



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**[YÜKSEK LİSANS TEZİ]**

**[BİYOTİYOLLERİN TAYİNİ İÇİN ALTIN NANOPARÇACIK  
ESASLI FLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ]**

**[Asuman ÇİFTECİ]**

**[DANIŞMAN  
Doç. Dr.Saliha Esin ÇELİK]**

**[Kimya Anabilim Dalı ]**

**[Analitik Kimya Programı ]**

**[İSTANBUL-2019]**

Bu çalışma 24.06.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

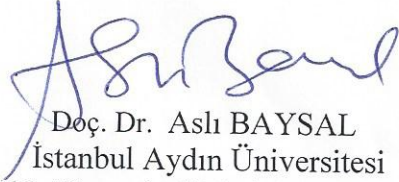
TEZ JÜRİSİ



Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Aslı BAYSAL  
İstanbul Aydın Üniversitesi  
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu



[20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın aboneliği olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin..... numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, ..... numaralı ..... projesi ile desteklenmiştir.]

## ÖNSÖZ

Çalışmam boyunca değerli bilgilerini sabırla ve hoşgörü ile benimle paylaşan, saygıdeğer danışman hocam; Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel ve akademik kