and met amounts was successfully applied to the synthetic mixtures of these three amino acids. But, for being applicable the proposed method as simpler, cheaper and faster than most of the classical chromatographic methods and immunoassays to the complex matrix such as plasma in which hCys determination is important, it was necessary to use a chemometric approach for overcoming the interferences of the other amino acids.

---

<sup>1</sup> This study was supported by Istanbul University Scientific Research Project Center with the project number T-414/08032004









## I. GİRİŞ

Canlı organizmaların en önemli yapı maddeleri proteinlerdir. Canlıların büyümeleri, üremeleri, genetik özelliklerinin nesilden nesile aktarılması protein içeren maddeler vasıtasıyla olur. Bilindiği gibi amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır ve canlı organizmalar için hayati önem taşırlar. Bunun yanı sıra amino asitler metabolizmadaki birçok reaksiyona katılan endojen maddelerin (porfirin, pirimidin, purin...) de başlangıç maddeleridir.

Amino asitlerin bir kısmı metabolizma tarafından sentezlenir. Bu tür amino asitlere esansiyel olmayan (endojen) amino asitler denir. Alanin, glisin, sistein, homosistein, serin, aspartik asit, glutamik asit ve prolin endojen amino asitlerdir. Metabolizma tarafından sentezlenemeyen amino asitlere ise esansiyel (eksojen) amino asitler denir. Canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için eksojen amino asitleri yedikleri besinlerle mutlaka almaları gerekmektedir. Eksojen amino asitlere örnek olarak histidin, metiyonin, lösin, izolösin, triptofan, fenilalanin, treonin ve lizini verebiliriz [1,2].

Endojen bir amino asit olan homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit)in insan vücudundaki tek kaynağı eksojen bir amino asit olan metiyonindir. Homosistein, metabolizmadaki transmetilasyon reaksiyonları sırasında metiyoninin demetilasyonu sonucu açığa çıkar. Meydana gelen homosistein çeşitli enzimatik reaksiyonlar sonucu sisteine dönüşebildiği gibi metil grubu veren kolin, betain gibi maddeler varlığında tekrar metiyonine de dönüşebilir. İnsan vücudundaki pek çok dokuda normal şartlar altında günde 15-20 mmol homosistein sentezlenir. Çeşitli sebeplerden ötürü homosistein metabolizmasındaki denge bozulabilir, bu durumda hücre içerisindeki homosistein miktarında artış görülür. Homosisteinin hücre içerisindeki derişimi 0.8  $\mu\text{M}$ 'ı aştığı zaman fazlası hücre dışına salınır. Plazmadaki homosistein miktarı 15  $\mu\text{M}$ 'ı geçtiği zaman hiperhomosisteinemi meydana gelir. Hiperhomosisteinemiye sebep olan homosistein metabolizmasındaki düzensizlikler, ilk olarak 1962 yılında zihinsel bozukluğu olan çocuklar üzerinde yapılan çalışmalar sırasında ortaya çıkmıştır.

Sonraki yıllarda yapılan araştırmalar sonucu 1969'da McCully ve 1979'da Wilcken ve Wilcken plazmadaki yüksek miktardaki homosisteinin kalp-damar hastalıklarına sebep olduğunu bulmuşlardır. 1999 yılında ise Lagman ve Cole homosisteini 90'ların kolesterolü olarak tanımlamıştır. 1962'den günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda hiperhomosisteineminin başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere düşüklere, hamilelikte görülen bazı komplikasyonlara, kansere, akıl hastalıklarına ve buna bağlı olarak Alzheimer hastalığına da sebep olduğu bulunmuştur [3]. Tüm bu nedenlerden ötürü başta plazma olmak üzere biyolojik sıvılarda homosistein tayini giderek önem kazanmıştır. Günümüzde homosistein tayinleri, en yaygını olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olmak üzere, gaz kromatografisi (GC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma teknikleri ve immünolojik yöntemlerle yapılmaktadır. [3,4] Çok nadir uygulama alanına sahip olmakla birlikte doğrudan tayin yöntemleri de mevcuttur [1].

Çalışmamızda, yukarıdaki yöntemlere göre daha az ekipman gerektiren, daha basit, ucuz ve kısa sürede sonuç veren spektrofotometrik bir homosistein tayin yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla homosisteinin yapısındaki serbest tiyol (-SH) grubuyla reaksiyona girebilen çeşitli türevlenme ayıraçlarının belli başlılarından olan o-fitalaldehit (OPA) kullanılmıştır.

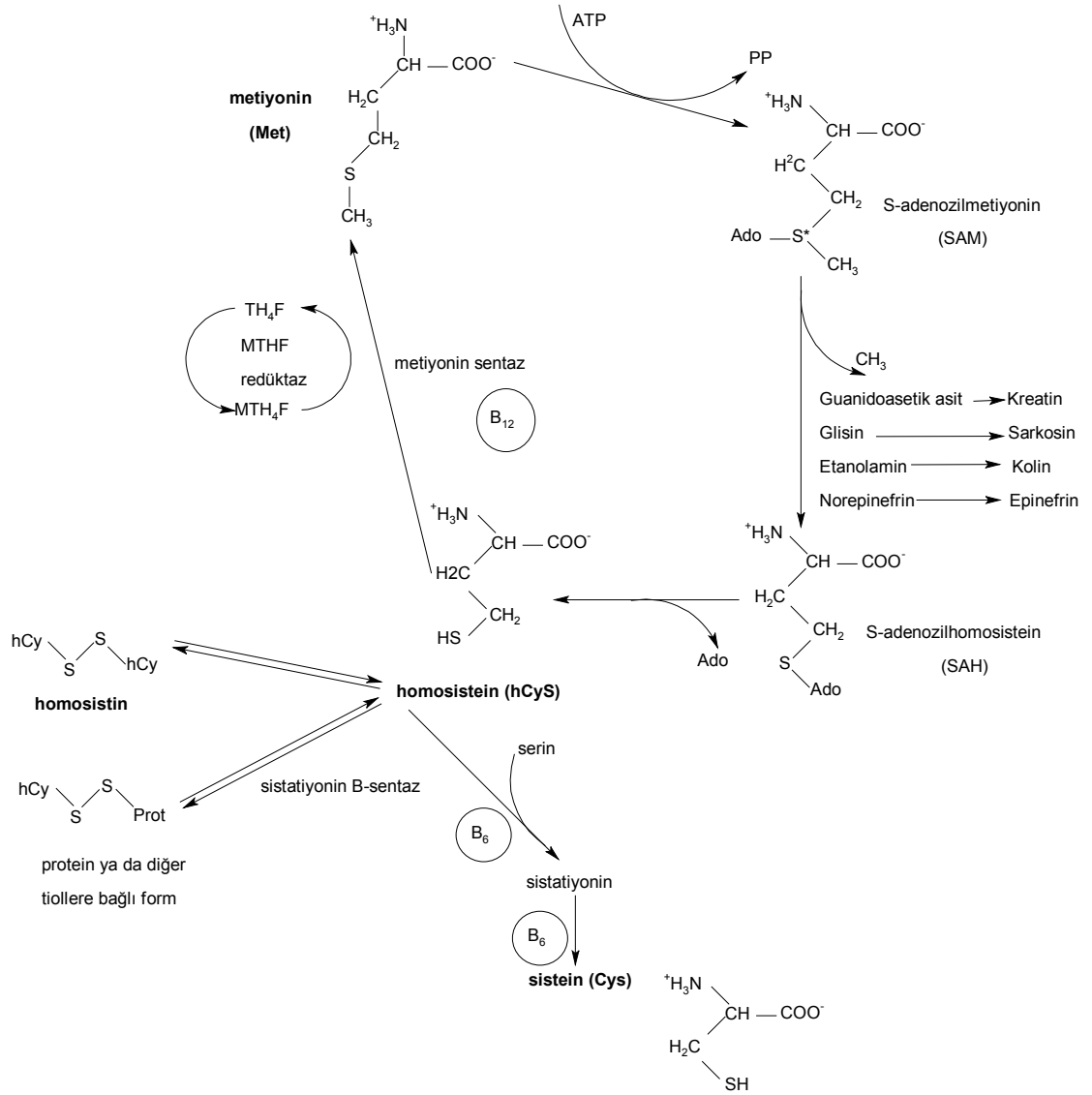
## II. GENEL KISIMLAR

### II.1. HOMOSİSTEİN METABOLİZMASI

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit), ilk olarak 1932 yılında du Vigneaud'un sülfür kimyası ve metabolizmasıyla ilgili yapmış olduğu çalışmalar sırasında sentez edilmiştir. İnsan metabolizmasındaki pek çok reaksiyon için önemli olan homosistein, endojen bir amino asit olmasına rağmen metabolizmadaki tek kaynağı olan metiyonin eksojen bir amino asittir. Homosistein, metabolizmadaki transmetilasyon reaksiyonları sırasında metiyoninin demetilasyonu sonucu açığa çıkar. Şekil II.1'de de görüldüğü üzere metiyonin öncelikle aktif şekli olan S-adenozil metiyonin (SAM)e dönüşür. S-adenozilmetiyonin (SAM) ise metil grubunu kolin, betain gibi alıcılara aktararak S-adenozilhomosistein (SAH)e dönüşür. Ardından S-adenozilhomosistein (SAH)in hidrolizi sonucu adenozil ve homosistein meydana gelir. Meydana gelen homosistein, iki temel metabolik mekanizmaya sahiptir:

- (i) Sistatyonin  $\beta$ -sentaz (CBS) enzimi katalizörlüğünde serinle kondensasyon reaksiyonuna girerek sistatyonin üzerinden sisteine dönüşür. Bu dönüşüm sırasında kofaktör olarak piridoksal-5'-fosfat (B<sub>6</sub> vitamini)a ihtiyaç vardır.
- (ii) Metiyonin sentaz (MS) ve metilentetrahidrofolat redüktaz enzimleri (MTHFR) katalizörlüğünde tekrar metiyonine dönüşür. Bu dönüşüm sırasında ise kofaktör olarak B<sub>12</sub> vitaminine ihtiyaç vardır.
- (iii) Şemada gösterilmeyen üçüncü bir yoldan ise betain gibi bir metil vericiyle homosistein metil transferaz enzimi katalizörlüğünde girerek N,N-dimetilglisin ve metiyonine dönüşür [5,6,7].

Tüm bu reaksiyonlar sonucu sağlıklı bir insanda günde 15-20 mmol homosistein sentezlenir. Bu miktarın yalnızca % 1-2'si serbest (indirgenmiş) homosisteindir. % 10-20'si homosistein, sistein ya da diğer düşük molekül ağırlıklı aminotiyollerle bağlı olduğu disülfür (-S-S-) şeklindedir. En büyük kısmı ise % 80-90 oranında proteinlere bağlı olarak bulunur. (Şekil II.2)



Şekil II.1 Homosistein metabolizması

<b>İndirgenmiş :</b>		
Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{SH} \end{array}$	% 1-2
<b>Yükseltgenmiş :</b>		
Homosistin	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\   \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \end{array}$	
Sistein-Homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ ^-\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\   \\ -\text{OOCCHCH}_2-\text{S} \\   \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	% 10-20
<b>Karışık disülfürler :</b>		
Proteinlere bağlı homosistein	$\begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\   \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2-\text{S} \\   \\ \text{Protein}-\text{S} \end{array}$	% 80-90

Şekil II.2 Metabolizmada homosisteinin bulunuş şekilleri

Normal şartlar altında homosistein metabolizması oldukça düzgün işler ve sentezlenen 15-20 mmol homosistein, metiyoninin fazla olduğu durumlarda sisteine dönüşürken, metiyoninin eksik olduğu durumlarda ise tekrar metiyonine dönüşür [8].Tablo II.1’de kısaca özetlenmiş olan sebeplerden ötürü homosistein miktarında artış görülür.

Tablo II.1 Yüksek miktardaki homosisteinin sebepleri

<b>Genetik Faktörler :</b>
Sistatyonin $\beta$ -sentaz (CBS)
Metiyonin sentaz (MS)
Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR)
<b>Beslenme :</b>
Folat eksikliği
B <sub>6</sub> vitamini eksikliği
B <sub>12</sub> vitamini eksikliği
Aşırı miktarda metiyonin alımı
<b>Demografik Faktörler :</b>
Yaşlanma
Cinsiyet
Beyaz ırk
Menopoz
<b>Kronik Hastalıklar :</b>
Böbrek yetmezliği
Şeker hastalığı
Hipotiroidizm
Sedef hastalığı
Organ nakilleri
<b>İlaç Kullanımı :</b>
Alkol
Kafein
Doğum kontrol hapları
Kortikosteroidler

Yüksek miktardaki homosisteinin sebeplerini biraz daha açmak gerekirse ilk olarak belirtilmesi gereken enzimlerin yetersizliğine bağlı olan yükselmelerdir. Tablo II.1’de açık adları verilmiş olan CBS, MS ve MTHFR enzimlerinin homosistein metabolizmasında ne kadar önemli görevler üstlendikleri yukarıda (Şekil II.1) açıklanmıştı. Enzimlerinin işlevlerini yerlerine getiremeyenlerin iki temel sebebi vardır. Bunlardan birincisi bazı kalıtsal hastalıklar [6,9] diğeri ise bu enzimlerin kofaktörleri olan B<sub>6</sub> ve B<sub>12</sub> vitamini eksikliğidir. Bu vitaminlerin eksikliğinin nedenleri

ise başta düzensiz ve yanlış beslenme olmakla birlikte [6] yaşlanmaya bağlı olan B vitamini eksiklikleri [3] ve alkol, sigara, kafein tüketimi sebebiyle metabolizmadaki folat ve B<sub>6</sub> vitamini rezervlerinin azalmasıdır [5].

Yapılan istatistiksel çalışmalar sonucu kadınlardaki plazma homosistein miktarının menopoz öncesi dönemde erkeklere oranla % 25 daha az olduğu görülürken, menopoz sonrası plazma homosistein miktarlarının erkeklere oranla daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonucun östrojen hormonuna bağlı olabileceği düşünülerek İtalya'da 100 kadın üzerinde yapılan çalışmada menopoz dönemindeki kadınların bir kısmına östrojen verilirken diğerlerine verilmemiştir. Bir yıl boyunca yapılan düzenli kontroller sonucu östrojen hormonunun homosistein miktarı üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. [10] Bunun dışında diğer cinsiyet hormonlarının homosistein miktarı üzerine etkisi henüz tam olarak incelenebilmiş değildir [11].

Her ne kadar hormonlar üzerinde yapılan çalışmalardan kesin bir sonuç alınamamışsa da erkekler ve kadınlar arasında anatomik olarak pek çok farklılık vardır. Örneğin erkeklerde kadınlara oranla daha fazla kas vardır. Bu nedenle erkeklerde daha fazla kreatin sentezlenmektedir [3]. Şekil I.1'de de görüldüğü gibi metiyonin, metil grubunu guanidoasetik asite vererek kreatin sentezlenmesini sağlarken kendisi de S-adenozil homosistein (SAH) üzerinden homosisteine dönüşür. Erkeklerde kadınlara oranla daha fazla miktarda homosistein sentezlenmesinin sebebi budur.

Böbrek yetmezliği ise homosistein yükselmesine sebep olan kronik hastalıklardan biridir. Böbreklerdeki glomerular süzme ve serum kreatinin indirgenmesi ile homosistein arasında doğrudan bir ilişki vardır. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda normal şartlar altında proteinlere bağlı olan homosisteinin böbreklerdeki süzülme sırasında damar içersinde kaldığı, serbest homosisteinin ise dışarı salındığı görülmüştür. Böbrekler işlevlerini tam olarak yerine getiremediğinde bu mekanizma işlemez ve buna bağlı olarak plazmadaki toplam homosistein miktarında artış görülür. Böbreklerdeki bu bozukluğun sebebinin serum kreatinin indirgenmesinden ötürü olduğu tespit edilmekle birlikte tedavi amaçlı olarak yapılan hemodiyaliz sonucu toplam homosistein miktarında düşüş gözlenmediği görülmüştür [6].



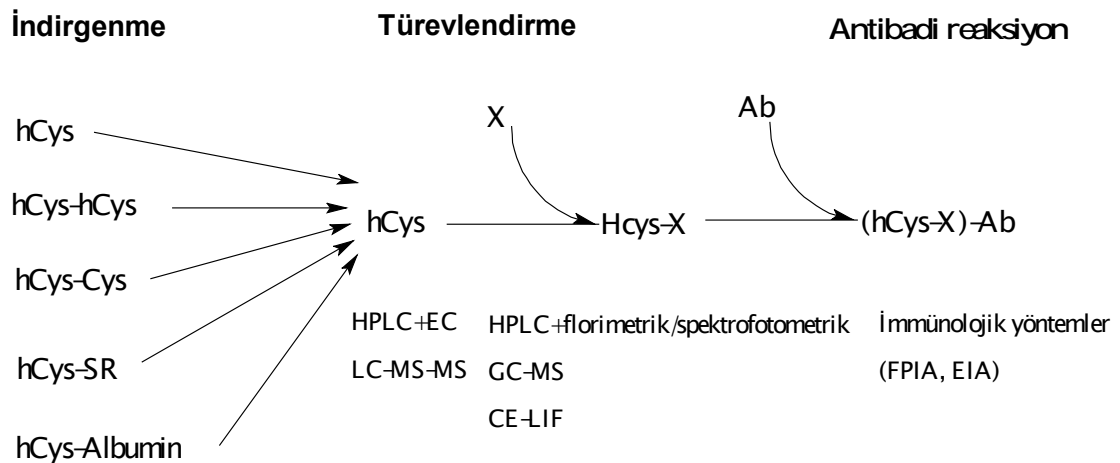
Yukarıda açıklanan durumlara göre daha az etkili olmakla birlikte organ nakilleri ve bazı ilaçların kullanımının da homosistein miktarındaki artışa sebep oldukları bilinmektedir. Yapılan istatistiksel çalışmalar, özellikle kalp ve böbrek nakilleri sonucu homosistein miktarında artış olduğunu doğrulamıştır [12-15]. Karbamezapin, kolestipol, niasin, penisilamin gibi etken maddeleri içeren ilaç kullanımlarının da homosistein miktarında artışa neden olduğu görülmüştür [16].

Sağlıklı bir insan plazmasında bulunması gereken homosistein miktarı 5-15  $\mu\text{M}$  iken yukarıda açıklanmış sebeplerden ötürü bu miktarda artış olur. Homosisteinin plazmadaki konsantrasyonu 15  $\mu\text{M}$ 'ı aştığı zaman hiperhomosisteinemi görülür. Hiperhomosisteinemi çeşitli evrelere ayrılmıştır: 16-30  $\mu\text{M}$  arası başlangıç evresi, 31-100  $\mu\text{M}$  arası orta seviye, 100  $\mu\text{M}$ 'ın üzeri ise ileri seviyede hiperhomosisteinemi olarak adlandırılır. Hiperhomosisteinemi görülen insanların ateroskleroz ve trombozis gibi kalp-damar hastalıklarına yakalanma riski sağlıklı bir insana oranla 1.5-1.9 kat artar [1]. Hiperhomosisteineminin neden olduğu problemler kalp-damar hastalıklarıyla sınırlı kalmayıp hamilelikte görülen bazı komplikasyonlara, kansere, akıl hastalıklarına ve buna bağlı olarak Alzheimer hastalığına da sebep olduğu bulunmuştur. Tüm bu nedenlerden ötürü başta plazma olmak üzere biyolojik sıvılarda homosistein tayini giderek önem kazanmıştır [3].

## II.2. HOMOSİSTEİN TAYİN YÖNTEMLERİ

Günümüzde homosistein tayinleri yaygın olarak kan örneklerinde yapılmakla birlikte idrarda da yapılabilmektedir. Kan örneklerinde yapılan homosistein tayinleri için plazma veya serum kullanılmaktadır. Homosistein tayinine geçilmeden önce dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Öncelikle her analizde olduğu gibi örnek alımına dikkat edilmesi gerekir. Hastalardan alınan kan örneklerinin, pıhtılaşmalarını engellemek için 20 dakikadan daha kısa bir süre içerisinde etilendiamintetraasetikasit disodyum tuzu (EDTA) bulunan tüplere aktarılması gerekir. Tüp içerisindeki örnek hemen analizlenemiyorsa buz içinde 4 saat kararlılığını koruyabilir. Kan örneği 1000 rpm hızla 10 dakika boyunca santrifüj edilmelidir. Bu şekilde elde edilen plazmadaki homosistein, oda sıcaklığında 4 gün, 0-2  $^{\circ}\text{C}$ 'de birkaç hafta, -20  $^{\circ}\text{C}$ 'de ise yıllarca kararlılığını koruyabilir. Plazmada homosistein tayini yapılabilmesi için gerekli olan ilk

işlem, yaklaşık olarak plazmadaki homosisteinin %90'dan fazlasını oluşturan disülfür (-S-S-) formunun ditiyotreitol (DTT) [17,18], 2-merkaptoetanol (MCE) [19,20,21] ya da tribütilfosfin (TBP) [22,23,24] ile serbest tiyol formuna indirgenmesidir. Ardından sülfosalisilik asit, metanol, perklorik asit, trikloroasetik asit ve metafosforik asit gibi protein çöktürücü reaktifler kullanılarak proteinler ortamdaki uzaklaştırılır [3,25]. Bu işlemlerden sonra plazmada toplam homosistein tayini yapılabilir. Fakat homosistein (hCys), sistein (Cys) ve metiyonin (Met) transmetilasyon reaksiyonlarına birlikte katıldıklarından ve yapıları birbirlerine çok benzer olduğundan (Şekil II.1) karışımlarının ayrılması oldukça güçtür. Ancak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma yöntemleriyle ayrıldıktan sonra kolon çıkışında uygun türevlendirici ayırıcılar kullanılarak spektrofotometrik, florimetrik veya elektrokimyasal dedeksiyonla tayin edilebilmektedirler. Türevlendirme işlemi, homosisteinin ve diğer aminotiyollerin yapısında bulunan -SH veya -NH<sub>2</sub> grubuyla uygun bir ayırıcının reaksiyona girmesiyle oluşur. Son yıllarda klasik kromatografik ve elektroanalitik yöntemlere alternatif olarak geliştirilen immünojenik yöntemler de yaygın kullanım alanı bulmuştur [3,4]. Çok nadir uygulama alanına sahip olmakla birlikte doğrudan tayin yöntemleri de mevcuttur. Plazmada toplam homosistein tayin prensipleri Şekil II.3'te şematik olarak verilmiştir. Ayrıca uygulanmakta olan yöntemler Tablo II.2.'de kısaca özetlenmiştir.



Şekil II.3 Plazmada toplam homosistein tayin prensipleri

Tablo II.2 Homosistein tayini için kullanılan indirgenler, ayırma yöntemleri türevlendirme ayıracıları ve dedeksiyon yöntemleri

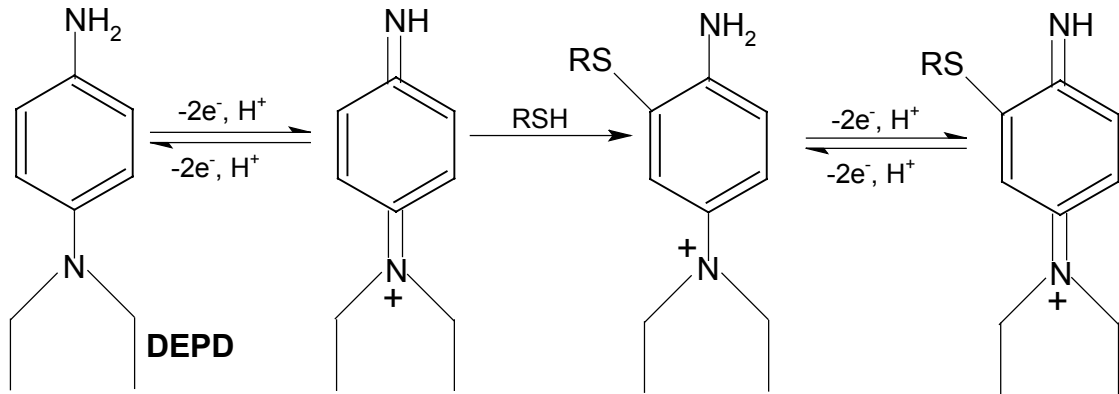
Matriks	İndirgen	Türevlendirme ayıracağı	Ayırma yöntemi	Dedeksiyon	LOD( $\mu$ M)	Kaynak
Plazma	MCE	OPA	HPLC	FL: —	—	19
Plazma	NaBH <sub>4</sub>	MBrB	HPLC	FL:365,475nm	2.5x10 <sup>-3</sup>	26
Kan	TPP	MBrB	HPLC	FL:300,470nm	0.1	27
Plazma	TBP	SBD-F	HPLC	FL:385,515nm	—	22
Plazma	MCE	OPA-MCE	HPLC	FL:340,450nm	0.08	20
Plazma	DTT	MBrB(MeOH)	HPLC	FL:270,474nm	0.12	17
Hücre kültürü	TCEP	OPA	HPLC	FL:370,480nm	5x10 <sup>-3</sup>	28
Hücre kültürü	DTT	4,4'ditiopiridin	HPLC	UV:327 nm	—	18
İdrar	TBP	CMPI	HPLC	UV:312 nm	5.0	23
Plazma	TBP	CMPI	HPLC	UV:312 nm	0.1	24
Plazma	NaBH <sub>4</sub>	CMQT	HPLC	UV:350 nm	0.4	4
Plazma	NaBH <sub>4</sub>	—	HPLC	EC: Grafit	5x10 <sup>-6</sup>	29
Plazma	NaBH <sub>4</sub>	—	HPLC	EC: GC	0.1	30
Plazma	TCEP	—	HPLC	EC: Au	1.0	31
Plazma	NaBH <sub>4</sub>	—	HPLC	EC: NG	0.5	32
Plazma	TBP	ECF	GC	MS	0.2	33
Serum	2-MCE	MTBSTFA	GC	MS	1.0	21
Plazma	DTT	MTBSTFA	GC	MS	0.17	34
Plazma	DTT	ECF	GC	MS	5.0	35
Plazma	TBP	ABD-F	CE	UV:220 nm	0.5	36
Plazma	TCEP	—	CE	EC: Au/Hg	0.5	37
Plazma	DTT	FM	CE	LIF:488,520m	3.0	38
Serum	TCEP	6-IAF	EC	LIF: —	—	39
Kan	—	SBD-F	CZE	FL: —	1.56	40

HPLC, yüksek performanslı sıvı kromatografisi; FL, floresans dedeksiyon; UV, ultraviyole; EC, elektrokimyasal; GC, gaz kromatografisi; MS, kütle spektrometrisi; CE, kapiler elektroforez; LIF, lazer indüksiyonlu floresans; CZE, kapiler kılcak bölge elektroforezi; MCE, 2-merkaptetanol; OPA, o-fitalaldehit; mBrB, monobrombiman; TPP, trifenilfosfin; TCEP, tris(2-karboksietil)fosfin; TBP, tri-n-bütilfosfin; SBD-F, 7-florobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-sülfonat; DTT, ditiyotreitit; CMPI, 2-kloro-1-metilpiridinyum iyodür; CMQT, 2-kloro-1-metilkinolinium tetrafloroborat; ECF, etilkloroformat; MTBSTFA, N-(tersiyer-bütildimetilsilil)-N-metiltrifloroasetamid; ABD-F, 4-aminosülfonil-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol;, FM, floresein-5-maleimid; 6-IAF, 6-iodoasetamidofloresein, GC, glassy karbon; NG, verilmemiş (not given).

### II.2.1. Doğrudan Tayin Yöntemleri

Daha önce bahsedildiği gibi homosistein tayinlerinden doğru ve kesin bir netice alabilmek için homosisteini benzer yapıdaki diğer amino tiyollerden ayırmak gerekmektedir. Ancak tiyol bileşiklerinin tayini herhangi bir ayırma tekniği uygulanmadan da elektrokimyasal gerçekleştirilebilmiştir. 100 yılı aşkın bir süredir uygulanmakta olan bu yöntem, genel olarak tüm tiyol bileşiklerine uygulanabilmektedir. Reaksiyon mekanizması Şekil II.4'te görülmektedir [1].

Önce olarak *N,N*-dietyl-*p*-fenilendiamin (DEPD) elektrod yüzeyinde yükseltgenerek kinoid formuna dönüşür. Tiyol bileşikleri bu kinoid yapıyla reaksiyona girer. Meydana gelen bu ürünün yükseltgenmesiyle elde edilen analitik sinyalden sonuca varılır .



Şekil II.4 DEP D'nin tiyollerle verdiği genel reaksiyon. [1].

Bu yöntemle yapılan daha sonraki çalışmalarda DEP D yerine kateşoller kullanılmıştır. DEP D ile meydana gelen reaksiyonlarla benzer şekilde öncelikli olarak kateşol, elektrod yüzeyinde *o*-kinon formuna dönüşür [41]. Meydana gelen bu tür, tiyollerle reaksiyona girebilir [1]. Bu yöntemle glutatyon tayini yapılmıştır [42]. Aynı şekilde uygun pH sağlandığında sistein-kuinin ürünleri için de spesifik bir tayin yöntemi olduğu söylenebilir [43]. Sistein tayini için yapılan çalışmalarda benzokinonlar kullanıldığında başarılı sonuçlar alınmıştır [44].

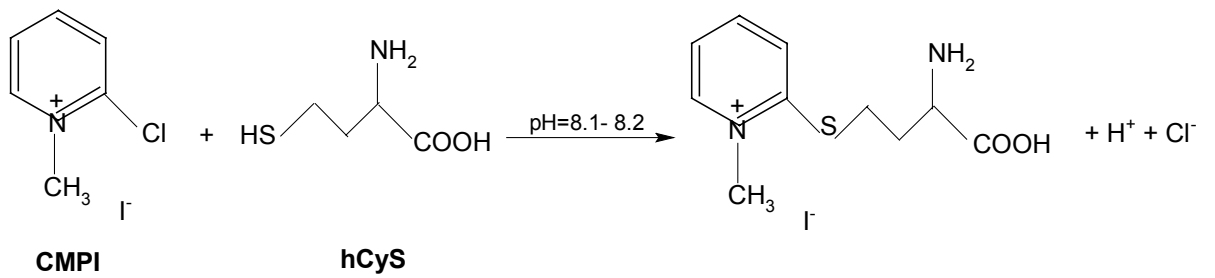
Fakat tiyol bileşiklerinin doğrudan tayinleri için geliştirilen yöntemlerin hiçbiriyle spesifik olarak homosistein tayini gerçekleştirilememiştir [41].

## II.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Homosistein Tayinleri

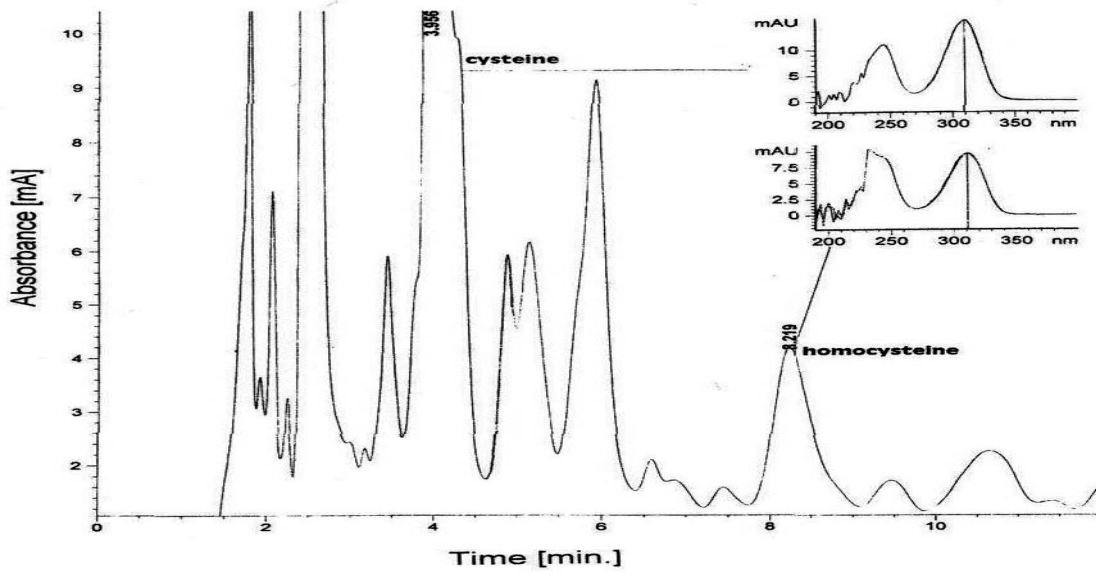
Günümüzde homosistein tayinlerinde en çok kullanılan ayırma yönteminin ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) olduğu Tablo II.2’de de görülmektedir. HPLC kolonunda matriks içerisindeki benzer yapıda olan diğer amino asitlerden ayrılan homosistein, hızlı ve kararlı bir şekilde türev oluşturabilecek ayıraçlarla türevlendirilir. Başarılı bir tayinin gerçekleşmesi için kullanılan ayıraçın düşük derişimlerdeki tiyollere cevap vermesi ve bu dalga boyunda zemin absorpsiyonunun olmaması gerekir. Uygun bir ayıraçla türevlendirilen homosistein, kolon çıkışında spektrofotometrik, florimetrik ya da elektrokimyasal dedeksiyonla tayin edilebilmektedir.

### II.2.2.1. Spektrofotometrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler

Homosistein tayinlerinde fotometrik dedeksiyonun fazla bir uygulama alanı olmamasına rağmen başarılı sonuçlar elde edilen birkaç ayıraç vardır [1]. En çok tercih edilenlerden biri meydana getirdiği S-piridinyum türevlerinin çok kararlı olmasından dolayı 2-kloro-1-metilpiridinyum iyodür (CMPI)dür. Yöntemde tri-n-bütülfosfin (TBP) ile indirgenmenin ardından pH 8.2’de türevlendirme yapılır. Bu işlemin ardından pH 2.5 0.04 M trikloroasetik asit tamponu : metanol (9:1) (v/v) mobil faz karışımının izokratik elüsyonla uygulanması sonucu Şekil II.6’daki kromatogramda görüldüğü üzere homosistein (8.22 dk) ve sistein (3.95dk) 312 nm’de ultraviyole absorpsiyonla tayin edilebilmişlerdir [23,24].



Şekil II.5 hCys'nin CMPI ile türevlendirilme reaksiyonu



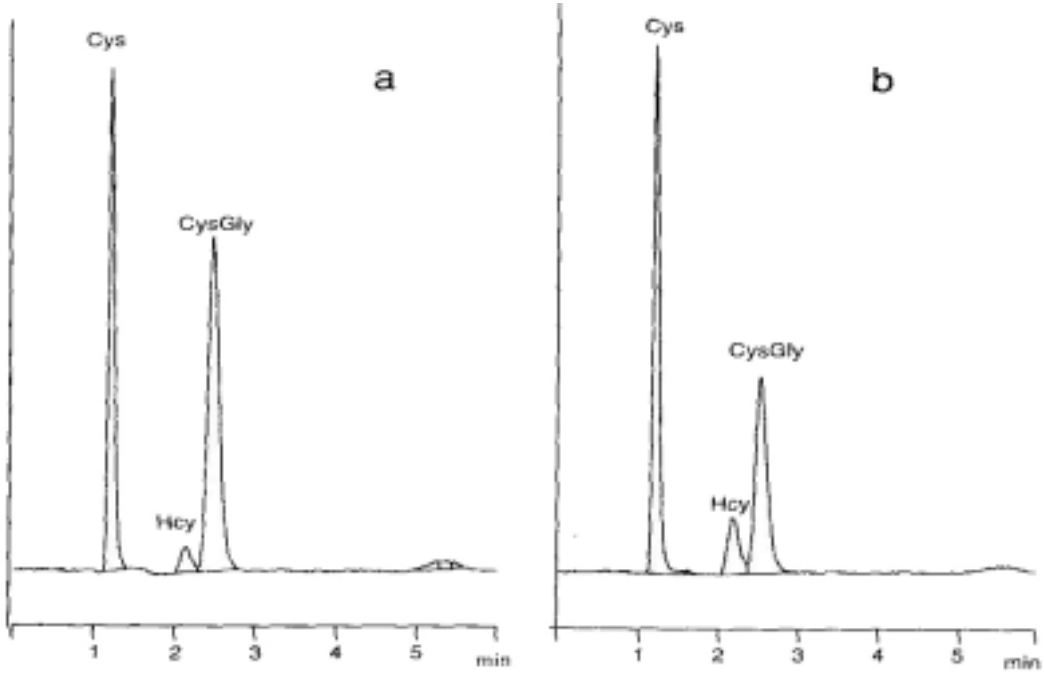
Şekil II.6 73.7 nmol/mL Cys ve 24.3 nmol/mL hCys'ne ait 312 nm'deki kromatogram

Sodyum borhidrür ( $\text{NaBH}_4$ ) ile indirgenmenin ardından 2-kloro-1-metilkinolinyum tetrafloroborat (CMQT) ile türevlendirme yapıldığı zaman ise elde edilen S-kinolinyum türevleri 350 nm'de ultraviyole absorpsiyonla tayin edilebilmişlerdir [4]. Spektrofotometrik dedeksiyon için kullanılan diğer bir ayıraç ise 4,4'-ditiyopiridindir. Bu yöntemde ditiyotreitöl (DTT) ile indirgenmenin ardından türevlendirilen homosistein, 327 nm'de ultraviyole absorpsiyonla tayin edilebilmiştir [18].

#### II.2.2.2. Florimetrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler

Homosisteinin tiyol grubuyla floresans sinyal verebilecek ayıraçların çok olmasından dolayı en çok tercih edilen yöntem florimetrik dedeksiyon olmuştur. Doğru sonuçlar elde edilmesi için kullanılan ayıraçın kendisinin floresans özellik göstermemesi, meydana getirdiği ürünün ise floresans özellik göstermesi gerekmektedir. Ayrıca ayıraçın floresans safsızlık içermemesi ve homosisteinle hızlı bir şekilde reaksiyona girip kararlı ürünler vermesi tercih edilmektedir. Tüm bu özelliklerin hepsine birden sahip olan ayıraçlar mümkün olmamakla birlikte halojensülfonilbenzofuranlar (SBD-F ve ABD-F), monobrombiman (mBrB) ve *o*-fitalaldehit (OPA) en çok kullanılan ayıraçlardır [1,3].

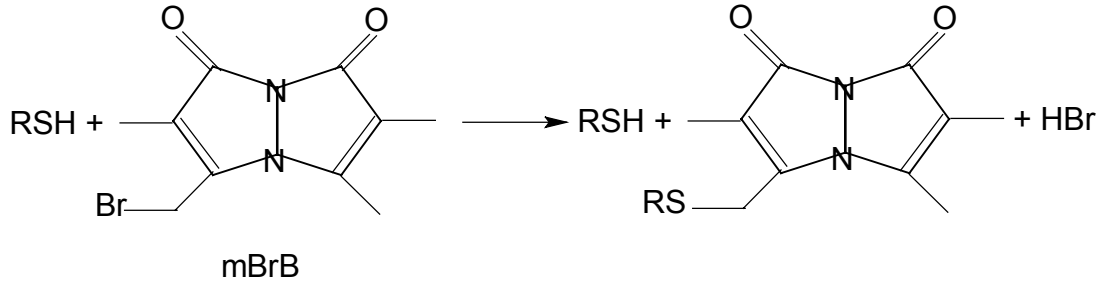
7-florobenzo-2-oksa-1,3-diazol-4-sülfonat (SBD-F) ve 4-aminosülfonil-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F) floresans özellik göstermezken tiyollerle floresans özellik gösteren kararlı ürünler oluşturdukları için yaygın olarak kullanılan ayıraçlardır. Bu ayıraçların hidroliz ürünleri floresans sinyal üretmedikleri için kromatogramlarda girişim gözlenmez. Dolayısıyla izokratik elüsyon için uygundur. Tiyollerin ABD-F ile türevlendirilmesi 50°C'de, pH 8.0-9.5 aralığında, 5-10dk içerisinde gerçekleştirilirken SBD-F için şartlar biraz daha zordur. Türevlendirme işlemi 60 °C'de, pH 9.5'da 1 saatte gerçekleşmektedir. SBD-F'nin diğer bir dezavantajı ise ABD-F'ye göre duyarlılığının daha az olmasıdır. Tüm bu dezavantajlarına rağmen meydana getirdiği ürünlerin diğerlerine oranla en düşük alıkonma zamanına sahip olmaları SBD-F'nin daha çok tercih edilme sebebidir [3]. Halojensülfonilbenzofuranlar ile türevlendirme işlemine geçilmeden önce kullanılacak üç temel indirgen grup vardır. Ditiyotritol, ditiyoeritritol ve 2-merkaptotanol gibi sülfidrillerle yapılan indirgeme işlemleri sırasında ayıraçlar türevlendirici ile reaksiyona girip miktarlarının azalmasına neden olabilirler. Sodyum ve potasyum borhidrür ise indirgenme işlemi sırasında gaz ve köpük hale oluşturabildiğinden homosistein tayininde hataya sebep olabilirler. Tri-n-bütilfosfin (TBP) ve tris-(2-karboksi-etil)-fosfin (TCEP) gibi fosfin grubu indirgenlerde diğer gruplardaki dezavantajlar olmadığından en çok tercih edilen indirgenler bunlardır. İndirgen olarak TCEP'nin tercih edildiği SBD-F ile yapılmış bir analizin sonuçlarını kısaca özetleyecek olursak; TCEP ile indirgenmenin ardından 1 mM EDTA içeren 90 µL (100 ppm) trikloroasetik asit (TCA) ile proteinler çöktürüldükten sonra pH 9.5 borat tamponunda SBD-F ile türevlendirme işlemi gerçekleştirilir. Ardından ortofosforik asitle pH 2.7'ye getirilmiş 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve % 5 metanol karışımından oluşan mobil faz ile izokratik elüsyonla 385 nm uyarılma, 515 nm emisyon dalga boylarında homosistein tayini yapılabilir. Şekil II.7'deki kromatogramda görüldüğü gibi homosistein - sistein ayrımı gerçekleştirilirken homosistein – sisteinilglisin ayrımı tam olarak yapılamamıştır [45].



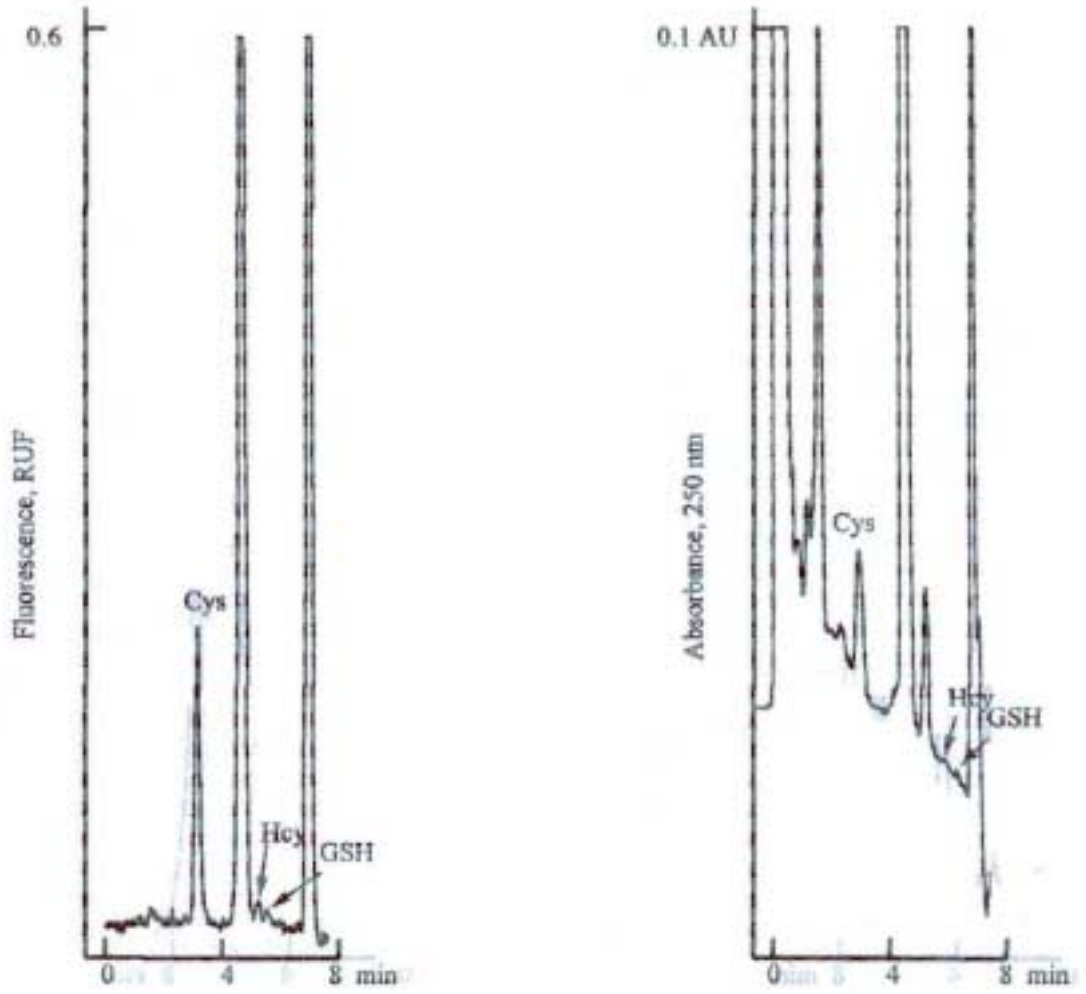
Şekil II.7 SBD-F / FD yöntemi ile tayin edilen homosistein (hCyS), sistein (Cys) ve sisteinilglisin (CysGly)'e ait kromatogram (a: 6.2 ve b:18.2  $\mu$ M homosistein.)

Tiyol gruplarının florimetrik dedeksiyonla tayininde kullanılan diğer bir ayıraç monobrombiman (mBrB)'dir. Monobrombiman, tiyollerle oda sıcaklığında ve pH 8.0'de kuvvetli floresans özellik gösteren tiyoeterlere dönüşür. mBrB'ın hiroliz ürünleri floresans özellik gösterdiğinden homosistein pikine girişim yapan pikler verir. Bu sebepten dolayı mBrB ile yapılan çalışmalarda izokratik elüsyon tercih edilmez. Gradient elüsyonla girişim yapan piklerin ayrılması sağlanır. Türevlendirici ayıraç olarak mBrB kullanıldığı durumlarda yaygın olarak kullanılan indirgen, sodyum borhidrür ( $\text{NaBH}_4$ ) olmasına rağmen trifenilfosfinle (TPP) yapılan çalışmalar da oldukça fazladır. Şekil II.9'da verilmiş olan kromatogramın elde edildiği koşullar şöyledir; TPP ile indirgenme işleminden sonra sülfosalisilik asit kullanılarak proteinlerin ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından homosistein, sistein ve glutatyon, A (30mM amonyum nitrat ve 40mM amonyum format içeren, pH 3.6) ve B (asetonitril) çözeltilerinin karışımından oluşan mobil faz kullanılarak gradient elüsyonla 1.5mL/dk akış hızıyla 10dk'da ayrılabilmiştir. Fakat şekilde de görüldüğü gibi ayırımın çok başarılı olduğu söylenemez. Homosistein, bu şartlar altında sisteinden kolaylıkla ayrılmasına karşın glutatyondan (GSH) tam olarak ayıramamıştır [27].



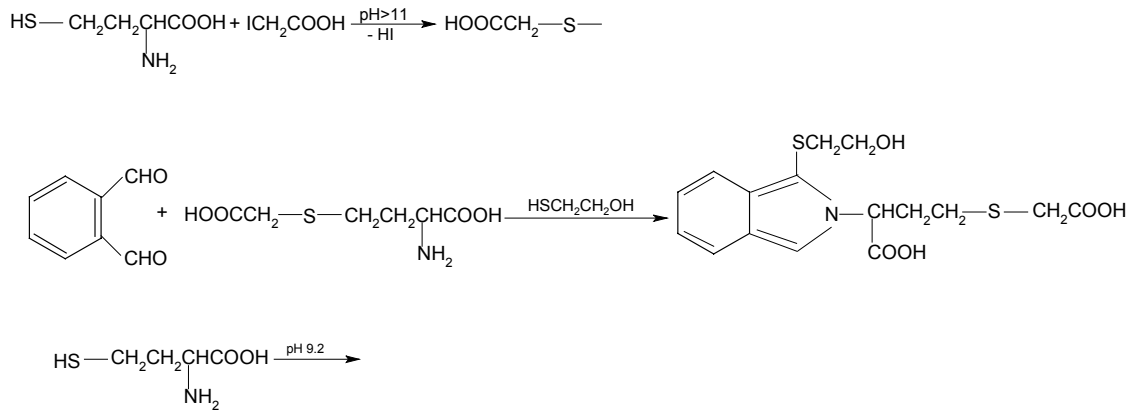


Şekil II.8 mBrB'nin yapısı ve hCys ile türevlenme reaksiyonu.



Şekil II.9 mBrB ile türevlendirilmiş Hcy, Cys ve GSH'un RP-HPLC / FD yöntemi ile tayinine ait kromatogram. 196.8 nmol/mL Cys için 2.98 dk, 8.4 nmol/mL Hcy için 5.10 dk ve 6.3 nmol/mL için 5.43 dk . FL: 300nm uyarılma, 470 nm emisyon.

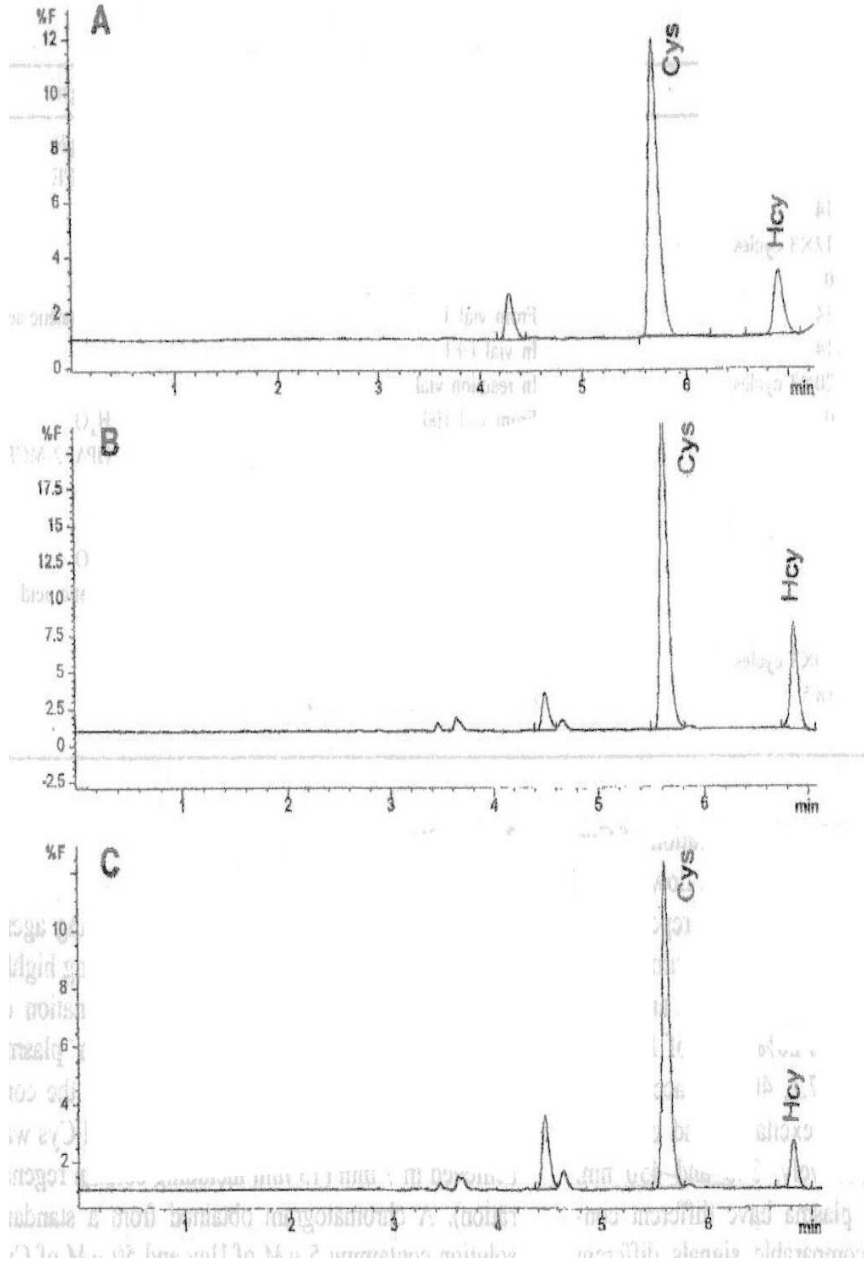
Homosisteinin florimetrik dedeksiyonla tayininde kullanılan ayıraçlardan birinin de *o*-fitalaldehit (OPA) olduğu yukarıda belirtilmişti. Homosisteinin dışındaki diğer aminotiyollerle ve amino asitlerle yapılan çalışmalarda da geniş bir pH aralığında başarılı sonuçlar elde edilmiştir [46,47]. OPA ile yapılan türevlendirme işlemlerin de en çok kullanılan indirgen 2-merkaptolanol (2-MCE)dür. Homosisteinin uygun bir ayıraçla meydana getirdiği türevinin floresans sinyal üretebilmesi için öncelikle serbest tiyol (-SH) formuna indirgendiğini ve bu grup üzerinden tüvelendiğini daha önceki çalışmalarda görmüştük. OPA’da durum biraz farklıdır. OPA amino asitlerin primer amin gruplarıyla reaksiyona girmektedir yani tiyol spesifik bir ayıraç değildir. Bu nedenle indirgenmiş olan homosistein iyodoasetik asitle reaksiyona sokulur. Böylece karboksimetilasyona uğramış olan serbest tiyol grubu bloke edilerek yükseltgenmesi de engellenmiş olur. Oluşan ürünün floresans sinyal üretebilmesi için 2-MCE’ye ihtiyaç vardır. Bu nedenle tüvelendirme işlemi iyodoasetik asitle karboksimetilasyonun ardından 2-MCE varlığında OPA ile yapılır. Bu yöntemde 2-MCE hem indirgenme adımında hem de tüvelendirme adımında kullanılmaktadır. Şekil II.10’da bu adımlar gösterilmektedir.



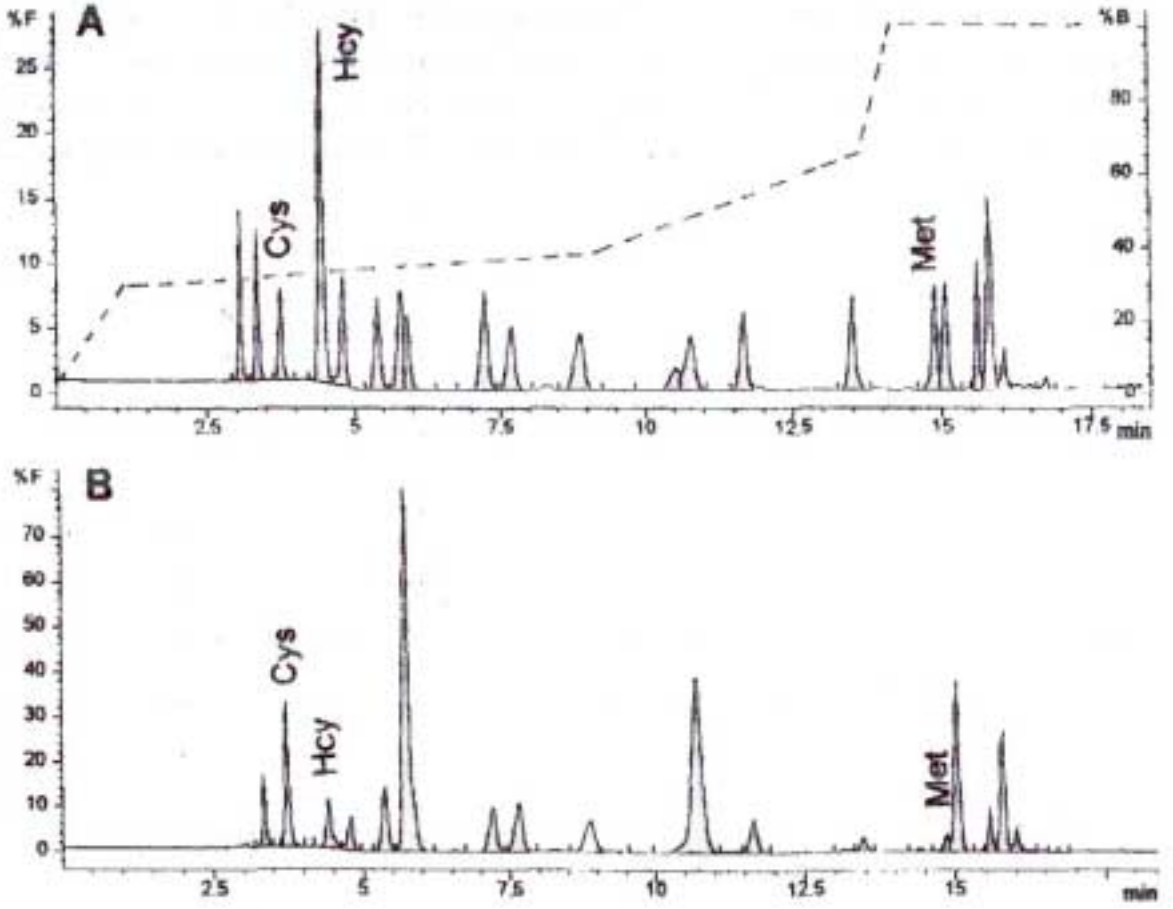
Şekil II.10 hCys’nin iodoasetik asitle karboksimetilasyonu ve MCE varlığında OPA ile tüvelendirilmesi. [19]

OPA ile yapılmış olan bu şekilde bir tüvelendirmenin ardından homosistein, yaklaşık olarak 8 dk’lık bir sürede mobil faz A ve B’den oluşan bir karışımla gradient elüsyonla 350 nm uyarılma, 450 nm emisyon dalga boylarında tayin edilebilmiştir.(Şekil II.11) (Mobil faz A: pH 7.2 20 mM sodyum asetat tamponu içeren %0.040 trietilamin (TEA) ve %0.4 tetrahidrofuran (THF) ve mobil faz B: pH 7.2 %20 100mM sodyum asetat,

%40 asetonitril (ACN) ve %40 metanol). Bu şartlar homosistein, sisteinden ayrılırken metiyoninden ayırlamamıştır. Ancak daha sonra yapılan başka bir çalışmada mobil faz B’de %20 ACN ve %60 metanol kullanılmasıyla yani ufak bir hacim oranı değişikliğiyle homosistein, sistein ve metioninden 18 dakikalık bir sürede ayrılabilmiştir. (Şekil II.12) [19]



Şekil II.11 Kromatogram A:5 $\mu$ M hCys ve 50 $\mu$ M Cys standart çözeltileri, Kromatogram B:5.9 toplam hCys ve 162 $\mu$ M toplam Cys, Kromatogram C:1.5 $\mu$ M serbest hCys ve 82 $\mu$ M Cys.



Şekil 2.12 Kromatogram A: hCys, Cys ve M'in standart çözeltilerine ait Kromatogram, B: hCys, Cys ve M'in plazmadaki miktarlarına ait kromatogram.

### II.2.2.3. Elektrokimyasal Dedeksiyonla Yapılan Tayinler

Elektrokimyasal dedeksiyonun, florimetrik ve spektrofotometrik dedeksiyona kıyasla en büyük avantajı ayırma ve türevlendirme işlemlerine gerek duyulmaksızın ölçümün doğrudan elektrot yüzeyinde yapılabilmesidir. Yaygın olarak bilinen elektrotlar arasında en çok kullanılanlar civa ve civa-amalgam elektrotlardır. Yöntem, civa ve homosistein arasındaki etkileşim sonucu elektrod yüzeyinde toplanan türlerin potansiyelinin ölçülmesine dayanır.



Öncelikli olarak elektrotta yükseltgen potansiyelde tutulur. Bu esnada meydana gelen reaksiyon yukarıda gösterilmektedir. Belirli bir süre sonra negatif potansiyel, bağlı civa iyonunun metale indirgenmesinin gerçekleştiği dolayısıyla analitik sinyalin alındığı süre boyunca taranır. Tiyol grubunun tayini için Au/Hg[48,49] elektrotların kullanımında da başarılı sonuçlar alınmıştır [1].

Elektrokimyasal dedeksiyonla yapılan çalışmalarda katı elektrod olarak civa kullanımı yaygın olmakla birlikte civa kullanılmadan yapılan çalışmalarda da başarılı sonuçlar alınmıştır. Bu tür çalışmalarda elektroanalitik dönüşümün gerçekleşebilmesi için elektronu aktaracak bir ortama gereksinim vardır. Bu amaçla karışık değerlikli metal kompleksleri kullanılır. Bunlar genellikle heksaziyanometalatlar (Fe / Fe, In / Fe, Ru / In / Fe, Co / Fe, Cu / Fe) ve metalofitalosiyeninler (Co / Cu) dir. Bu yöntemde öncelikli olarak homosistein yükseltgenirken metal kompleksi indirgenir. Ardından metal kompleksi tekrar yükseltgenerek elektrod yüzeyinde toplanır. Bu esnada akımda meydana gelen artış homosistein miktarına eşdeğerdir.

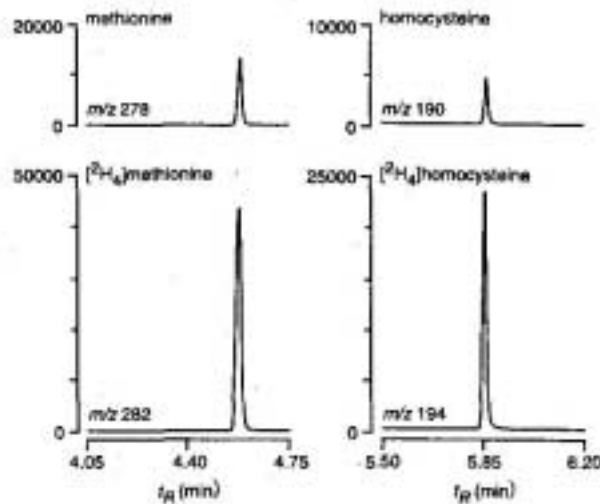
Kullanılan redoks ortamının zamanla elektrod yüzeyinden sıyrılmasından ötürü yöntem kararlı olamamaktadır. Bu sorunu gidermek için redoks ortamı karbon pastayla karıştırılarak elektrod içerisine yerleştirilir. Fakat yine de elektrotlarda meydana gelen bozulmalardan ötürü yöntem, çok güvenilir değildir [1].

### **II.2.3. Gaz Kromatografisi (GC) ile Homosistein Tayinleri**

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) yöntemi ile yapılan homosistein tayinlerinin kesinliği ve doğruluğu çok yüksek olmasına rağmen bu yöntemi uygulayan laboratuvarların sayısı azdır. Çünkü yöntemin dezavantajı gerek ekipman açısından gerekse kullanılan malzemeler açısından (örneğin kullanılan iç standartların 0.1 g'ı \$780 civarındadır) maliyetininin yüksek olmasıdır. Bunun yanısıra yöntemin güvenilirliği hakkında kuşku bulunmamaktadır. Günümüzde GC-MS ile homosistein tayini için çeşitli uygulamalar vardır. Stabler ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemde tersiyer-bütildimetilsilil türevleri oluşturularak homosistein tayini yapılabilmektedir. [50,51] Fakat <sup>29</sup>Si ve <sup>30</sup>Si yüksek zemin sinyali verdikleri için yöntemin kesinliği ve doğruluğu olumsuz yönde etkilenir. Husek ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemde ise alkil karbonatlar kullanılmıştır. Basit ve tek adımlı bir işlemle amin ve tiyol gruplarının

alkilasyonu ile karboksilik asit grubunun esterleşmesi aynı anda olmaktadır. Bu nedenle alkil karbonatlarla türevlendirme daha çok kullanım alanına sahiptir. Homosistein, *N(O,S)*-alkoksikarbonil alkil ester türevleri ve *N(O,S)*-etiloksikarbonil etil ester türevleri halinde GC-MS ile tayin edilebilmektedir. Buna karşın metiyoninin etiloksi-türevleri kimyasal iyonizasyon sırasında izobütanla  $[M+H-4]^+$  iyonu oluştururlar.  $[M+H-4]^+$  iyonu düşük yoğunlukta olmasına rağmen metiyonin tayinlerinin doğruluğunu azaltır. Benzer şekilde metiyoninin propiloksi ve izo-propiloksi-türevleri de  $[M+H-4]^+$  iyonu oluşturmaktadır. Fakat bütiloksi ve izo-bütiloksi-türevlerinde bu iyon oluşmaz. İzobütiloksikarbonil etil ester türevlerinin alıkonma zamanlarının bütiloksi-türevlerine oranla daha kısa olmaları nedeniyle en çok izobütiloksi-türevleri tercih edilir [3].

Bu yöntemle yapılmış olan çalışmalara bakıldığında en çok kullanılan indirgenin ditiyotritol olduğu görülmüştür. Daha az olmakla birlikte 2-merkaptolanol ile yapılan çalışmalar da vardır. Homosistein piki ile girişim yaptıkları için ditioeritritol ve tri-n-bütül fosfin indirgen olarak tercih edilmezler. DTT ile indirgenmenin ardından izobütül klorokarbonat kullanılarak metiyonin ve homosisteinin *N(O,S)*-izobütiloksikarbonil etil ester (IBC-OEt)leri elde edilir. Oluşturulan bu ürünler GC kolonunda ayrıldıktan sonra kütle spektrometresiyle tayin edilebilmişlerdir. Şekil II.13.'deki kromatogramda da görüldüğü gibi metiyonin 4.6 dakikada homosistein 5.85 dakikada tayin edilmiştir



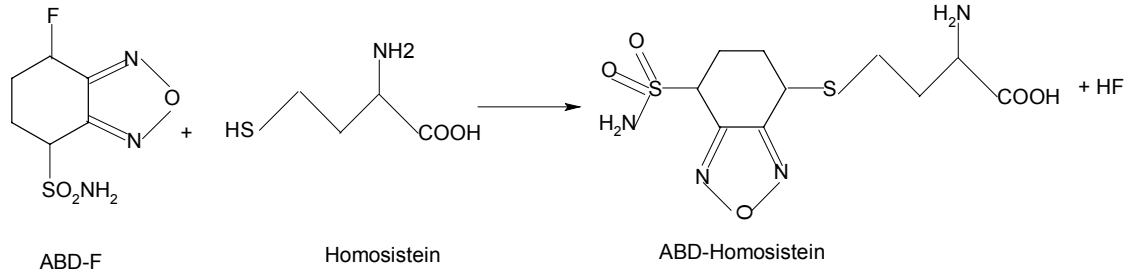
Şekil II.13 Üst kromatogramlar: plazmadaki GC-MS ile metiyonin ve toplam homosistein tayinine ait kromatogramlar, Alt kromatogramlar:  $[^2\text{H}_4]$ metiyonin ve  $[^2\text{H}_4]$ homosistein standartları [52].

#### **II.2.4. Kapiler Elektroferez (CE) ile Homosistein Tayinleri**

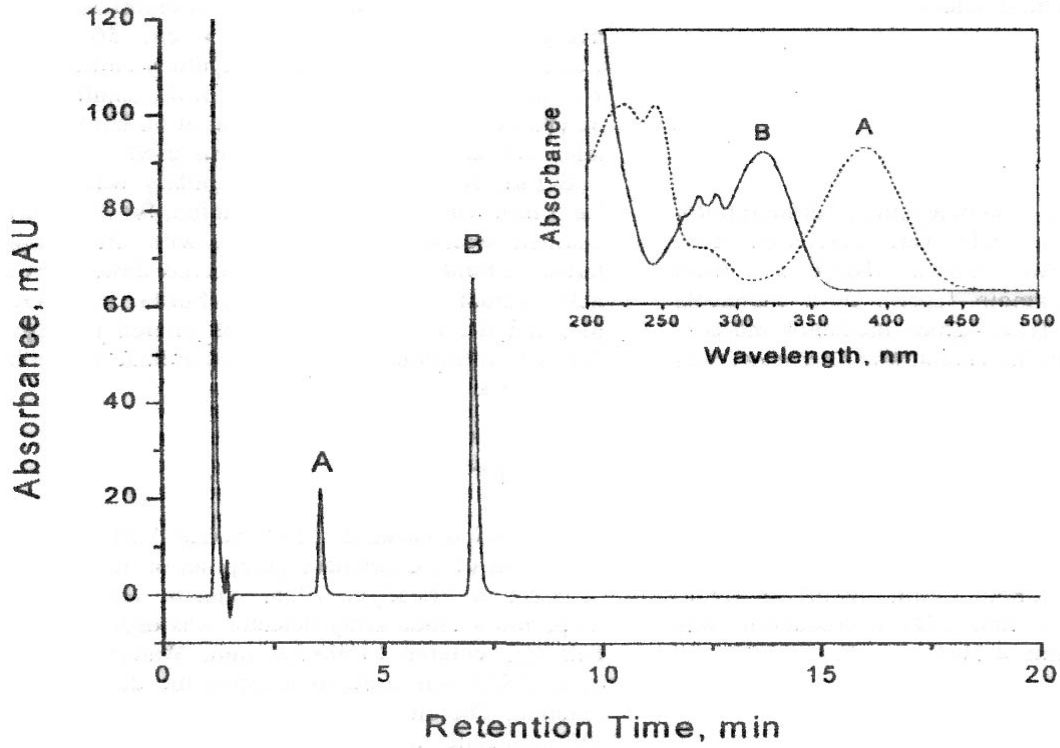
Son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte biyomoleküler analizlerin yapılabilmesi için klasik HPLC yöntemlerine alternatif olarak basit, hızlı ve etkili bir ayırma yöntemi olan kapiler elektroferez (CE)in kullanım alanında artış olduğu görülmüştür. Kapiler elektroferezle (CE) yapılan ilk çalışmalarda spektrofotometrik dedeksiyon kullanılmasına rağmen bu yöntemin plazmadaki homosistein tayini için yeterince hassas olmadığı tespit edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda daha duyarlı tayinler yapılabildiği için kapiler elektroferezde lazer indüktif floresans (LIF) dedeksiyonu kullanımı tercih edilmektedir [1].

##### *II.2.4.1. Spektrofotometrik Dedeksiyonla Yapılan Tayinler*

Kapiler elektroferez ile yapılan homosistein tayinlerinde fotometrik dedeksiyonla yapılan çalışmalarda yeterince duyarlı sonuçlar elde edilmediği bir önceki bölümde belirtilmişti. Buna rağmen homosistein, 4-aminosülfonil-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol (ABD-F) ile türevlendirilmesi sonucu CE yöntemi ile başarılı bir şekilde tayin edilebilmiştir. Bu çalışmada da önceki yöntemlerde olduğu gibi türevlendirilerek önce disülfürlerin indirgenmesi gerekir. Bunun için DDT kullanılmıştır. İndirgenmenin ardından pH 8.0'de borat tamponu kullanılarak ABD-F ile türevdirme işlemi yapılır. pH faktörünün ayırımı ne derece etkilediğini saptamak için çeşitli pH'larda çalışıldıktan sonra en iyi ayırımın pH 2.25'de gerçekleştiği görülmüştür. Şekil II.15'deki kromatogramda da açıkça görüldüğü gibi ABD-F ayırıcı kullanıldığında 3.1 dk'da homosisteinin,, 7.1 dk'da da ABD-F'nin kolonu terk ettiği görülmektedir. Ayırıcın tek başınayken 320 nm'de verdiği maksimum absorbanı homosisteinle reaksiyona girdikten sonra 380 nm'ye kaymıştır. Fakat aynı dalga boyunda homosisteininin sistein'den ayırımı gerçekleştirilememiştir. Bu çalışma sadece homosistein için spesifiktir.



Şekil II.14 hCys'nin ABD-F ile türevlendirme reaksiyonu.



Şekil II.15 ABD-homosisteine ait kromatogram. (A) ABD-homosistein, (B) ABD-F [53]

#### II.2.4.2. Lazer Floresans Dedeksiyonla Yapılan Tayinler

Tiyol gruplarının türevlendirilmesi için floresein izotiyosiyanat (FITC), 5-bromometilfloresein (5-BMF), floresein-5-maleimid (FM), 6-iodoasetamidofloresein (6-IAF) gibi pek çok türevlendirme ayıracı mevcuttur. Tablo II.3'de bu ayraçlara ait karakteristikler verilmiştir. Metiyonin yalnızca 5-BMF ile türevlendirilebilirken homosistein ve glutatyon yukarıda adları geçen diğer ayraçlarla da türevlendirilebilir.



Tablo II.3CE yönteminde kullanılan bazı florojenik ayıraçlara ait karakteristikler.

Ayıraç	Duyarlılık	Kararlılık	Seçicilik
Floresein izotiyosiyonat (FITC)	Yüksek	_____	Zayıf
5-Bromometilfloresein (5-BMF)	Yüksek	Yüksek	Düşük
Floresein-5-maleimid (FM)	Yüksek	Yüksek	Yüksek
6-iodoasetamidofloresein (6-IAF)	Yüksek	Yüksek	Yüksek

Bu ayıraçlar kullanılarak CE yöntemi ile yapılan tüm çalışmalarda basit ve hızlı bir türevlendirme adımından sonra doğru ve hassas sonuçlar elde edilebildiği görülmüştür [1,3].

#### II.2.4.3. Elektrokimyasal Dedeksiyonla Yapılan Tayinler

Yöntemde genellikle karbon ve soy metallere yapışmış elektrotlar kullanılmaktadır. Her ne kadar türevlendirmeye gerek duyulmadan doğrudan tayinler yapılabilir de HPLC-EC dedeksiyon yönteminde olduğu gibi CE-EC dedeksiyon yönteminin de kendine has bazı dezavantajları vardır. Yöntemin elektron transfer kinetiği oldukça yavaş olduğundan bu sorunu aşım kimyasal prosesi başlatmak için çok yüksek değerde potansiyele ihtiyaç vardır. Ayrıca elektrodun ayırımın yapıldığı voltajdan izole edilmesi ve kapillerle hizalanması gerekmektedir. Bu nedenlerden ötürü CE-EC dedeksiyon yöntemi HPLC-CE dedeksiyon yöntemine göre daha zordur [1].

#### II.2.5. İmmünojenik Yöntemler ile Homosistein Tayini

90'lı yıllarda homosistein tayinlerinin ne denli önemli olduğunun fark edilmesinin ardından yapılan çalışmalar sonucu geliştirilen yeni bir yöntem olan immünojenik analizler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1995 yılında Shipchandler ve Moore [54] tarafından uygulanan bu yöntemde proteinlere bağlı olan homosistein, enzimatik yoldan S-adenozil-L-homosistein hidrolaz (SAHase) ile S-adenozil-L-homosistein (SAH)'e dönüşür. Bu dönüşüm immünojenik yöntemlerin temelini oluşturmaktadır. Yöntemin floresan polarizasyon immünojenik (FPIA), kemilüminesans immünojenik (ICL), enzimatik immünojenik (EIA) olmak üzere üç türü vardır. Bu analizler otomatik analizör sistemleri ve ticari test kitleriyle gerçekleştirilmektedir.

Tablo II.4 İmmünolojik yöntemlere ait bazı karakteristik özellikler

	FPIA	ICL	EIA
<b>Dedeksiyon Sinyali</b>	Floresans	Enzimatik	Enzimatik
<b>İmmünoreaksiyonun hedefi</b>	SAH	SAH	SAH
<b>Örnek hacmi</b>	50 µL	15 µL	25 µL
<b>İşlem süresi</b>	60 dk	70 dk	150 dk
<b>Sistemin kalibrasyon periyodu</b>	> 2 hafta	2 hafta	Her deneme

### II.3. TÜREV SPEKTROFOROMETRİSİ

Ultraviyole-görünür bölde absorpsiyon spektroskopisi yapısal ve analitik problemlerin bir bölümünün çözümünde çok faydalı olan analiz tekniklerinden biridir. Bazı durumlarda bir çözeltide bileşenlerin UV-görünür bölge spektroskopisi ile kantitatif tayini, spektral benzerlikler ve bir bileşenin zayıf absorpsiyon bandının diğer bileşenlerin güçlü absorpsiyon bandları ile örtülmesi sebebiyle zorlaşır. Bu durumda türev spektrumları çok faydalı olmuştur [55]. Türev uygulamaları bu sorunların tümüne birden belli oranda çözüm getirebilmekte, karakteristik pikleri az olan spektrumların ayırım gücünü büyük oranda arttırmaktadır.

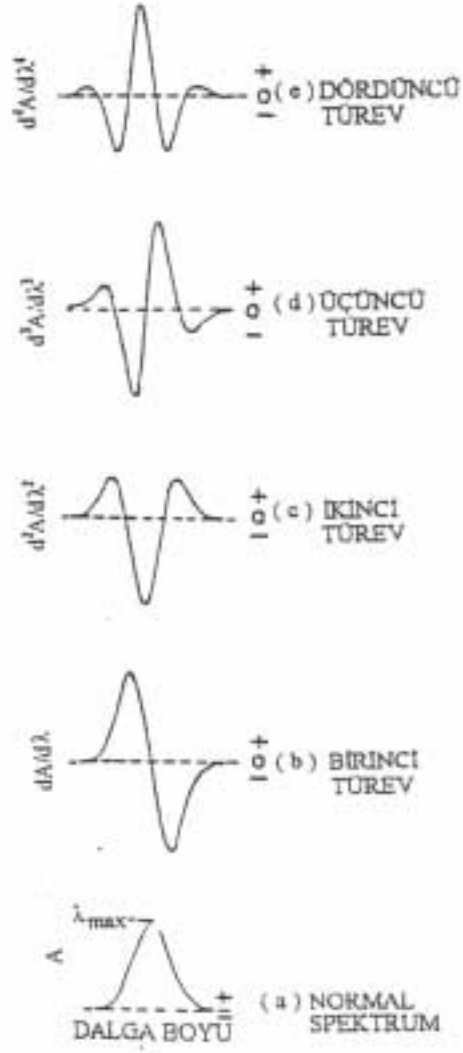
Türev spektrofotometrisi 1950'li yıllarda spektrumlardaki ayrıntıların belirginleşmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır [56-59]. Giese ve French [60] 1955 yılında bitki fotokimyasında pigmentlerin spektrumunun incelenmesinde kullanmışlardır. Bir yıl sonra Collier ve Singleton [61] 2. derece ve daha yüksek dereceli türev spektrumu ile IR spektroskopisinin kullanım fikrinin patentini aldılar. Türev spektrofotometrisi zaman içinde, ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektrofotometrisi, IR ve Raman spektrofotometrisi, NMR spektrometrisi, ESR spektrometrisi, Alev emisyon ve absorpsiyon spektrometrisi, Lüminesans spektrometrisi, Gaz kromatografisi, Polarografi, Elektroanalitik yöntemler ve reaksiyon kinetiklerinin incelenmesi gibi çeşitli analitik işlemlerde kullanılmıştır [55].

Türev spektroskopisinin temeli klasik absorpsiyon spektrumlarının yerine türev spektrumlarının kullanılmasıdır. Türev spektrumu elde etmek için iki yöntem kullanılır: Dalga boyu modülasyon yöntemi ve konvansiyonel spektrofotometreden alınan sinyalin elektronik proseslerle kaydedilmesi.

Türev spektrumlarının oluşturulması için gerekli olan matematiksel işlemlerin uzun ve güç olması nedeniyle yöntemin analitik kimyadaki önemli uygulamaları ancak analitik cihazların bilgisayar ile donatılmasından sonra büyük gelişme göstermiştir.

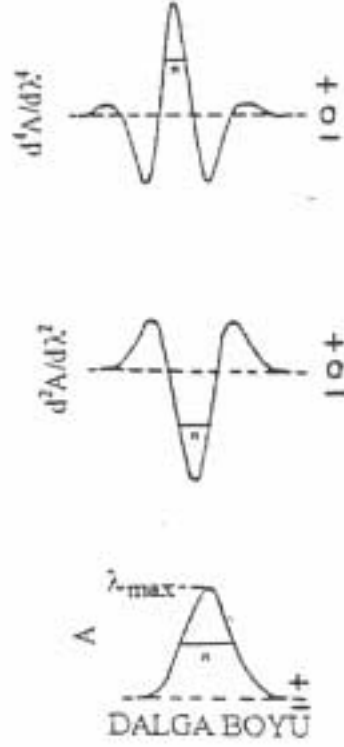
### II.3.1. Türev Spektrumları

Birinci türev absorpsiyon spektrumu dalga boyuna karşı çizilen absorptans türevi eğrisidir. Buna benzer şekilde 2.,3., ...n. derece türev spektrumları sırasıyla  $d^2A/d\lambda^2$ ,  $d^3A/d\lambda^3$ , ...,  $d^nA/d\lambda^n$ , değerleri ile dalga boyu arasındadır. Şekil II.16'da basit bir pikin 1-4. türev spektrumları verilmiştir. Bir pikin 1. derece türevi alındığında yükselen bölgeler pozitif, inen bölgeler negatif değerler oluşturmakta, dönüm noktalarının bulunduğu dalga boylarında ekstremumlar oluşmakta, orijinal pikteki ekstremumların karşılığı olan dalga boylarında ise türev eğrisi sıfırdan geçmektedir. Orijinal spektrumdaki bir pike karşılık n. türev spektrumunda n+1 adet pik oluşmakta, türevin derecesi arttıkça pikler keskinleşmekte ve daralmaktadır. Orijinal spektrumda absorpsiyon maksimumunun bulunduğu dalga boyunda 2. türev spektrumunda bir minimum, 4.türev spektrumunda bir maksimum ortaya çıkmakta, 1. ve 3. türev spektrumları ise bu dalga boyunda sıfırdan geçmektedir. Türev derecesi arttıkça piklerin keskinleşmesi ve daralmasıyla rezolüsyon (ayrışma) artmaktadır. Bu durumdan spektrumların ince yapısının aydınlatılmasından yararlanır ki bu durum saflık testleri ve maddelerin belirlenmesinde önemlidir.



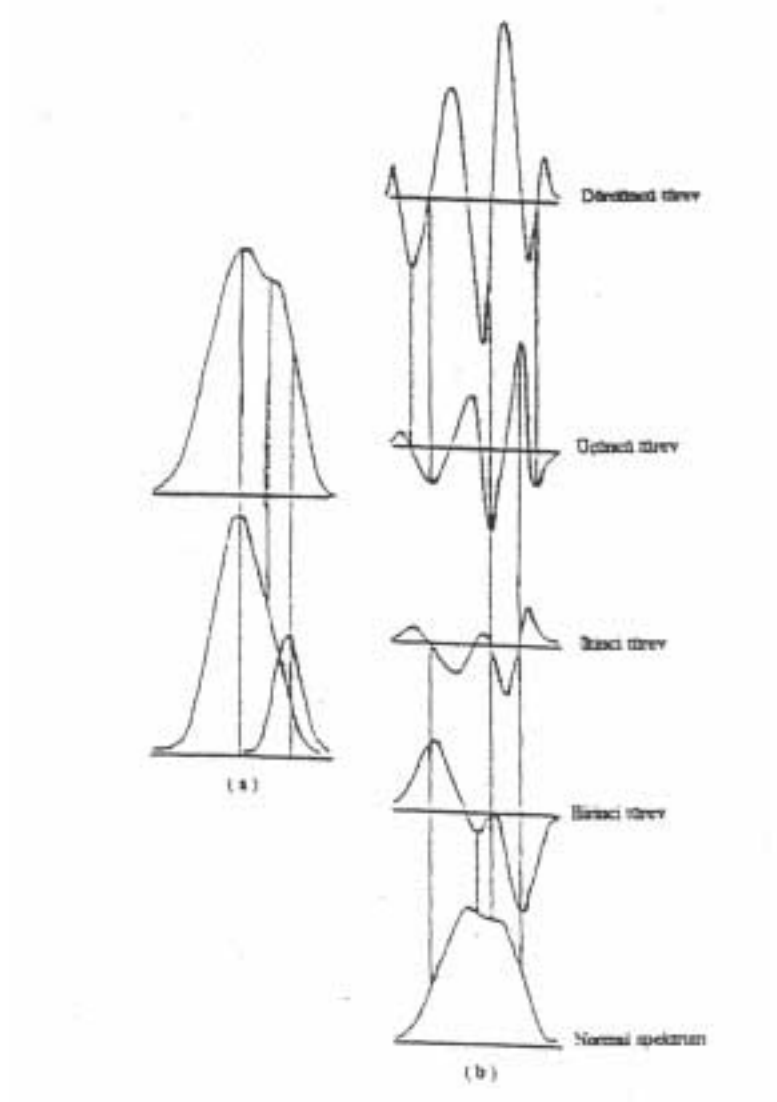
Şekil II.16 Bir pikin UV ve 1.-4. türev spektrumlarında karakteristik görünümleri

Şekil II.17'de görüldüğü gibi orijinal absorpsiyon pikinin yarı genişliği % 30-40 oranında azalmaktadır.



Şekil II.17 Türev derecesine bağlı olarak pik genişliğinin azalması

Orjinal spektrumda bulunan omuzlar tek sayılı türev spektrumlarında ekstremumlara dönüşmektedir. Bundan çıkan piklerin çözülmesinde yararlanır (Şekil II.18). Şekil II.18'de görüldüğü gibi iki maddenin absorpsiyon pikleri üst üste geldiği zaman orijinal spektrumda küçük bir omuz şeklinde görünür. Tek dereceli türev spektrumlarının alınmasıyla oluşan ekstremumlar her iki maddenin diğerinin etkisi olmaksızın kantitatif tayinine olanak sağlar. Bu durum eser analizlerde önemlidir.



Şekil II.18 (a) Çakışan iki pik, (b) çakışan iki pikin UV spektrumu ve 1.-4. türev spektrumları ile ayrılması.

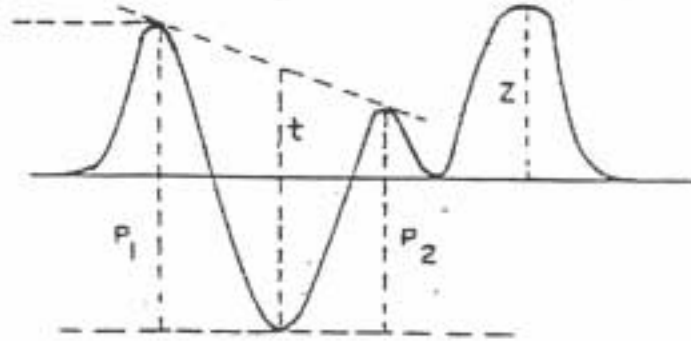
### II.3.1.1. Kantitatif Analizler İçin Türev Spektrumlarının Değerlendirilmesi

Absorpsiyon spektrumlarında herhangi bir dalga boyunda Beer yasası geçerli ise ( $A = \epsilon cl$ ), n. Dereceden türev spektrumunda türev genliği ya da Türev absorpsiyonu  ${}^nT$  aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$${}^nT = d^n A / d\lambda^n = (d^n \epsilon / d\lambda^n) cl$$

Görüldüğü gibi Beer yasasının geçerli olması koşuluyla türev absorpsiyon değerleri ile derişim arasında doğrusal bir ilişki vardır. Türev Spektrofotometrisi ile kantitatif analizin temelini bu eşitlik oluşturur. Klasik spektrofotometride derişim ile absorpsiyon arasında oluşturulan standart eğriler türev spektrofotometrisinde standart çözeltilerin derişimi  $\odot$  ile karşılık olan türev absorpsiyon değerleri ( ${}^nT$ ) arasında hazırlanır[55].

Türev absorpsiyon değerlerinin ölçülmesinde çeşitli teknikler uygulanmaktadır.



Şekil II.19 Kantitatif analizler için türev spektrumlarını değerlendirme yöntemleri

t: Teğet yöntemi

z: Pik-sıfır yöntemi

P1,P2: Pik-pik yöntemi

P1:P2: Pik-pik oranı yöntemi

**Teğet Yöntemi:** Birbirini izleyen iki maksimum ya da iki minimuma ortak teğet çizilir. Bu teğetin aradaki ekstremuma olan uzaklığı ordinata paralel olarak ölçülür (t) (Şekil II.19) Bu yöntem doğrusal bir zemin olduğu zaman daha doyurucu sonuçlar verir ve zeminin spesifik olmayan etkilerinin ortadan kaldırılmasında ya da azaltılmasında yararlanılır [62].

**Pik-pik Yöntemi:** Birbirini izleyen iki ekstremum arasındaki uzaklık, ordinata paralel olarak ölçülür (P1 veya P2). Bu yöntem genellikle zemin absorbansının giderilmesinde ve çok bileşenli karışımların kantitatif analizinde kullanılmaktadır.

**Pik-sıfır Yöntemi:** Peak-zero ya da zero-crossing yöntemi olarak adlandırılan bu teknik pik tepesinin apsise olan uzaklığının ordinata paralel olarak ölçülmesidir (z). Çok bileşenli karışımların analizinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Apsise göre simetrik sinyaller içeren yüksek türevlerin değerlendirilmesinde ve birbiri üzerine binen eğrilerden birinin sıfırdan geçtiği durumlarda uygundur.

**Pik-pik Oranı Yöntemi:** Birbirine komşu iki pikin yüksekliğinin oranı alınır (P1:P2). Bu teknik ikili karışımların kantitatif analizinde kullanılır. Çalışma eğrisi yapay karışımların bağıl derişimleri ile pik-pik oranları arasında hazırlanır [55].



### **.III. MALZEME VE YÖNTEM**

#### **III.1. DENEYLERDE KULLANILAN ALETLER**

Spektrofotometrik ölçümler 1 cm ışımaya yollu kuvarz küvet kullanılarak Varian 100 CARY 1E Ultraviyole-Görünür bölge spektrofotometresi ile gerçekleştirildi. Tartımlar, Shimadzu AX200 analitik terazide yapıldı. Güç çözünen maddelerin çözeltilerinin hazırlanmasında Branson 221 ultrasonik banyo kullanıldı. Çözeltilerin pH'ları Metrohm E-512 PH metre kullanılarak ölçüldü ve gerektiğinde ayarlandı.

#### **III.2. KİMYASAL MADDELER**

DL-Homosistein (hCys), alanin, arginin, glisin, lizin, serin, valin (Sigma), L-sistein (Cys), DL-metiyonin (Met) (Merck), glutamin, prolin (Fluka), o-fitalaldehit (OPA) (Fluka), sodyumtetraborat (boraks)( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma), % 99.7(w:v)'lik metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Riedel-de Haën), hidroklorik asit (HCl) (Merck), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck) kullanılmıştır.

#### **III.3. HAZIRLANAN ÇÖZELTİLER**

Yapılan çalışmalarda günlük olarak hazırlanmış homosistein, sistein, metiyonin ve OPA çözeltileri kullanıldı. Tüm çözeltiler azot gazı geçirilmiş distile suda hazırlandı.

**Homosistein çözeltisinin hazırlanması :** 0.014 g homosistein, 1 mL 1 M HCl'de çözülerek distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Elde edilen  $1.0 \times 10^{-3}$  M homosistein stok çözeltisinden  $\frac{1}{2}$  saat azot gazı geçirildikten sonra gerekli seyreltme yapılarak  $2.0 \times 10^{-4}$  M homosistein çözeltisi hazırlandı.

**Sistein çözeltisinin hazırlanması:** 0.0122 g sistein, 3 mL 1 M HCl'de çözülerek distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Elde edilen  $1.0 \times 10^{-3}$  M sistein stok çözeltisinden  $\frac{1}{2}$  saat azot gazı geçirildikten sonra gerekli seyreltme yapılarak  $6.0 \times 10^{-4}$  M sistein çözeltisi hazırlandı.

**Metiyonin çözeltisinin hazırlanması:** 0.015 g metiyonin 100 mL distile su ile çözüldü. Elde edilen  $1.0 \times 10^{-3}$  M metiyonin stok çözeltisinden gerekli seyreltme yapılarak  $6 \times 10^{-4}$  M sistein çözeltisi hazırlandı.

**Alanin, arginin, glisin, glutamin, lizin, prolin, serin, treonin ve valin çözeltilerinin hazırlanması:** Her bir amino asit için uygun miktar tartılıp distile su ile çözülerek  $2.0 \times 10^{-3}$  M derişimlerinde çözeltiler hazırlandı.

***o*-fitalaldehit (OPA) çözeltisinin hazırlanması:** 0.027 g *o*-fitalaldehit üzerine 90 mL (1:1) (v:v) metanol:su karışımı ilave edilerek çözünenin tamamlanması için 2 dk  $50^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda bekletilip oda sıcaklığına soğutulan çözelti, hacmine aynı karışımla tamamlandı.

**pH 10  $\text{NaHCO}_3$ -NaOH tampon çözeltisinin hazırlanması:** 50 mL 0.05 M  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisine 10.7 mL 0.1 M NaOH eklendikten sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**pH 10 NaOH- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  tampon çözeltisinin hazırlanması:** 50 mL 0.25 M boraks çözeltisine 18.3 mL 1 M NaOH eklendikten sonra hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**Boraks tampon çözeltilerinin hazırlanması:**  $6.25 \times 10^{-2}$  M boraks (pH 9.2) çözeltisi hazırlandıktan sonra 3 M HCl ve/veya 3M NaOH ile pH'sı 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 ve 10.5 olan tampon çözeltileri hazırlandı.

### III.4. YAPILAN DENEMELER

#### III.4.1. Türevlendirme İçin Uygun pH'nın Belirlenmesi

3 mL  $2.0 \times 10^{-4}$  M homosistein ile 3 mL  $2.0 \times 10^{-3}$  M OPA çözeltilerinden oluşan karışımların (1:10 hCys:OPA mol oranında) üzerine 2şer mL pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.2, 9.5, 10.0 ve 10.5 boraks tampon çözeltileri ilave edilerek 600 nm-200 nm arasında spektrumları çizildi.

### III.4.2. Uygun Tampon Çözeltinin Belirlenmesi

3 mL  $2 \times 10^{-4}$  M homosistein ile 3 mL  $2 \times 10^{-3}$  M OPA çözeltilerinden oluşan üç ayrı karışımın (1:10 hCys:OPA mol oranında) birincisine 2 mL pH 10  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$  tamponu, ikincisine 2 mL pH 10  $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  tamponu, üçüncüsüne 2 mL derişik  $\text{NaOH}$  ile pH'ı 10'a getirilmiş boraks çözeltisi tamponu ilave edilerek 600 nm-200 nm arasında spektrumları çizildi.

### III.4.3. hCys-OPA Türevinin Molar Bileşiminin ve Uygun OPA Miktarının Belirlenmesi

#### III.4.3.1. Job Yöntemi

Aynı derişimde ( $1.0 \times 10^{-4}$  M) homosistein ve OPA çözeltileriyle toplam hacim ( $V_T = 12$  mL) değişmeyecek şekilde hazırlanmış olan aşağıda görölen karışımların absorbansları, her biri için ayrı ayrı hazırlanan referanslara karşı 280 nm'de okundu.

$2.0 \times 10^{-4}$ M homosistein	$2.0 \times 10^{-3}$ M OPA	pH 9.2 boraks
10 mL	0 mL	2 mL
9 mL	1 mL	2 mL
8 mL	2 mL	2 mL
7 mL	3 mL	2 mL
6 mL	4 mL	2 mL
5 mL	5 mL	2 mL
4 mL	6 mL	2 mL
3 mL	7 mL	2 mL
2 mL	8 mL	2 mL
1 mL	9 mL	2 mL
0 mL	10 mL	2 mL

#### III.4.3.2. Mol Oranı Yöntemi

$1.0 \times 10^{-4}$  M Homosistein ve  $1.0 \times 10^{-3}$  M OPA çözeltileri kullanılarak toplam hacim 8 mL olacak şekilde sabit homosistein miktarına karşılık değişen mol oranlarında OPA

çözeltisi eklenerek hazırlanan örneklerin absorbansları, her biri için ayrı ayrı hazırlanan referanslara karşı 280 nm’de okundu. Değişen OPA miktarından dolayı eksik kalan hacimler (1:1) (v:v) metanol:su çözeltisi ile tamamlandı.

$1.0 \times 10^{-4}$ M hCys	$1.0 \times 10^{-3}$ M OPA	(1:1)(v:v) metanol:su	pH 9.2 boraks
2 mL	0.2 mL	3.8 mL	2 mL
2 mL	0.4 mL	3.6 mL	2 mL
2 mL	1.0 mL	3.0 mL	2 mL
2 mL	2 mL	2.0 mL	2 mL
2 mL	3 mL	1.0 mL	2 mL
2 mL	4 mL	0 mL	2 mL

#### III.4.4. hCys, Cys ve met-OPA Türevlerinin Kararlılıklarının Belirlenmesi

Amino asit-OPA türevlerinin kararlılığının belirlenmesi için, hazırlanmış olan karışım çözeltilerinin absorbansları 5, 15, 30, 45 dakika ve 24 saat sonra herbiri için seçilen çalışma dalga boylarında okundu.

#### III.4.5. hCys, Cys ve met için Çalışma Grafiklerinin Çizilmesi

$2.0 \times 10^{-4}$  M homosistein çözeltisinin farklı miktarları üzerine sabit miktarlarda  $2.0 \times 10^{-3}$  M OPA (en düşük homosistein çözeltisinin 15 katı olacak şekilde) çözeltisi eklenerek hazırlanan örneklerin, pH 9.2’de normal ve ikinci türev absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerleri ile hCys derişimleri arasında çizilen çalışma grafiğinden homosistein için doğrusallık aralığı ve analiz için seçilen dalga boylarındaki doğru denklemleri belirlendi.

$6.0 \times 10^{-4}$  M sistein ve  $2.0 \times 10^{-3}$  M OPA (en düşük sistein çözeltisinin 5 katı olacak şekilde) çözeltileriyle hazırlanan örneklerin, pH 9.2’de normal ve ikinci türev absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerleri ile Cys derişimleri arasında çizilen çalışma grafiğinden sistein için doğrusallık aralığı ve analiz için seçilen dalga boylarındaki doğru denklemleri belirlendi.

$6.0 \times 10^{-4}$  M metiyonin ve  $2.0 \times 10^{-3}$  M OPA (en derişik metiyonin çözeltisinin 3.3 katı olacak şekilde) çözeltileriyle hazırlanan örneklerin, pH 9.2'de normal ve ikinci türev absorbands değerleri okundu. Okunan absorbands değerleri ile metiyonin derişimleri arasında çizilen çalışma grafiğinden metiyonin için doğrusallık aralığı ve analiz için seçilen dalga boylarındaki doğru denklemleri belirlendi.

#### **III.4.6. hCys, Cys ve met Tayinlerinin % Rölatif Standart Sapma Değerleri**

Homosistein miktarı  $12.5 \mu\text{M}$ 'a eşdeğer olacak şekilde 10 adet örnek hazırlandıktan sonra pH 9.2'de referansa karşı 280 nm'de normal, 280 ve 300 nm'lerde ikinci türev absorbandsları okundu.

$56.0 \mu\text{M}$ 'a eşdeğer sistein içeren ( $V_T=8$  mL) 10 adet örnek hazırlandıktan sonra pH 9.2'de referansa karşı 273 nm'de normal 265 nm'de türev absorbandsları okundu.

$150 \mu\text{M}$ 'a eşdeğer metiyonin içeren 10 adet örnek hazırlandıktan sonra pH 9.2'de referansa karşı 244 nm'de normal 300 nm'de türev absorbandsları okundu.

#### **III.4.7. hCys, Cys ve met Tayinlerinin LOD ve LOQ Değerlerinin Belirlenmesi**

Hazırlanan 11 adet boş çözeltiden biri referans kabul edilerek diğer on tanesinin çalışma dalga boylarında normal ve ikinci türev absorbands değerleri okundu.

#### **III.4.8. Bazı Amino Asitlerin Bozucu Girişim Etkilerinin İncelenmesi**

hCys'in molce 10 katı alanin, arginin, glisin, glutamin, lizin, prolin, serin, treonin ve valin'in hCys tayinine bozucu etkileri 0.5 mL  $2.0 \times 10^{-4}$  M hCys çözeltisine 0.5 mL  $2.0 \times 10^{-3}$  M amino asit çözeltisi, 2 mL distile su, 3 mL  $2.0 \times 10^{-3}$  M OPA ve 2 mL boraks çözeltisi eklenip ikinci türev absorbands değerlerinin ölçülmesi ile incelendi.

#### **III.4.9. Geliştirilen Yöntemin Sentetik Karışıma Uygulanması**

3 mL ( $37.5 \mu\text{M}$  hCys,  $37.5 \mu\text{M}$  met ve  $75.0 \mu\text{M}$  Cys içeren) sentetik karışıma 3 mL  $2 \times 10^{-3}$  M OPA ve 2 mL boraks tampon çözeltisi eklendikten sonra karışımın spektrumu referansa karşı çizildi.

#### III.4.10 Geliştirilen Yöntemin Plazmaya Uygulanması

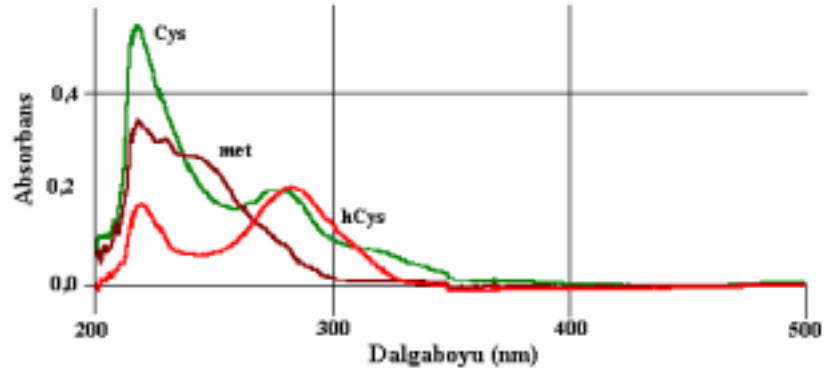
Yöntemimizin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla plazma örneği, plazmada toplam homosistein tayininin yapıldığı bir laboratuarda\* analiz edildi. Yapılan tahlil sonucunda plazmadaki toplam homosistein miktarının 8.6  $\mu\text{M}$  olduğu görüldü. Bu değer bizim tayin limitlerimizin altında olduğundan bilinen derişiminde homosistein eklenmiş plazmaya yöntemimiz uygulandı. Yapılan denemede öncelikle disülfürlerin indirgenmesi için 1 mL plazma (0.1 mL  $2 \times 10^{-43}$  M hCys ilave edilen) üzerine asetonitrilde çözülmüş 0.5 mL %1'lik DTT eklendi.ve oda sıcaklığında ½ saat beletildi. Ardından proteinlerin çöktürülmesi için 2 mL %10'luk TCA eklendikten 10 sn'ye vortekslenen karışım 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi [52] Elde edilen süpernetanta yöntemimiz uygulandı. Elde edilen süpernetantın 3 mL'si üzerine, 3 mL  $2 \times 10^{-3}$  M OPA ve 2 mL boraks çözeltisi eklendikten sonra karışımın spektrumu referansa karşı çizildi.

---

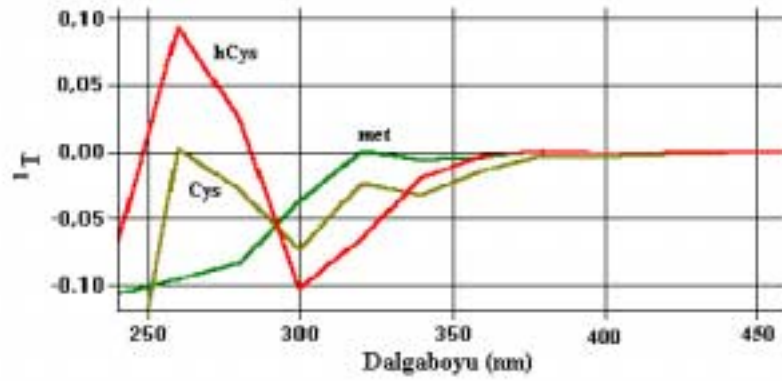
\* ÜROLAB, TIBBİ TAHLİL LABORATUARI

## IV. BULGULAR

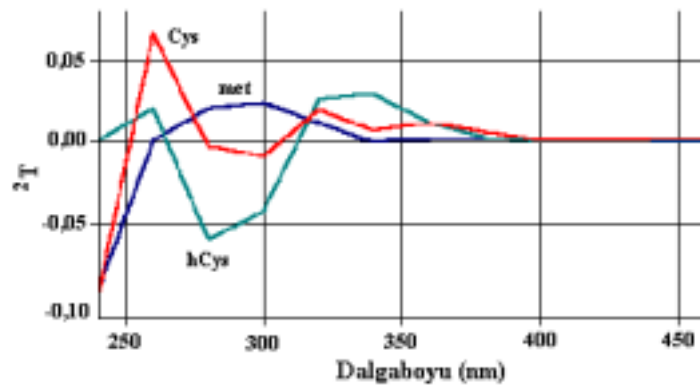
### IV.1. hCys-, Cys-, met-OPA TÜREVLERİNİN NORMAL, 1. VE 2. TÜREV SPEKTRUMLARI



Şekil IV.1 12.5  $\mu\text{M}$  hCys, 56.0  $\mu\text{M}$  Cys ve 150  $\mu\text{M}$  met'in normal spektrumları

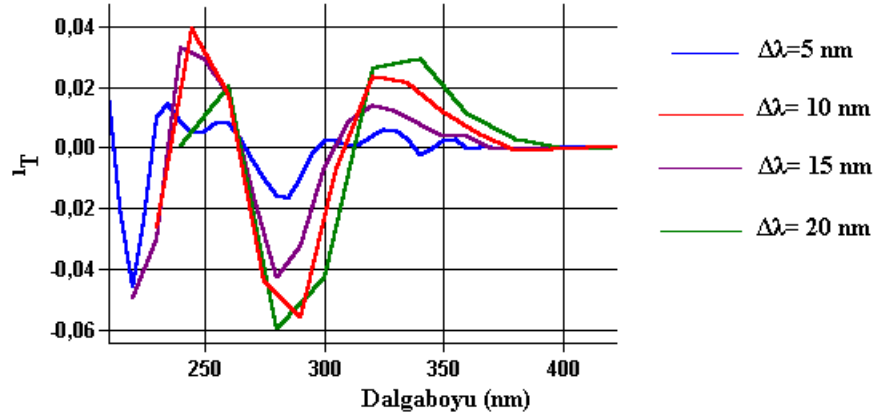


Şekil IV.2 12.5  $\mu\text{M}$  hCys, 56.0  $\mu\text{M}$  Cys ve 150  $\mu\text{M}$  met'in birinci türev spektrumları

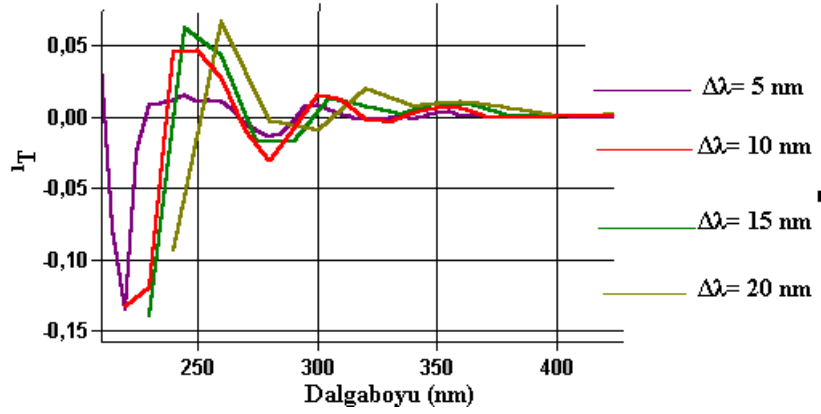


Şekil IV.3 12.5  $\mu\text{M}$  hCys, 56.0  $\mu\text{M}$  Cys ve 150  $\mu\text{M}$  met'in ikinci türev spektrumları

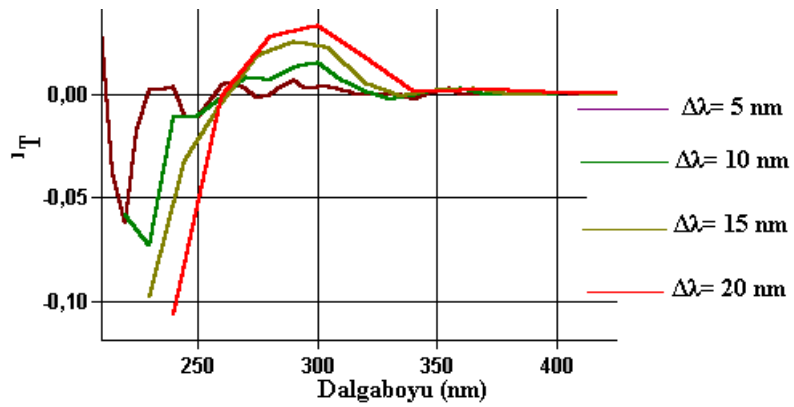
## IV.2. TÜREV SPEKTRUMLARINDA UYGUN $\Delta\lambda$ DEĞERİNİN SAPTANMASI



Şekil IV.4. 12.5  $\mu\text{M}$  hCys'in ikinci türev spektrumu



Şekil IV.5. , 56.0  $\mu\text{M}$  Cys'in ikinci türev spektrumu



Şekil IV.6. , 150  $\mu\text{M}$  met'in ikinci türev spektrumu

Çalışmamızda daha yüksek duyarlılık (daha yüksek türev absorbans değerleri) nedeniyle  $\Delta\lambda=20$  nm tercih edildi.



### IV.3.1. TÜREVLENDİRME İÇİN UYGUN PH VE TAMPONUN BELİRLENMESİ

Türevlendirme ayırıcı olarak OPA'nın kullanıldığı yayınlara bakıldığında türevlendirmenin genellikle pH 10da meydana geldiği görülmüştür [19,20,28]. Buradan yola çıkılarak farklı pH 10 tamponlarının türevlendirme üzerine etkisini incelemek amacıyla 3 mL  $2 \times 10^{-4}$  M homosistein ile 3 mL  $2 \times 10^{-3}$  M OPA çözeltilerinden oluşan üç ayrı karışımın(1:10 hCys:OPA mol oranında) birincisine 2 mL pH 10  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$  tamponu, ikincisine 2 mL pH 10  $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  tamponu, üçüncüsüne 2 mL derişik  $\text{NaOH}$  ile pH'ı 10'a getirilmiş boraks tamponu ilave edilerek 600 nm-200 nm arasında spektrumları çizildi. 2 mL  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$  tamponunun yeterli gelmediği görüldüğünden 5 mL  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$  tamponu kullanılarak çalışmalara devam edildi.  $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$  tamponu ile edilen absorbansın boraks tamponlarıyla elde edilenlere göre düşük olmasından dolayı boraks tamponlarının daha uygun olduğuna karar verildi (Tablo IV.1). Boraks tamponu kullanılarak yapılan türevlendirmelerde en uygun pH'yı tespit etmek amacıyla ise pH 8.0-10.5 aralığında hazırlanmış olan tamponlarla denemeler yapıldı. Tablo IV.2'de görüldüğü gibi  $6.25 \times 10^{-2}$  M boraks çözeltisinin kendi pH'ı olan 9.2 ile bu molaritedeki boraks çözeltisine HCl ilavesiyle elde edilen pH 9.0'da okunan absorbans değerleri arasında önemli bir fark görülmediğinden kolaylık açısından pH 9.2 çalışma pH'ı olarak seçildi.

Tablo IV.1 Farklı pH 10 tamponların absorbans üzerine etkileri

	2mL $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	5 mL $\text{NaHCO}_3 + \text{NaOH}$	2mL Derişik $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
Absorbans	0.30	0.26	0.34

Tablo IV.2 pH ile absorbans değişimi

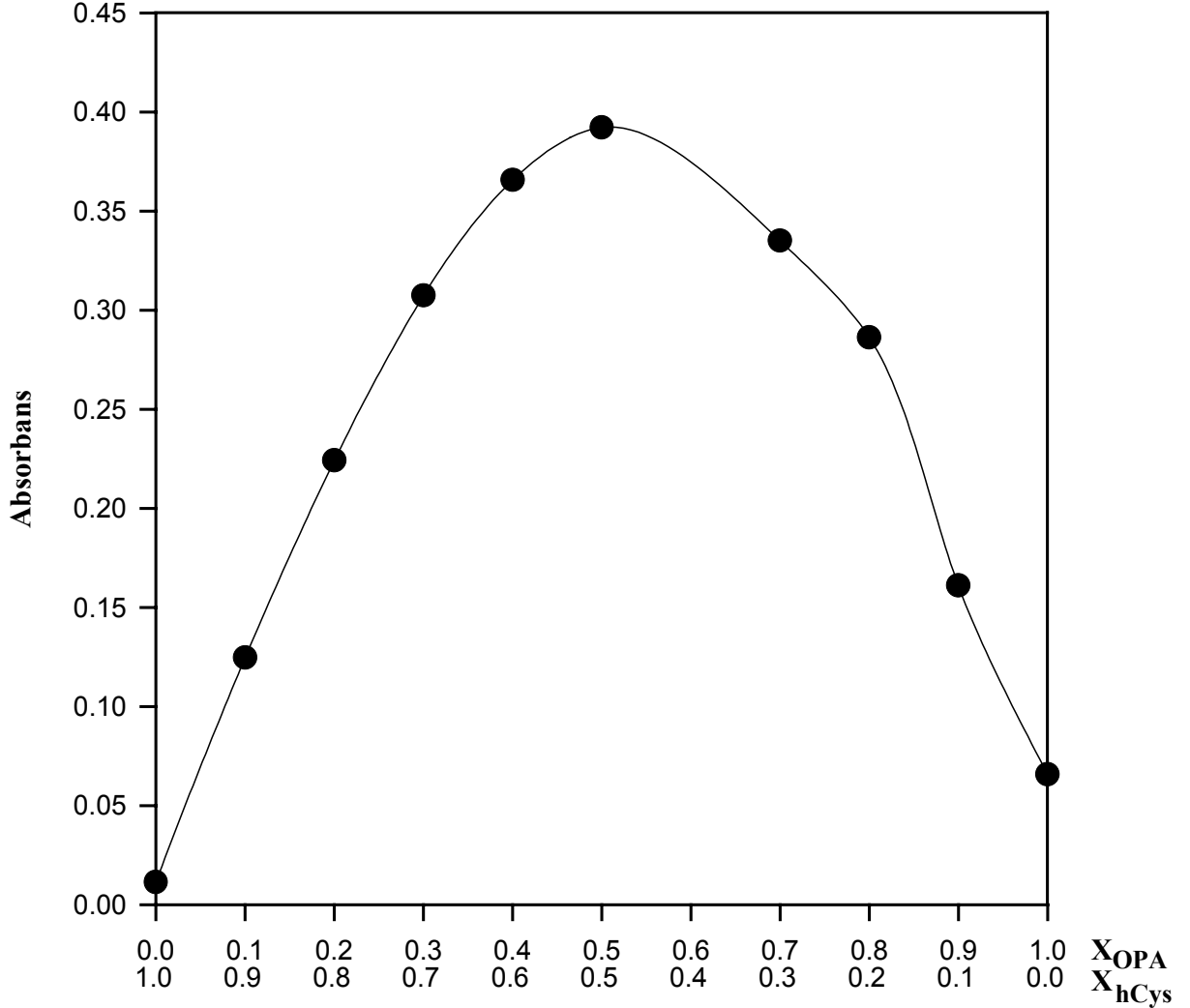
pH	8.0	8.5	9.0	9.2	9.5	10.0	10.5
Absorbans	0.38	0.41	0.46	0.44	0.39	0.34	0.23

### IV.4. HCYS-OPA TÜREVİNİN MOLAR BİLEŞİMİNİN VE UYGUN OPA MİKTARININ BELİRLENMESİ

#### IV.4.1. Job Yöntemi

Aynı derişimde ( $1.0 \times 10^{-4}$  M) homosistein ve OPA çözeltileriyle toplam hacim değişmeyecek şekilde ( $V_1=12$  mL) hazırlanmış olan karışım çözeltilerinin referanslara

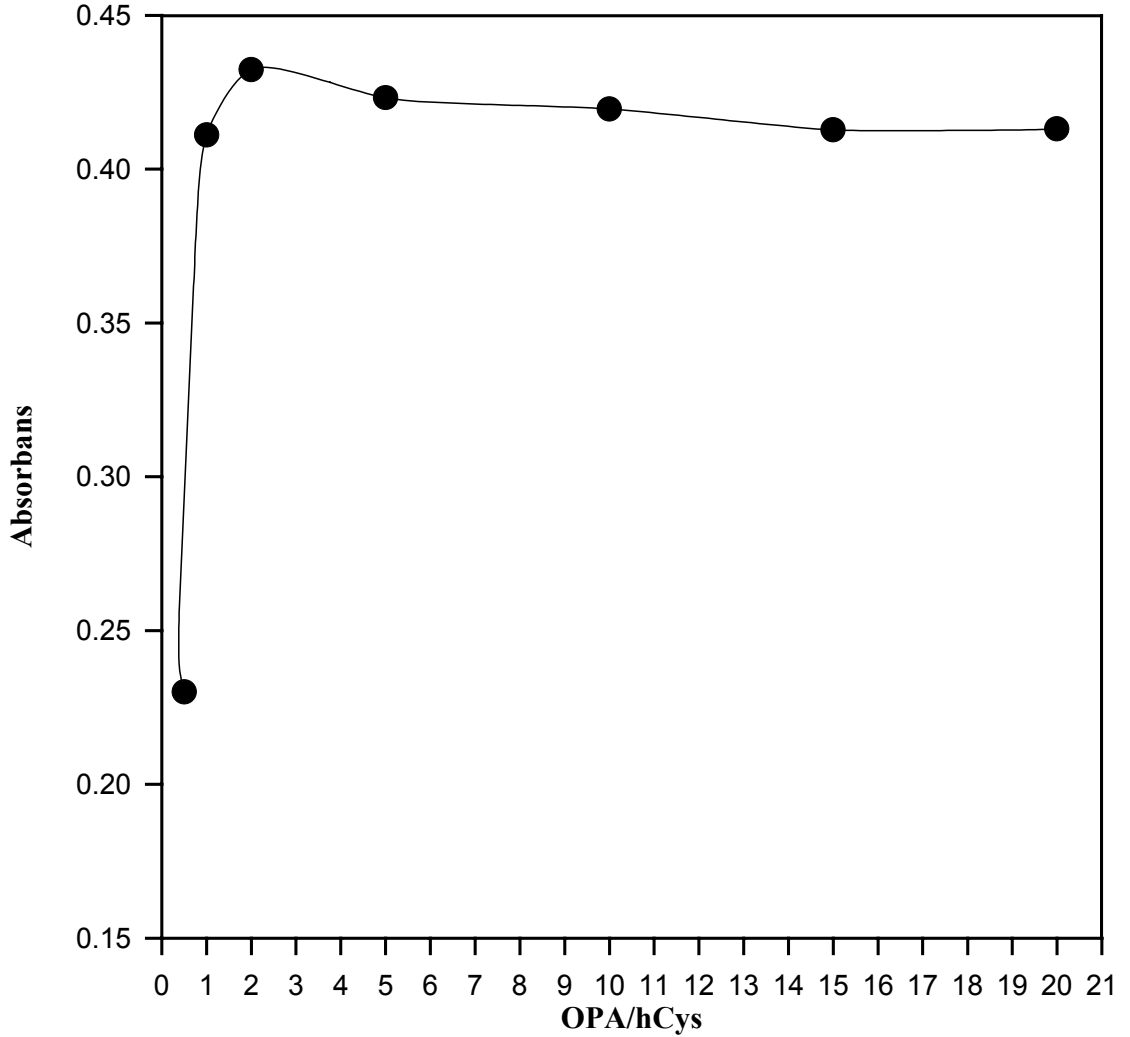
karşı 280 nm’de okunan absorbansları ile çizilen grafikten (Şekil IV.4) türevin molar bileşiminin 1:1 (homosistein:OPA) olduğu sonucuna varıldı.



Şekil IV.7 Job yöntemine göre çizilen grafik.

#### IV.4.2. Mol Oranı Yöntemi

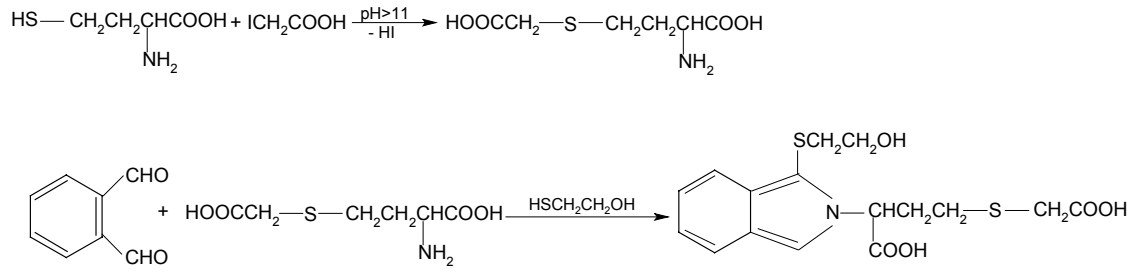
$1.0 \times 10^{-4}$  M Homosistein ve  $1.0 \times 10^{-3}$  M OPA çözeltileri kullanılarak toplam hacim 8 mL olacak şekilde sabit homosistein miktarına karşılık değişen oranlarda OPA çözeltisi eklenerek hazırlanan örneklerin 280 nm’de her biri için ayrı ayrı hazırlanan referanslara karşı okunan absorbans değerleri grafiğe geçirildiğinde job yöntemi ile bulunan sonuçla uyduğu görüldü. (Şekil IV.5)



Şekil IV.8 Mol oranı yöntemine göre çizilen grafik.

#### IV.4.3. Önerilen reaksiyon mekanizması

OPA ile önceden yapılmış olan çalışmalara bakıldığında florimetrik dedeksiyonun gerçekleşmesi için -SH grubu içeren yardımcı bir bileşiğe ihtiyaç duyulduğu [1, 19, 20, 28, 63] görülmüştür. Bu çalışmalarda, OPA'nın aldehit gruplarından birine yardımcı bir bileşiğin bağlanmasının ardından diğer aldehit grubuna homosisteinin bağlanması sonucu halka kapanmasıyla türevlendirme işleminin gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil IV.9 2-MCE varlığında türevlendirme

Bulduğumuz sonuçlara göre hCys-OPA türevinin molar bileşimi 1:1 olduğundan dolayı hCys'in, serbest -SH grubundan OPA'nın yapısındaki aldehit gruplarından birine bağlandığını dolayısıyla halkanın kapanmadığı düşünüldü. Aksi taktirde hCys-OPA mol oranı 1:2 olması gerekirdi.

#### IV.5. HCYS, CYS VE MET-OPA TÜREVLERİNİN KARALILIKLARININ BELİRLENMESİ

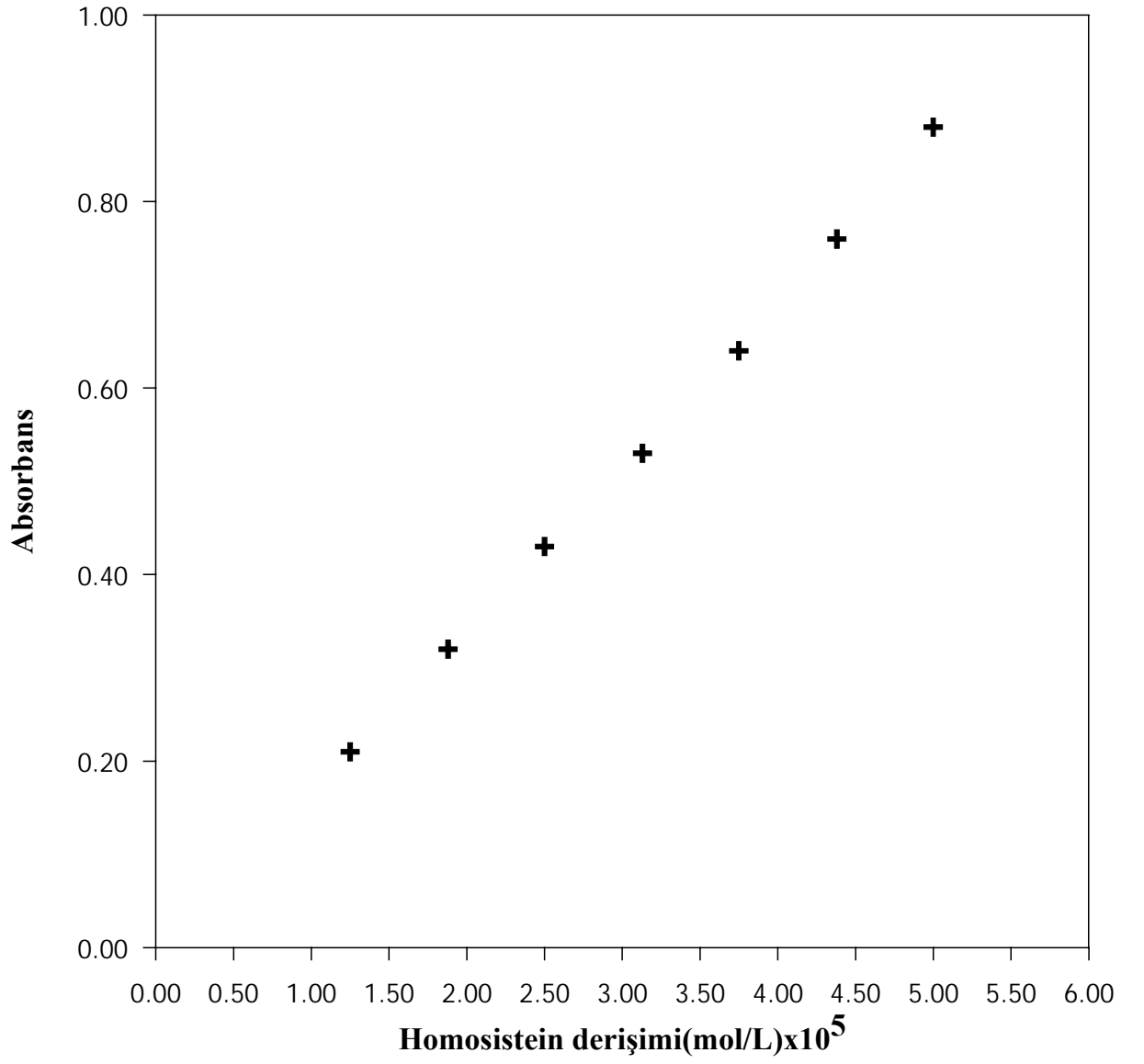
Amino asit-OPA türevlerinin karalılığının belirlenmesi için, hazırlanmış olan örneklerin 5, 15, 30, 45inci dakikalarda ve 24 saat sonra normal spektrumlarında homosistein 280 nm, sistein 273 nm ve metiyonin 244 nm'de okunan absorbans değerleri Tablo IV.3'de verilmiştir.

Tablo IV.3 Amino asitlerin karalılığın belirlenmesi

Absorbans	5.dk	15.dk	30.dk	45.dk	24 saat sonra
Homosistein -OPA	0.2224	0.2238	0.2182	0.2073	0.1012
Sistein -OPA	0.2127	0.2154	0.1933	0.1845	0.0851
Metiyonin -OPA	0.2731	0.2617	0.2029	0.2015	0.1107

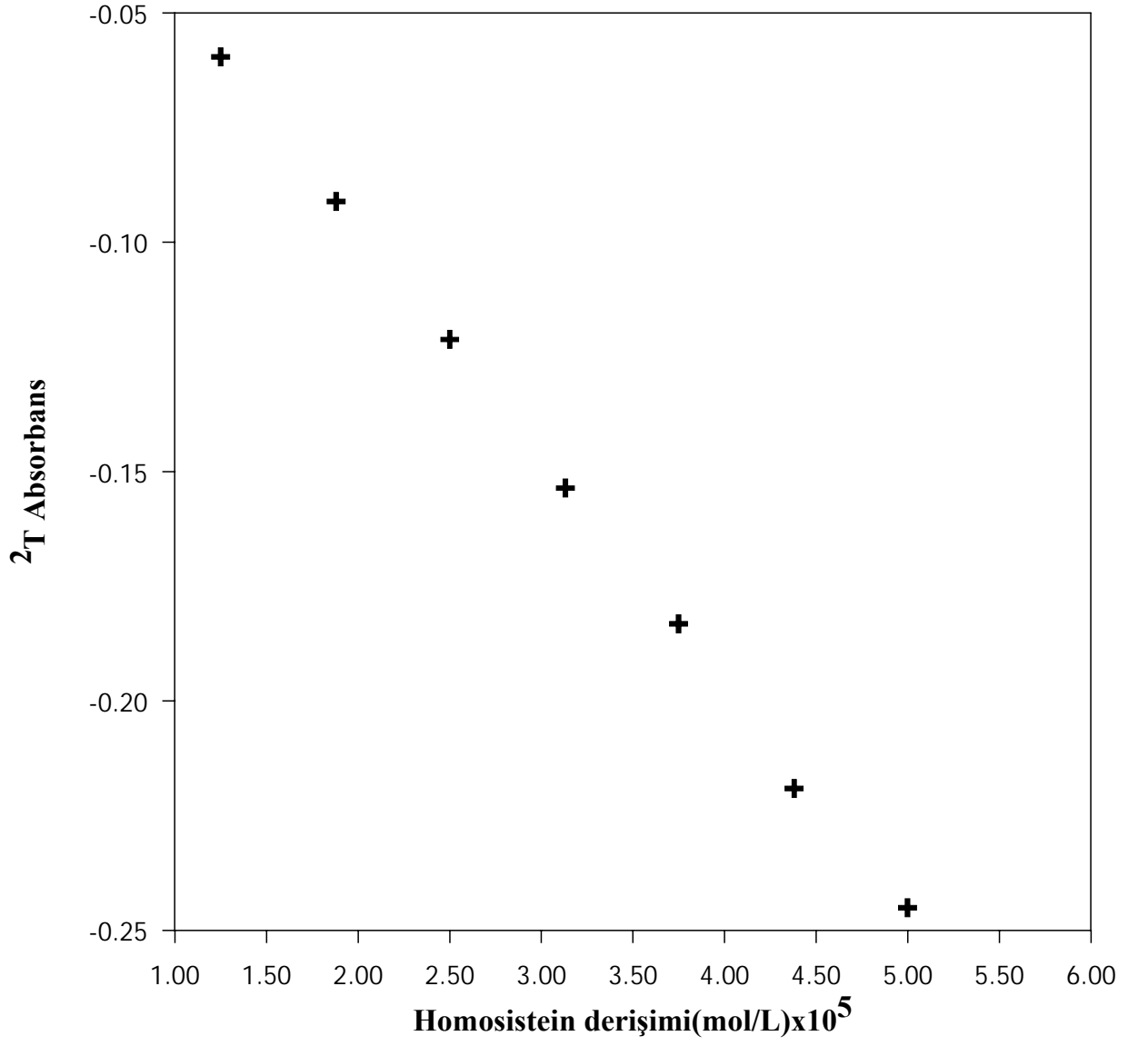
#### IV.6. HCYS, CYS VE MET İÇİN ÇALIŞMA GRAFİKLERİNİN ÇİZİLMESİ

Önceki bölümde anlatıldığı şekilde hazırlanan örneklerin 600 nm-200 nm arasında çizdirilen normal ve ikinci türev spektrumlarına ait çalışma eğrileri Şekil IV.10-19'da verilmiştir. Normal spektrumlarına ait doğru denklemleri ve korelasyon katsayıları Tablo IV.4'te, ikinci türev spektrumlarına ait olanlar ise Tablo IV.5'te verilmiştir.



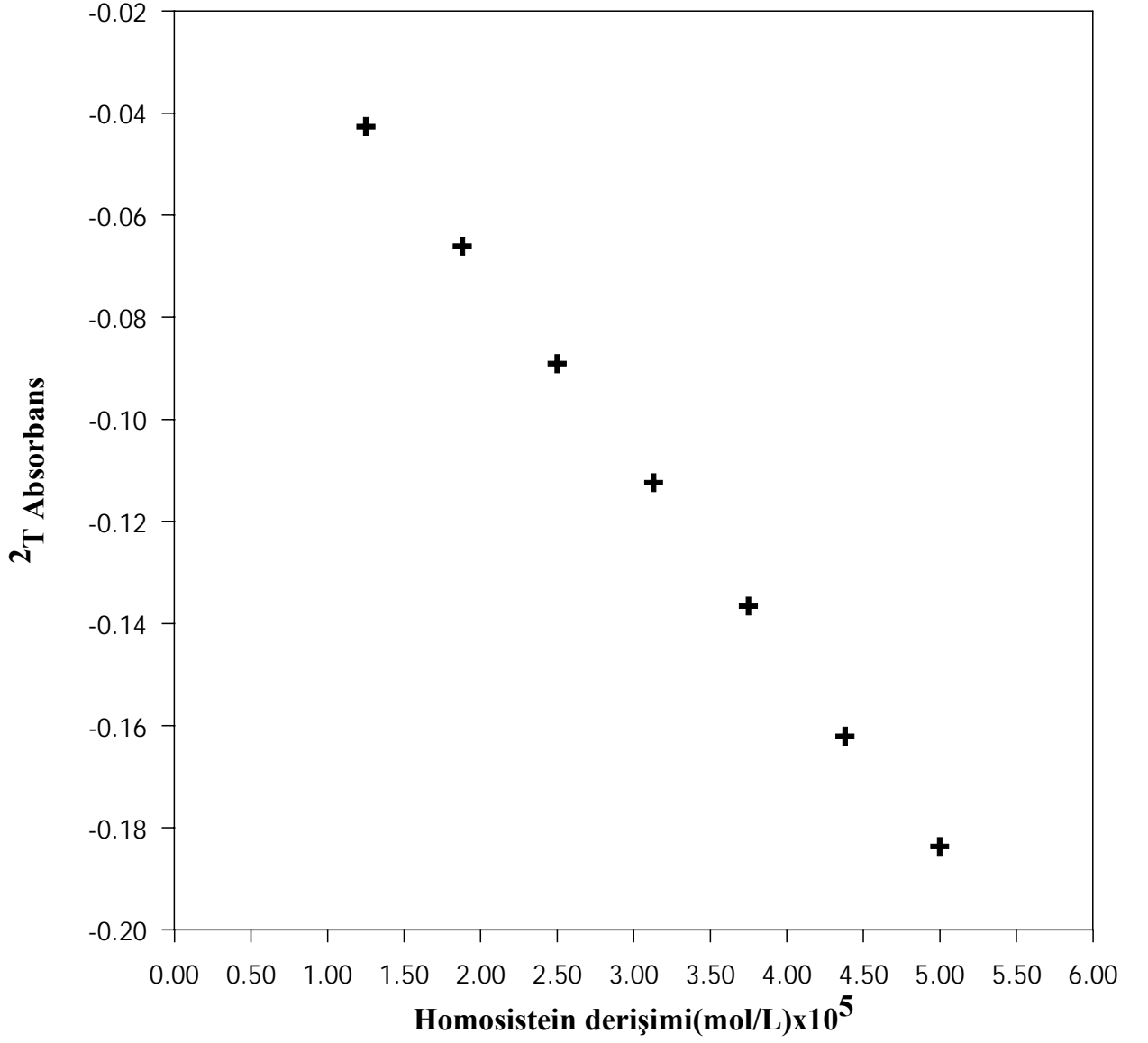
Şekil IV.10 280 nm'de homosisteinin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{hCys}]_{\text{son}} = 5.0 \times 10^5 \text{M}$$



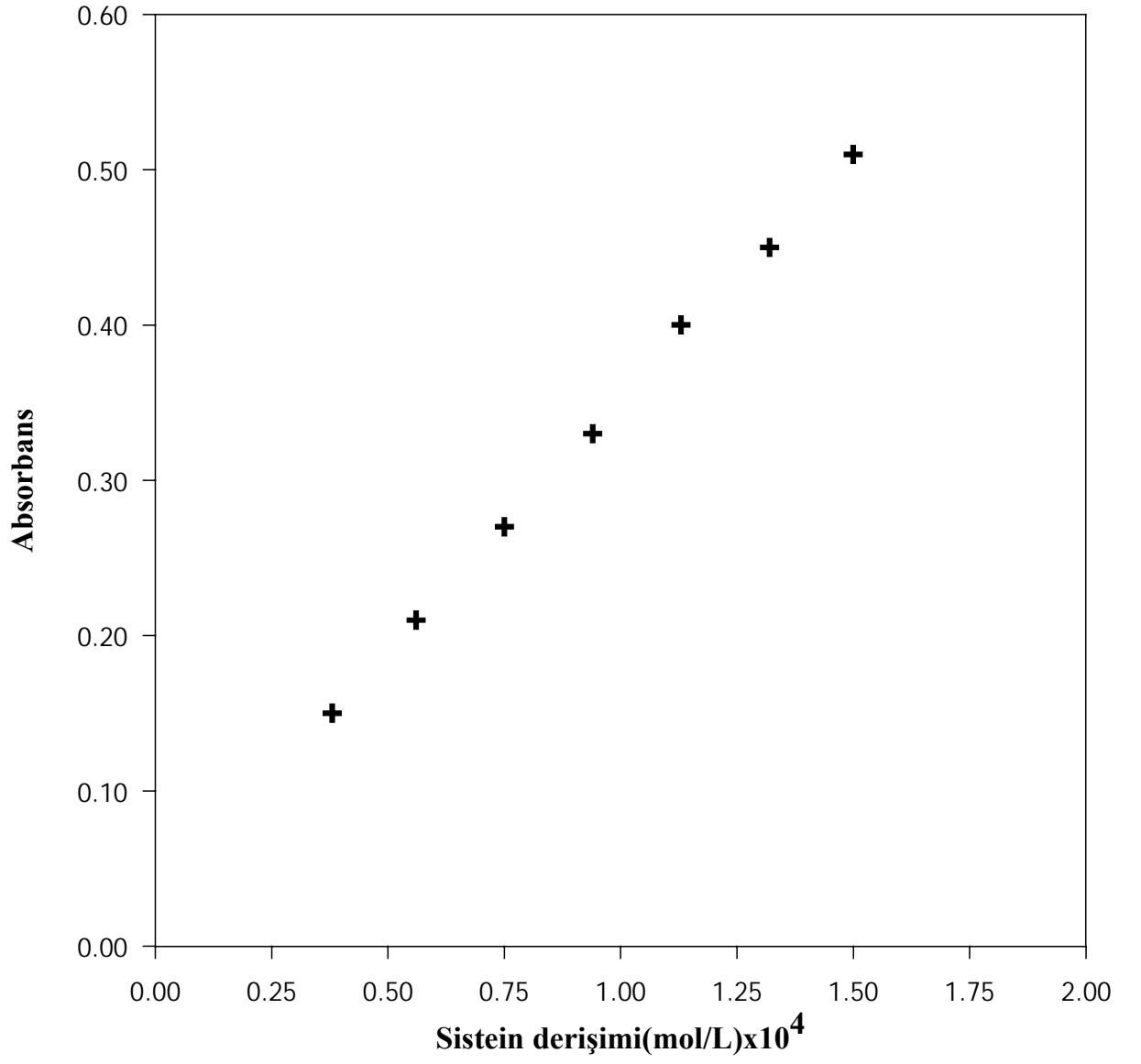
Şekil IV.11 280 nm'de homosisteinin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{hCys}]_{\text{son}} = 5.0 \times 10^5 \text{ M}$$



Şekil IV.12 300 nm'de homosisteinin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

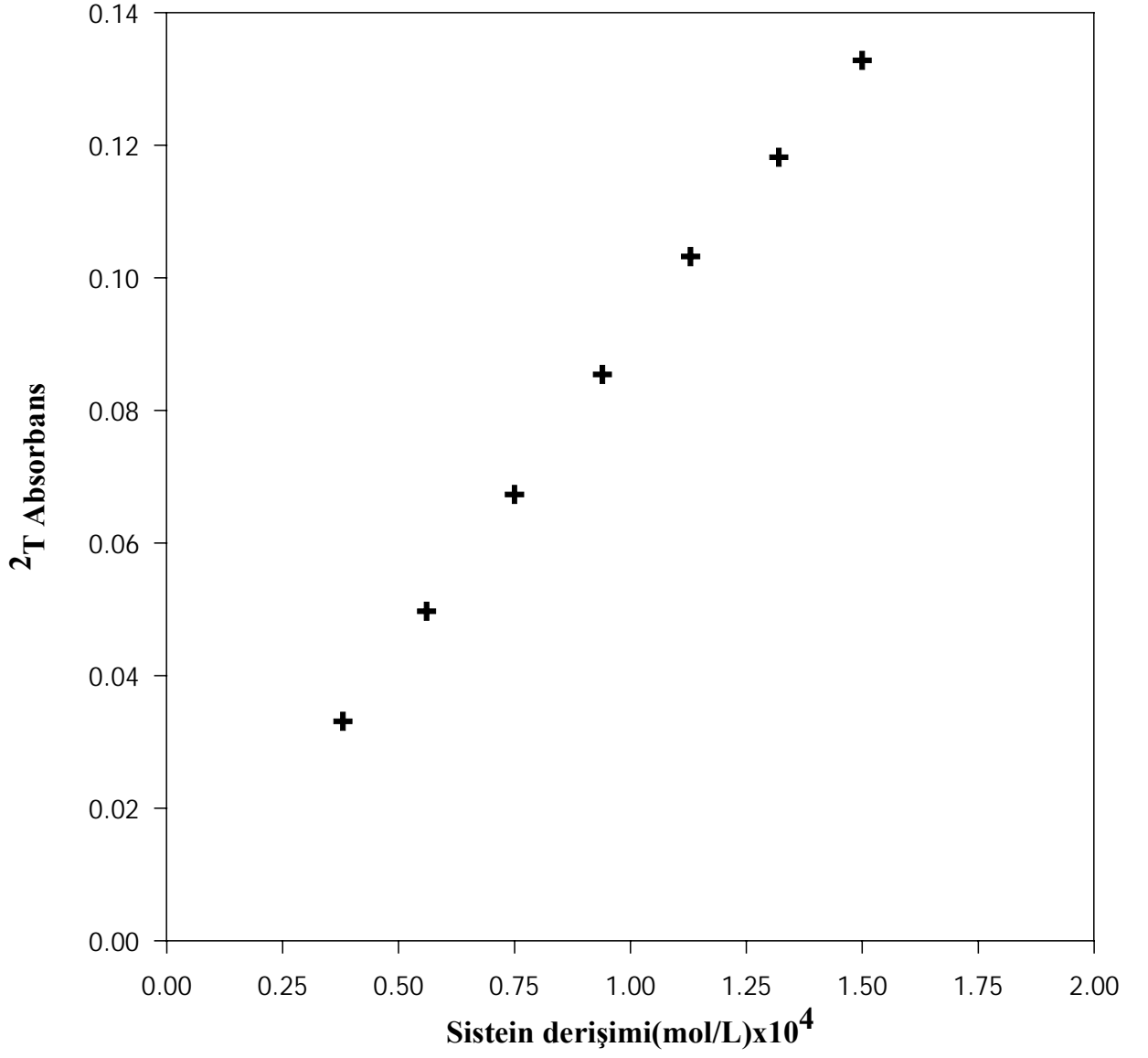
$$[\text{hCys}]_{\text{son}} = 5.0 \times 10^5 \text{M}$$



Şekil IV.13 273 nm'de sisteinin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi

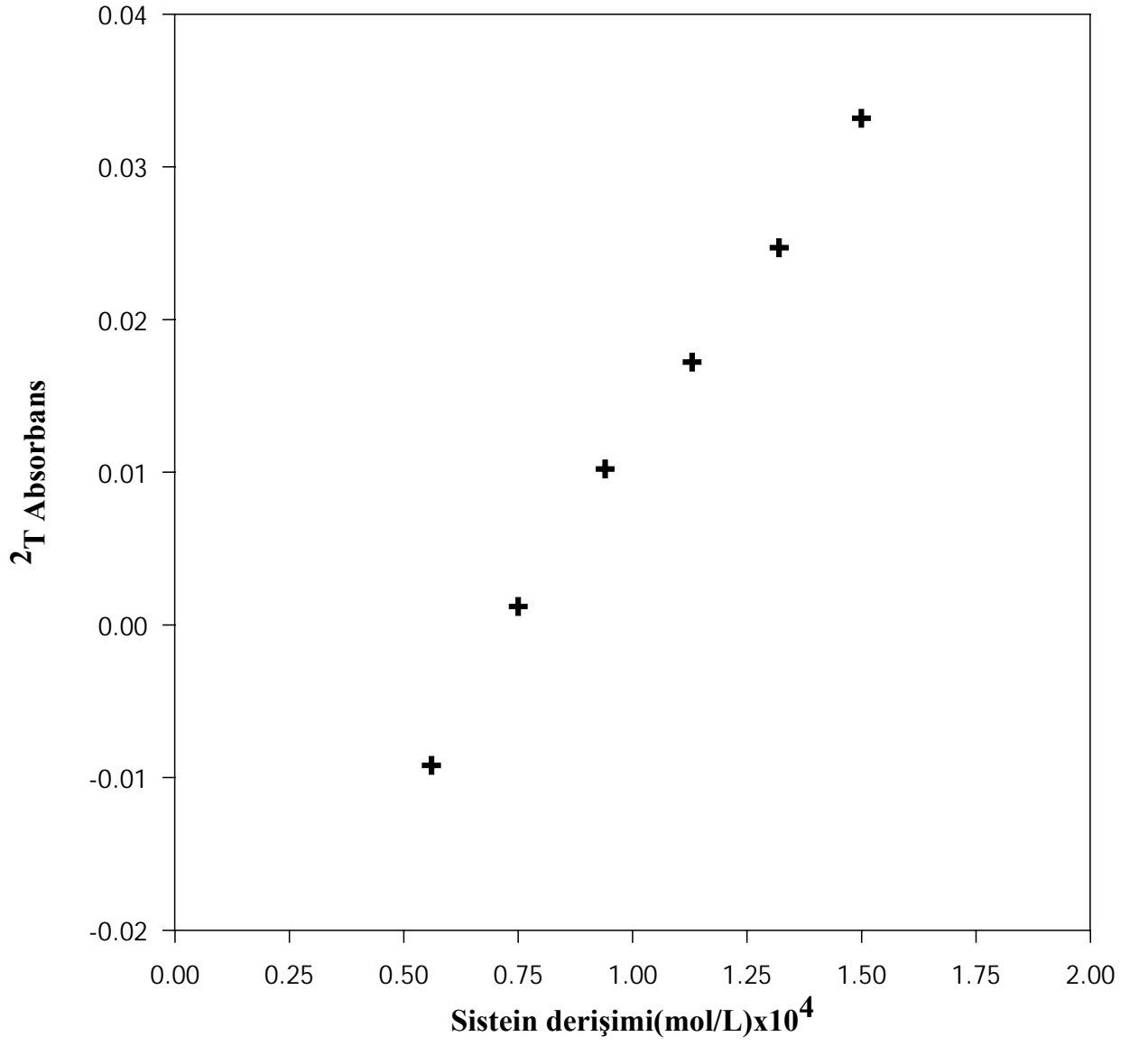
$$[\text{Cys}]_{\text{son}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$





Şekil IV.14 265 nm'de sisteinin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

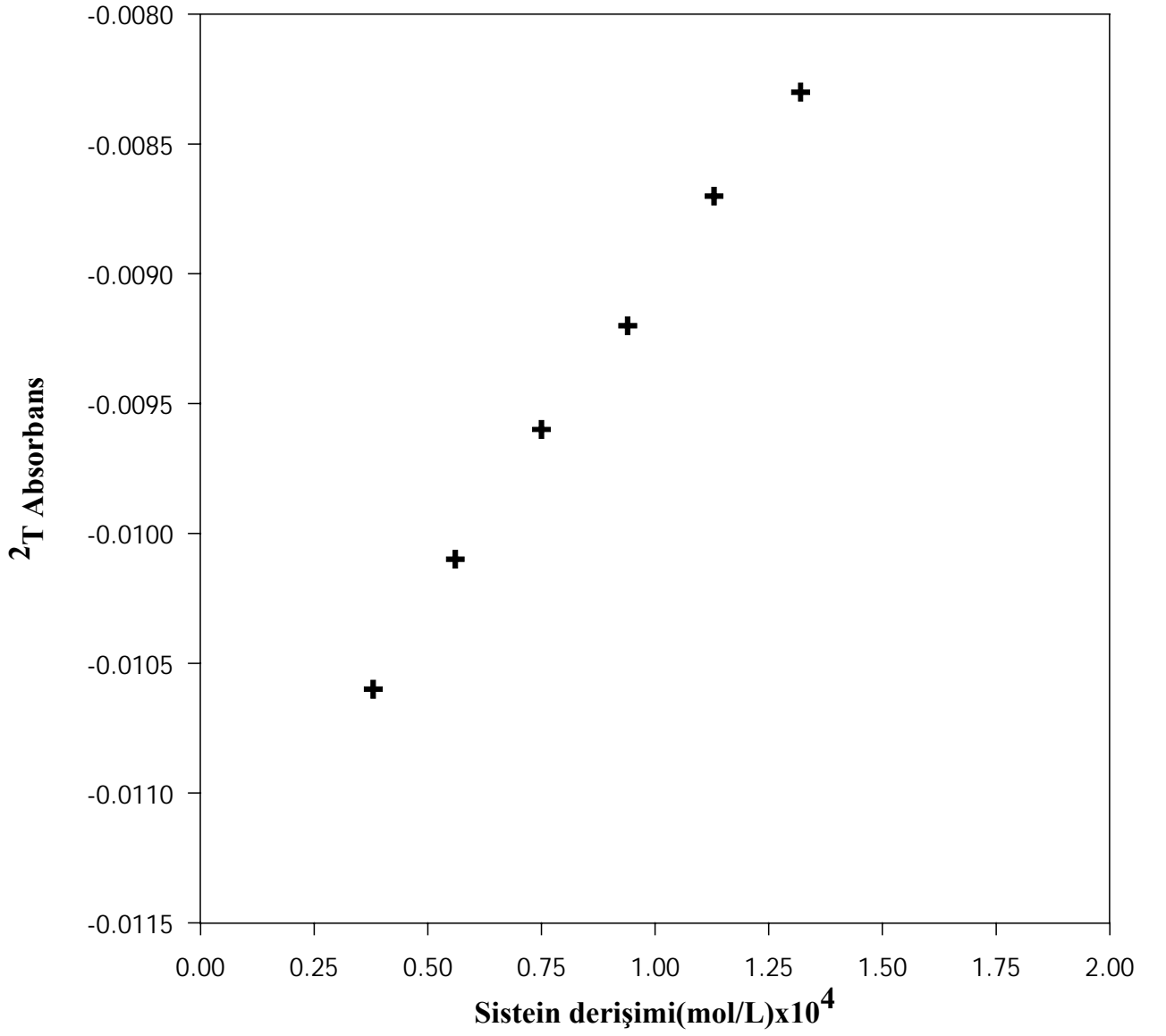
$$[\text{Cys}]_{\text{son}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$



Şekil IV.15 280 nm'de sisteinin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

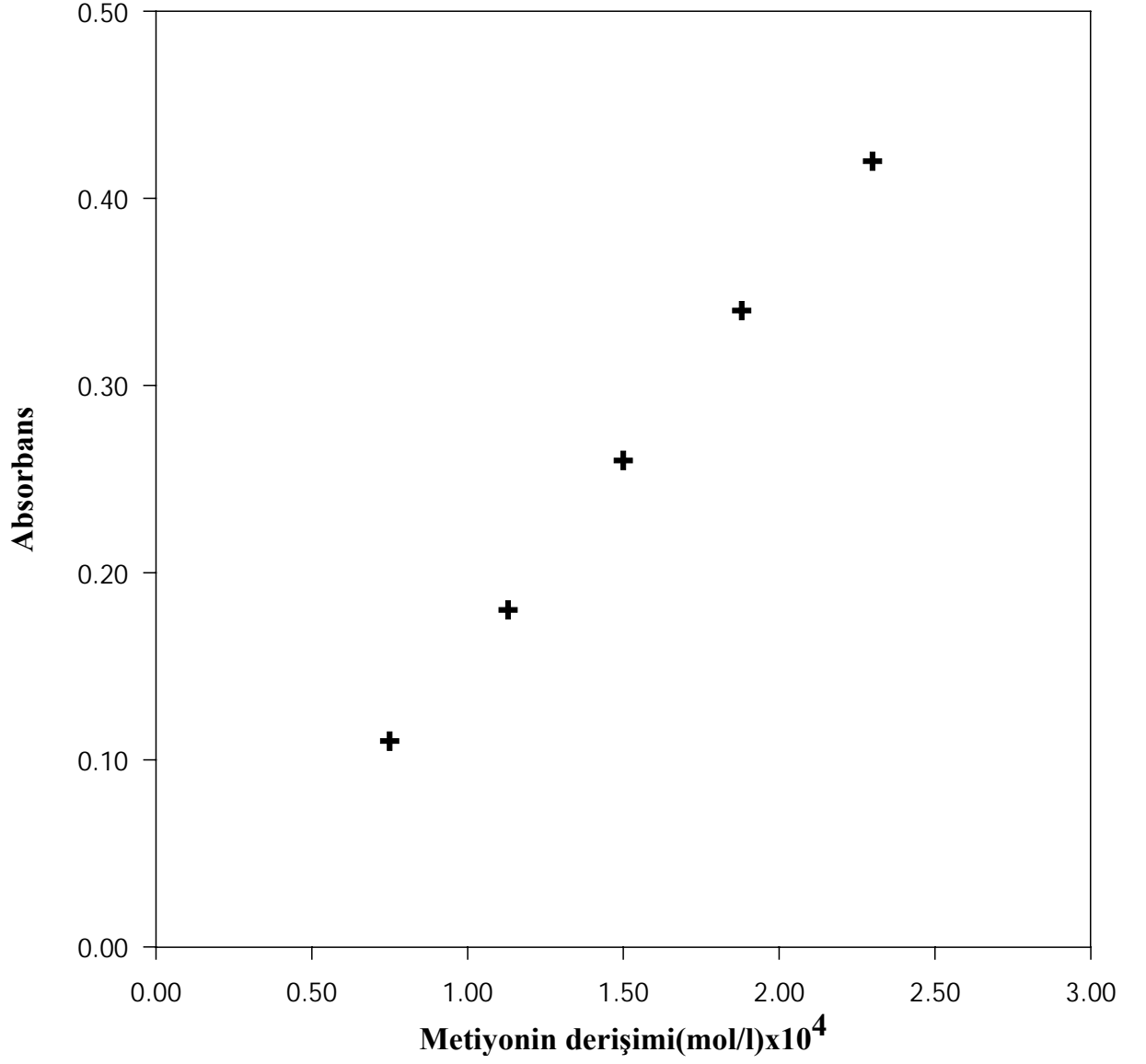
[Cys]<sub>son</sub> =

1.5x10<sup>-4</sup> M



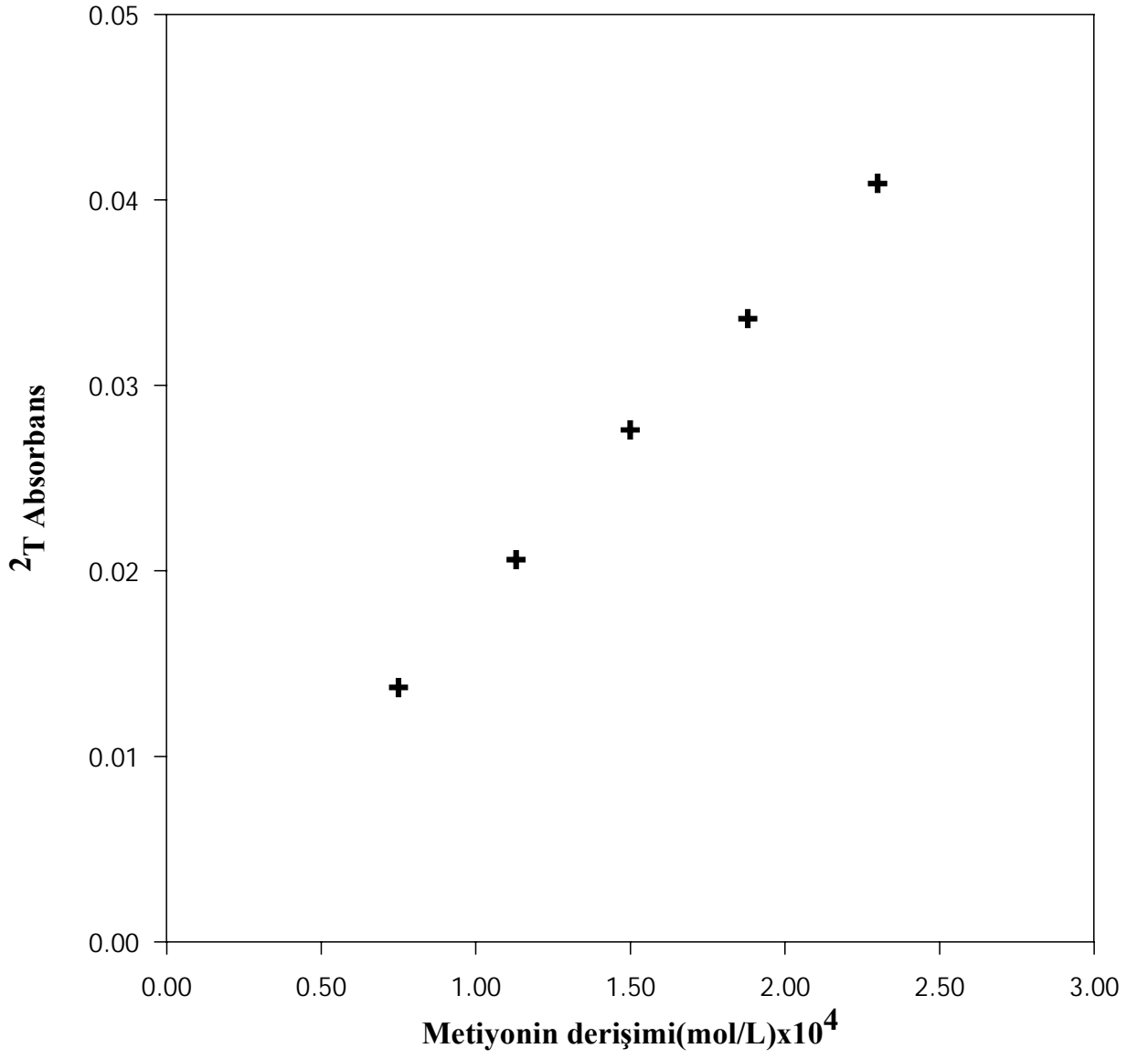
Şekil IV.16 300 nm'de sisteinin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{Cys}]_{\text{son}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$$



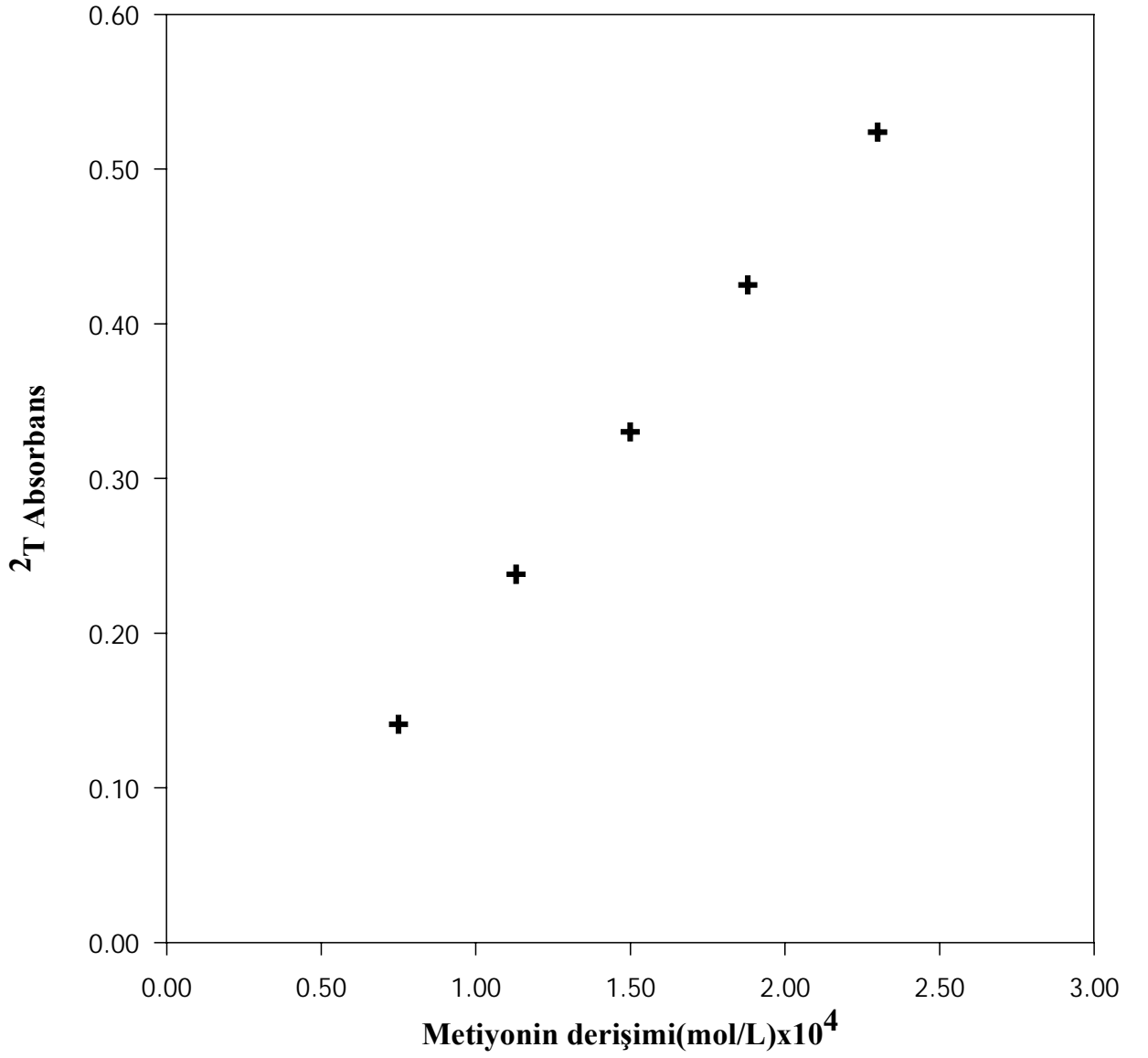
Şekil IV.17 244 nm'de metiyoninin normal spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{Met}]_{\text{son}} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ M}$$



Şekil IV.18 280 nm'de metioninin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{Met}]_{\text{son}} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ M}$$



Şekil IV.19 14 300 nm'de metiyoninin ikinci türev (<sup>2</sup>T) spektrumuna ait çalışma eğrisi

$$[\text{Met}]_{\text{son}} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Tablo IV.4 Amino asitlerin normal spektrumlarına ait doğru denklemleri

Amino Asit	Dalga Boyu	Doğru Denklemi	Korelasyon Katsayısı
Homosistein	280	$Y=1.8 \times 10^4 C - 0.0154$	$r = 0.9996$
Metiyonin	244	$Y=2.0 \times 10^3 C - 0.0442$	$r = 0.9997$
Sistein	273	$Y=3.2 \times 10^3 C + 0.030$	$r = 0.9996$

Tablo IV.5 Amino asitlerin ikinci türev spektrumlarına ait doğru denklemleri

Amino Asit	Dalga Boyu	Doğru Denklemi	Korelasyon Katsayısı
Homosistein	280	$Y=-5.0 \times 10^3 C + 0.0030$	$r = 0.9997$
Homosistein	300	$Y=-3.8 \times 10^3 C + 0.0048$	$r = 0.9998$
Metiyonin	280	$Y=1.8 \times 10^2 C + 0.0008$	$r = 0.9996$
Metiyonin	300	$Y=2.5 \times 10^3 C - 0.0470$	$r = 0.9998$
Sistein	265	$Y=9.0 \times 10^2 C - 0.0001$	$r = 0.9994$
Sistein	280	$Y=4.4 \times 10^2 C - 0.0350$	$r = 0.9993$
Sistein	300	$Y=24C - 0.0115$	$r = 0.9990$

#### IV.7. HCYS, CYS VE MET TAYİNLERİNİN % RÖLATİF STANDART SAPMA DEĞERLERİ

13.5 µg homosistein, 54.5 µg sistein ve 180.0 µg metiyoninin normal spektrumlarındaki absorbanlarına ait % R.S.D'ları, Tablo IV.6'da, ikinci türev spektrumlarına ait % R.S.D'ları Tablo IV.7'de verilmiştir.

Tablo IV 6 Amino asitlerin normal spektrumlarına ait % Rölatif Standart Sapmalar

Amino Asit	Dalga Boyu	Amino Asit Miktarı ( $\mu\text{g}$ )	% R.S.D
Homosistein	280 nm	12.5 $\mu\text{M}$	1.61
Sistein	273 nm	56.0 $\mu\text{M}$	0.06
Metiyonin	244 nm	150.0 $\mu\text{M}$	0.27

Tablo IV.7 Amino asitlerin ikinci türev spektrumlarına ait % Rölatif Standart Sapmalar

Amino Asit	Dalga Boyu	Amino Asit Miktarı ( $\mu\text{g}$ )	% R.S.D
Homosistein	280 nm	12.5 $\mu\text{M}$	0.52
Homosistein	300 nm	12.5 $\mu\text{M}$	1.78
Sistein	265 nm	56.0 $\mu\text{M}$	1.06
Metiyoni	300 nm	150.0 $\mu\text{M}$	0.08

#### IV.8. HCYS, CYS VE MET TAYİNLERİNİN LOD VE LOQ DEĞERLERİNİN BELİRLENMESİ

Amino asitlerin normal spektrumlarına ait LOD ve LOQ değerleri Tablo IV.8’de, ikinci türev spektrumlarına ait olanlar ise Tablo IV.9’da verilmiştir.

Tablo IV.8 Normal spektrumlara ait LOD ve LOQ değerleri

Amino Asit	Dalga Boyu	LOD	LOQ
Homosistein	280 nm	12.5 ppm	42 ppm
Sistein	273 nm	18.6 ppm	62 ppm
Metiyonin	244 nm	24.3 ppm	81 ppm



Tablo IV.9 İkinci türev spektrumlarına ait LOD ve LOQ değerleri

Amino Asit	Dalga Boyu	LOD	LOQ
Homosistein	280 nm	0.8 ppm	2.6ppm
Homosistein	300 nm	1.05 ppm	3.5 ppm
Sistein	265 nm	5.34 ppm	17.8ppm
Metiyonin	300 nm	0.6 ppm	2ppm

#### IV.9 BAZI AMINO ASITLERİN BOZUCU GİRİŞİM ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Alanin, arginin, glisin, glutamin, lizin, prolin, serin, treonin ve valin'in hCys tayininde kullanılan 280 ve 300 nm'lerdeki  $^2T$  değerlerine etkisi (+) ve (-) girişim şeklinde Tablo IV.10'da görülmektedir.

Tablo IV.10 Bazı amino asitlerin hCys tayinine bozucu etkileri

Amino Asit	$^2T_{280}$	$^2T_{300}$
Alanin	(-) % 50	(+) % 10
Arginin	(-) % 80	(-) % 5
Glisin	(-) % 80	(-) % 5
Glutamin	(+) % 40	(+) % 100
Lizin	(-) % 90	Yok ~ % 1
Prolin	(+) % 60	Yok ~ % 1
Serin	(+) % 30	(+) % 50
Treonin	(+) % 80	(+) % 5
<b>Valin</b>	(-) % 60	(+) % 20

Amino asitlerin çoğunun büyük ölçüde girişim yaptığı anlaşıldığından ilerleyen çalışmalarda bu girişimin büyük olasılıkla kemometrik olarak önlenmesi düşünülmektedir.

#### IV.10. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN SENTETİK KARISIMA UYGULANMASI

Geliştirdiğimiz yöntemin 37.5 µM hCys, 37.5 µM met ve 75.0 µM Cys içeren sentetik karışıma uygulandığında elde edilen ikinci türev spektrumlarında hCys ve met'in düğüm oluşturduğu 265 nm'de Cys miktarının belirlenmesinin ardından 280 ve 300 nm'lerde her üç aminoasite ait doğru denklemlerinin toplamı ile elde edilen aşağıdaki iki denklemde yerine konularak iki bilinmeyenli iki denklemin toplamından karışımdaki hCys ve met miktarları hesaplandı.

$${}_{265}^2T = 9 \times 10^2 C_{Cys} - 0.0001$$

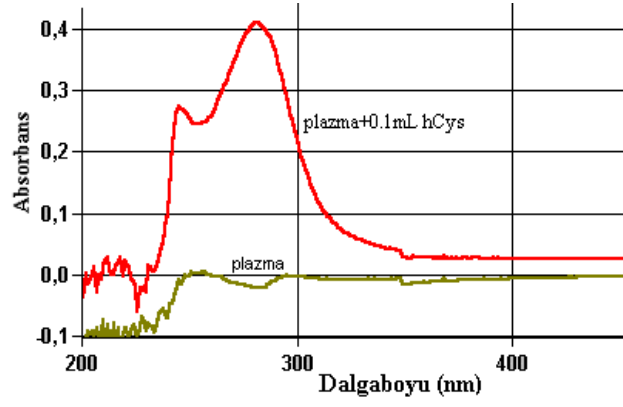
$${}_{280}^2T = -5.3 \times 10^3 C_{hCys} + 1.8 \times 10^2 C_{met} + 4.4 \times 10^2 C_{Cys} - 0.0312$$

$${}_{300}^2T = -3.8 \times 10^3 C_{hCys} + 2.5 \times 10^3 C_{met} + 24 C_{Cys} - 0.0537$$

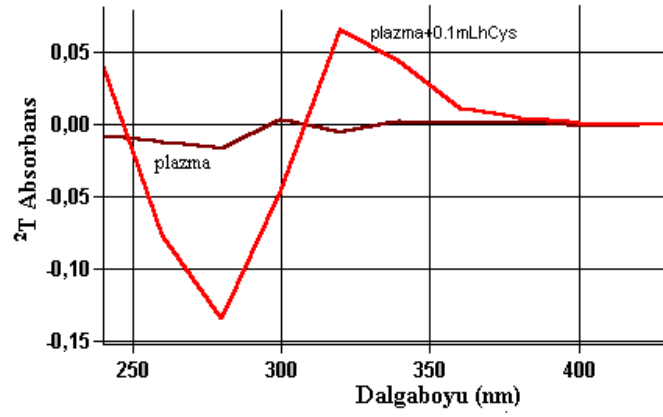
Yapılan hesaplamalar sonucu karışım içerisinde 33 µM hCys, 34 µM met ve 71 µM Cys derişimleri tayin edildi.

#### IV.11. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN PLAZMAYA UYGULANMASI

Diğer amino asitlerin bozucu etkilerinin oldukça yüksek olduğunun bilinmesine rağmen bir özel laboratuvarında hCys içeriğinin tayin sınırımızın altında (8.6µM) olduğu belirlenen plazmaya 16.7 µM olacak şekilde hCys eklenerek geliştirilen yöntemin uygulanması ile çizilen ikinci türev spektrumu (Şekil IV.21) değerlerinden plazma içerisinde tayin edilebilecek miktarda Cys olmadığı görüldü. hCys ve met tayini için elde edilen ikinci türev absorbans değerleri yukarıki iki bilinmeyenli iki denklemde yerlerine konulduğunda 16 µM hCys ve 22 µM met tayin edildi. Plazmada tayin edilen met derişiminin normal limitler (26.3 ± 5.4 µM ) [63, 64] içerisinde olduğu görüldü.



Şekil IV.20 plazma örneğinin hCys eklenmeden önceki ve eklendikten sonraki normal spektrumları



Şekil IV.21 plazma örneğinin hCys eklenmeden önceki ve eklendikten sonraki ikinci türev spektrumları

## V . TARTIŞMA VE SONUÇ

20.yy'ın ortalarından günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda hiperhomosisteineminin başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere hamilelikte görülen bazı komplikasyonlara, kansere, akıl hastalıklarına ve buna bağlı olarak Alzheimer hastalığına da sebep olduğu bulunmuştur. Bu nedenle başta plazma olmak üzere biyolojik sıvılarda homosistein tayini giderek önem kazanmıştır.

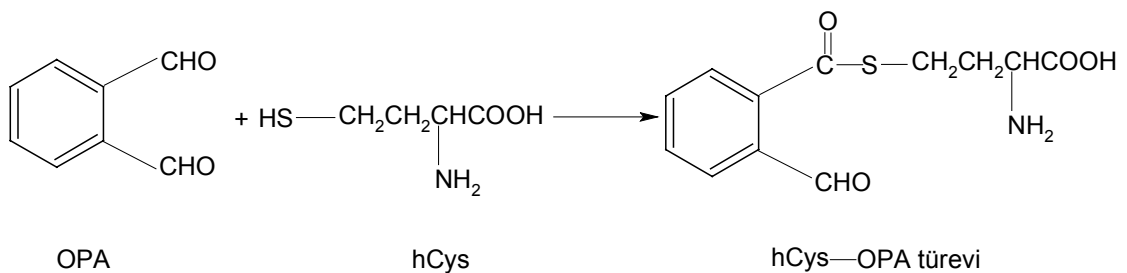
Uygulanmakta olan yöntemlerde homosistein, yapısındaki tiyol (-SH) veya amino (-NH<sub>2</sub>) grubundan türevlendirilerek tayin edilebildiği gibi türevlendirme işlemine gerek olmadan yapılan doğrudan tayin yöntemleri de mevcuttur. Homosistein, günümüzde kromatografik, elektroanalitik ve immünolojik yöntemlerle tayin edilebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan, HPLC ile ayırımın ardından florimetrik dedeksiyonla yapılan tayinlerdir.

Ayırım tekniği olarak en çok HPLC kullanılmasının sebebi homosisteinin kolon içerisinde benzer yapıdaki diğer amino tiyollerden ayırımının kolay olmasıdır. Bunun için ortam şartlarına göre izokratik ya da gradient elüsyon tercih edilir. Bu özellikler HPLC'nin avantajları olmakla birlikte kullanılan mobil faz miktarının fazla olması, türevlendirme ve ayırım için genellikle farklı pH'lar kullanılması, kolonda ayırımın en az 10dk gibi bir sürede gerçekleşmesi ve bu sürede istenilen tüm amino asitlerin ayrılabilmesi, ayırımın gerçekleştiği analitik kolondan önce genellikle koruma kolonuna ihtiyaç duyulması ve genel olarak sistemin pahalı olması yöntemin dezavantajları olarak sıralanabilir. Kapiler elektroforez ile yapılan tayinlerde ise spektrofotometrik dedeksiyonun yeterince hassas olmayışından dolayı kullanılan lazer indüktif floresans dedeksiyonunun pahalı olması ve elektrokimyasal dedeksiyon sırasında kullanılan elektrodun ayırım yapıldığı voltajdan etkilenmesine bağlı olarak yanlış sonuçlar elde edilmesi bu yöntemin dezavantajlarıdır. İmmünolojik yöntemlerin en büyük dezavantajı ise kullanılan kitlerin ve genel olarak sistemin pahalı oluşudur.

Yukarıdaki yöntemlere alternatif olarak daha basit bir cihazla kolay, ucuz ve kısa sürede sonuç veren spektrofotometrik bir homosistein tayin yöntemi geliştirmenin amaçlandığı çalışmamızda homosisteinin yapısındaki serbest tiyol (-SH) grubuyla reaksiyona girebilecek türevlendirme ayıraçlarının belli başlılarından olan OPA kullanıldı. Kromatografik analizde florimetrik dedeksiyon amacıyla kolon öncesinde -SH grubu içeren bir yardımcı bileşik [1, 19, 20, 28, 63] varlığında oluşturulan floresans özellik gösteren amino asit-OPA türev bileşiğinden yola çıkılarak yardımcı bileşiğe gerek olmadan, tek basamaklı bir reaksiyonla homosisteinin serbest tiyol grubu üzerinden OPA türevi elde edildi.

OPA ile önceden yapılmış yayınlara bakıldığında türevlendirme için genellikle pH 10 boraks tamponu kullanıldığı [1,19,20,28, 63] görüldüğünden çalışmamızda türevlendirme için uygun pH'ı bulmak amacıyla pH 8.0-10.5 aralığında boraks tampon çözeltileri ile denemeler yapıldı. Ayrıca farklı bir pH 10 tamponu olarak  $\text{NaHCO}_3+\text{NaOH}$  tamponu da denendi. 2 mL  $\text{NaHCO}_3+\text{NaOH}$  tamponunun yeterli gelmediği görüldüğünden 5 mL  $\text{NaHCO}_3+\text{NaOH}$  tamponu kullanılarak çalışmalara devam edildi.  $\text{NaHCO}_3+\text{NaOH}$  tamponu ile elde edilen absorbansın boraks tamponlarıyla elde edilenlere göre düşük olmasından dolayı boraks tamponlarının daha uygun olduğuna karar verildi.  $6.25 \times 10^{-2}$  M boraks çözeltisinin kendi pH'ı olan 9.2 ile bu molaritedeki boraks çözeltisine HCl ilavesiyle elde edilen pH 9.0'da okunan absorbans değerleri arasında önemli bir fark görülmediğinden kolaylık açısından pH 9.2 çalışma pH'ı olarak seçildi.

Türevin yapısını aydınlatma çalışmalarımız 1 mol hCys'in 1 mol OPA ile türev oluşturduğunu gösterdiğinden oluşum mekanizmasının aşağıdaki reaksiyonla ifade edilebileceği sonucuna varıldı.



Homosisteinin organizmada transmetilasyon reaksiyonları ile sistein veya tekrar metiyonine metabolize olduğu bilindiğinden homosisteinin, sistein ve metiyonin ile yan yana analizi şartları da incelendi. Aynı türevlendirme koşullarında hazırlanan Cys-OPA ve met-OPA türevlerinin spektrumları çizildiğinde sistein için 273 nm’de metiyonin için ise 244 nm’de maksimum absorbanslar elde edilmesine rağmen spektrumlarda girişimler olduğu görüldü. Her üç amino asit-OPA türevine ait ikinci türev spektrumları alındığında homosistein ve metiyoninin düğüm noktalarının bulunduğu 265 nm’de sistein tayini, 280 ve 300 nm’lerdeki toplam türev absorbans değerlerinden ise homosistein ve metiyonin tayininin yapılabileceği sonucuna varıldı. 265, 280 ve 300 nm’lerde Cys’e ait doğru denklemleri ve bu denklemlerin uygunluk katsayıları;

$${}_{265}^2T = 9 \times 10^2 C_{Cys} - 0.0001 \quad r = 0.9994$$

$${}_{280}^2T = 4.4 \times 10^2 C_{Cys} - 0.035 \quad r = 0.9993$$

$${}_{300}^2T = 24 C_{Cys} - 0.0115 \quad r = 0.9990$$

280 ve 300 nm’lerde hCys’e ait doğru denklemleri ve uygunluk katsayıları;

$${}_{280}^2T = -5.0 \times 10^3 Ch_{Cys} + 0.0030 \quad r = 0.9997$$

$${}_{300}^2T = -3.8 \times 10^3 Ch_{Cys} + 0.0048 \quad r = 0.9998$$

280 ve 300 nm’lerde met’e ait doğru denklemleri ve uygunluk katsayıları ise;

$${}_{280}^2T = 1.8 \times 10^2 C_{met} + 0.0008 \quad r = 0.9996$$

$${}_{300}^2T = 2.5 \times 10^3 Ch_{Cys} - 0.0470 \quad r = 0.9998 \text{ olarak elde edildi.}$$

Görüldüğü gibi 265 nm’de Cys derişimi belirlenendikten sonra 280 ve 300 nm’lerde her üç amino aside ait doğru denklemlerinin toplamı ile elde edilen aşağıdaki iki denklemde yerine konularak iki bilinmeyenli iki denklemin toplamından örnekteki hCys ve met miktarları hesaplanabilir.

$${}_{280}^2T = -5.3 \times 10^3 Ch_{Cys} + 1.8 \times 10^2 C_{met} + 4.4 \times 10^2 C_{Cys} - 0.0312$$

$${}_{300}^2T = -3.8 \times 10^3 Ch_{Cys} + 2.5 \times 10^3 C_{met} + 24 C_{Cys} - 0.0537$$

hCys, Cys ve met için ikinci türev absorbands değerleri ile elde edilen LOD değerleri, hCys için 280 ve 300 nm'lerde sırasıyla 0.8 ppm ve 1.05 ppm, Cys için 265 nm'de 5.34 ppm ve met için 300 nm'de 0.6 ppm'dir.

hCys, Cys ve met için ikinci türev absorbands değerleri ile elde edilen % R.S.D değerleri ise 12.5 µM hCys için 280 ve 300 nm'lerde sırasıyla 0.52 ve 1.78, 56.0 µM Cys için 265 nm'de 1.06 ve 150.0 µ met için 300 nm'de 0.08 olarak bulunmuştur.

İkinci türev spektrumlarından faydalanılarak yapılan hCys tayinlerinde gerek LOD değerinin gerekse de % RSD değerinin daha düşük olmasından dolayı 280 nm'nin daha uygun olduğu görülmüştür.

Geliştirilen yöntemin homosistein tayin sınırı, hiperhomosisteineminin ilk evresi içindedir. Teşhis açısından büyük önemi olan bu mertebedeki homosistein miktarını, sistein ve metiyonin miktarları ile birarada tayin edebilen bu yöntem, üç amino asidin sentetik karışımlarına başarıyla uygulanabilmektedir. Yöntemin, hCys tayininin önemli olduğu plazma gibi karmaşık bir matrikse klasik kromatografik ve immünolojik yöntemlerin çoğundan daha basit, ucuz ve hızlı bir şekilde uygulanabilmesi için diğer amino asitlerin bozucu etkilerinin kemometrik bir yaklaşımla ortadan kaldırılması gerekmektedir.





## KAYNAKLAR

1. NEKRASSOVA, Olga., LAWRENCE, Nathan S., COMPTON, Richard G., 2003, Analytical determination of homocysteine: a review, *Talanta*, 60, 1085-1095
2. Prof.Dr. TEKMAN, Şevket., Prof.Dr. ÖNER, Nevzat., 1998, *Genel Biyokimya Dersleri*, İ.Ü.Yayınları, İstanbul, 3773
3. DUCROS, Vèronique., DEMUTH, Karine., SAUVANT, Marie-Pierre., QUIILLARD, Muriel., CAUSSÈ, Elisabeth., CANDITO, Mirande., READ, Marie-Hélène., DRAÏ, Jocelyne., GARCIA, Isabelle., GERHARDT, Marie-Françoise, for the SFBC Working group on homocysteine, 2002, Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results, *Journal of Chromatography B*, 781, 207-226
4. CHWATKO, G., BALD, E., 2002, Determination of different species of homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography A*, 949, 141-151
5. CAHILL, Mark T., FRCSI (OPHTH), STINNETT, Sandra S., DRPH, FEKRAT, Sharon., MD, 2003, Meta-analysis of plasma homocysteine, serum folate, serum vitamin B12, and termolabile MTHFR genotype as risk factors for retinal vascular occlusive disease, *American Journal of Ophthalmology*, 136 (6), 1136-1150
6. MINER, Steven E.S., EVROVSKI, Jovan., COLE, David E.C., 1997, Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update, *Clinical Biochemistry*, 30 (3), 189-201
7. CALLE, M. De la., USANDIZAGA, R., SANCHA, M., MAGDALENO, F., HERRANZ, A., CABRILLO, E., 2003, Homocysteine, folic acid and B group vitamins in obstetrics gynaecology, *European Journal of Obstetrics&Gynecology and Repdoductive Biology*, 107, 125-134
8. TEWARI, Prakash C., ZHANG, Bin., BLUESTEIN, Barry I., 2004, Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Cetaur® homocysteine assay, *Clinica Chimica Acta*, 342, 171-178
9. LUSÍS, Aldon J., 2003, Genetic factors in cardiovascular disease: 10 questions, *Trends cardiovasc Med*, 13, 309-316
10. MARCHESONI, D., DRIUL, L., PLAINO, L., VILLANI, M. T., BECAGLI, L., MOZZANEGA, B., 2003, Menopause rather than estrogen modifies plasma homocysteine levels, *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 81, 293-297
11. WOUTERS, M. G., MOORREES, van der MOOREN , M. J., BLOM, H. J., BOERS, G. H. , SCHELLEKENS, C. M. , THOMAS, C. M. , ESKES, T. K., 1995, Plasma homocysteine and menopausal status, *Eur. J. Clin. Invest.*, 25, 801
12. ARNADOTTIR, M., HULTBERG, B., VLADOV,NILSSON-EHLE, P. , THYSELL, H. ,1996,hyperhomocysteinemia in cyclosporin treated renal transplant recipients, *Transplantation* , 61, 509-512

13. DEL, WILCKEN, Del. , GUPTA, VJ, BETTS, A. K. , 1981, Homocysteine in the plasma of renal transplant recipients: effects of cofactors fo methionine metabolism, *Clin Sci*, 61, 743-749
14. BERGER, P. B. , JONES, J. D., OLSON, L. J., ET AL., 1995, Increase in total plasma homocysteine concentration after cardiac transplantation, *Mayo Clin Proc*, 70, 125-131
15. MASSY, Z. A. , CHADEFaux- VEKEMANS, B. , CHEVALIER a. ,et al, 1994, Hyperhomocysteinemia: a significant risk factor for cardiovascular disease in renal transplant recipients, *Nephrol Dial Transpl*, 9, 1103-1108
16. ERMENS, A. A., REFSUM, H., RUPREHT, J., et al, , 1991, Monitoring cobalamin inactivation during nitrous oxide anesthesia by determination of homocysteine and folate in plasma and urine, *Clin. Pharmacol Ther*, 49, 385-389
17. CHOU, S. T., KO, L. E., YANG, C. S., 2001, High performance liquidchromatography with fluoimetric detection for the determination of total homocysteine in human plasma method and clinical applications, *Anal. Chim. Acta*, 429, 331-336
18. HULTBERG, B. , ANDERSON, A. , ISAKSSON, A. , 1997, The cell damaging effect of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative strss, *Toxicology*, 123, 33-40,
19. TCHERKAS, Y. V. , DENISENKO, A. D., 2001, Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography, with fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A* , 913, 309-313
20. CARDUCCI, Claudia. ,BIRARELLI, M., NOLA, M. , ANTONOZZI, I. , 1999, Automated high-performance liquid chromatographic methodfor the determination of homocysteine in plasma samples, *J. Chromatogr. A*, 846, 93-100
21. STABLER, S. P. , MARCELL, E. R., PODELL, E. R. , ALLEN, R. H. , 1993, *Blood* 81, 3404
22. MINNITI, G. , PIANA, A. , ARMANI, U., CERONE, R. , 1998, Determination of plasma and serum homocysteine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 828, 401-405
23. KANIOWSKA, E. , CHWATKO, G. , 1998, Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S- pyridinium derivatives by high-performances liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A*, 798, 27-35
24. BALD, E. , KANIOWSKA, E, 2000, Liquid chromatographic asseement of total and protein-bound homocysteine in human plasma, *Talanta*, 50, 1233-1243
25. SEVCÍKOVA, Petra. , Tomand, Josef, 2003, Determination of homocysteine in human plasma by micellar electrokinetic chromatography and in-,capillary detection reaction with 2-2'-dipyridyldisulfide, , *J. Chromatogr. A*, 990, 197-204
26. FISKERSTRAND, T. , REFSUM, H. , 1993, Homocysteine and other thiols in plasma and urine, automated determination and sample stability, *Clinical Chemistry*, 39, 263-271
27. IVANOV, A. R. , NAZIMOV, I. V. , 2000, Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood: II. High-performance capillary electrophoresis with phtometric detection, , *J. Chromatogr. A*, 895, 157-166

28. MUKAI, T. , TOGAWA, T. , 2002, Determination of homocysteine thiolactone and homocysteine in call cultures using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 767, 263-268
29. MELNYK, S. , POGRIBNA, M., 1999, A new HPLC method for simultaneous determination of oxidized and reduced plasma aminothiols using coulometric detection, *J. Nutr. Biochem*, 10, 490-497
30. D'ERAMO, L. D. , FINKELSTEIN, A. E. , 1998, Total homocysteine levels in plasma; high-performance liquid chromatographic determination with electrochemical detection and glassy carbon electrode, *J. Chromatogr. B*, 720, 205-210
31. COLE, E. C. , LEHOTAY, D.C. , 1998, Simplified simultaneous assay of total plasma homocysteine and methionine by HPLC and pulsed integrated amperometry, *Clinical Chemistry*, 44, 188-190
32. HOUZE, P. , GAMRA, S. , 2001, *J. Clin. Lab. Anal.* ,15, 144
33. PIETZSCH, J. , JULIUS, U. , 1997, Rapid determination of total homocysteine in human plasma by using N,(o,S)-Ethoxycarbonyl Ethyl ester derivatives and gas chromatography-mass-thiols, *Clinical Chemistry*, 43, 2001-2004-06-16
34. DUCROOS, V., SCHMITT, D. , Gas chromatographic-mass spectrometric determination of total homocysteine in human plasma by stable isotope dilution, method and clinical applications, *J. Chromatogr. B*, 729, 333-339
35. MYUNG, S. W. , KIM, M. , 1999, Determination of homocysteine and its related compounds by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 727, 1-8
36. KANG, S. H. , KIM, J. W. , 1997, *J. Pharm. Biomed. Anal.* , 15, 1435
37. PASAS, S.A. , LACHER, N.A. , 2002, detection of homocysteine by conventional and micro chip capillary electrophoresis/electrochemistry, *Electrophoresis*, 23, 759-766
38. CHASSAING, C. , GONIN, J. , 1999, Determination of reduced and oxidized homocysteine and related thiols in plasma by thiol specific pre-column derivatization and capillary electrophoresis, laser induced fluorescence detection:, *J. Chromatogr. B*, 735, 219-227
39. CAUSSE, e. , ISSAC, C. , 2000, Assay for total homocysteine and other thiols by capillary electrophoresis laser induced fluorescence detection I., Preanalytical condition studies, *J. Chromatogr. A* , 895, 173-178
40. LING, B. L. , BAEYENS, W. R. G. , 1991, Capillary zone electrophoresis with ultraviolet and fluorescence detection for the analysis of thiols Application to mixtures and blood, *A.C.A.*, 255, 283-288
41. NEKRASSOVA, O., WHITE, P. C. , 2002, An electrochemical adaptation Ellman's test, *Analyst*, 127, 797-802
42. SEYMOUR, E. H. , WILKINS, S. J. , 2002, Electrochemical detection of glutathione an electrochemically initiated reaction pathway, *Analytical Letters*, 35, 8, 1387-1399
43. WHITE, P. C. , LAWRENCE, N. S. , 2001, Online electrochemical tagging of cysteines in proteins during nanospray, *Microchim. Acta.* , 137, 87
44. ROHNER, T. C. , ROSSIER, J. S., 2002, *Electrochem. Commun.*, 4, 695-700
45. FRICK, Barbara, SCHRÖCKSNADDEL, Katherina, 2003, Rapid measurement of total homocysteine by HPLC, *Clinica. Chimica. Acta.* , 331, 19-23

46. BALD, Edward, GLOWACKI, Rafal, 2001, 2-chloro-1-methylquinolium tetrafluoroborate as an effective and thiols specific UV-Tagging reagent for liquid chromatography, *J. Liq. Chrom& rel. Technol.*, 24, 9, 1323-1339
47. BOLYA, Molnar-Perl, 2001, Derivatization and chromatographic behavior of the o-phthalaldehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group containing additives, *J. Chromatogr. A*, 913, 283-302
48. MALINOW, M. R., KANG, S. S., TAYLOR, L. M., WONG, P. W. K., COULL, B., 1989, Prevalence of hyperhomocyst(e)inemia in patients with peripheral arterial occlusive disease, *Circulation*, 79, 1180
49. KLEINMAN, W. A., RICHIE, J. P. Jr, 2000, *Pharmacol*, 60, 19
50. STABLER, S. P., MARCELL, P. D., PODELL, E. R., ALLEN, R. H., 1987, A novel gas chromatography-mass spectrometric method for the measurement of homocysteine in plasma, *Anal. Biochem*, 162, 185
51. STABLER, S. P., MARCELL, P. D., PODELL, E. R., ALLEN, R. H., 1988, Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Clin. Invest.*, 81, 466
52. SHINOHARA, Yoshihiko, HASEGAWA, Hiroshi, TAGOKU, Kazunori, HASHIMOTO, Takao, 2001, Simultaneous determination of methionine and total homocysteine in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 758, 283-288
53. KIM, Ick-Joong, PARK, Soo-Jin, KIM, Hie-Joon, 2000, Chiral separation of homocysteine by derivatization with 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole, followed by capillary electrophoresis using  $\gamma$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. A*, 877, 217-223
54. SCHIPCHANDLER, M. T., MOORE, E. G., 1995, *Clinical Chemistry*, 41, 991
55. TAKSKY, G., MAYRING, L., KREUZER, H., 1978, High resolution, higher order UV/Vis derivative spectrometry, *Angewandte Chemie*, 17, 11, 785
56. HAMMOND, V., J., PRICE W. C., 1953, *J. Opt. Soc. Am.*, 43, 924
57. TANNENBUER, E., MERKEL, P. B., HAMILL, W. H., 1953, *J Phys. Chem.*, 21, 311
58. MORRISON, J. D., 1953, *J Phys. Chem.*, 21, 1767
59. GIESS, A. T., FRENCH, C., S., 1955, *Appl. Spectrosc*, 9, 78
60. FRICE, J., GETROST, H., 1977, Organic reagents for trace analysis, E. Merck Darmstadt, 104
61. COLIER, G., L., SINGLETON, F., 1956, *J. Appl. Chem.*, 6, 495
62. TALSKEY, G., 1981, High order differentiation for fine resolution of spectra and other electric signals, *Tech Messen*, 48, 211
63. MASHIMA, Ryuichi, YAMAMOTO, Yorihiro, 2003, Simultaneous determinations of methionine sulfoxide and methionine in blood plasma using gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 313, 28-33
64. POTGIETR, H. C., UBBINK, J. B., BISSBORT, S., 1997, Spontaneous oxidations of methionine levels, *Analytical Biochemistry*, 86-93

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında İstanbul'da doğdum. İlkokulu Fuat Baymur İlkokulu, orta ve lise öğrenimimi Üsküdar Kız Lisesi'nde tamamladım. 1997 yılında İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünde yüksek öğrenimime başladım. 2001 yılında mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.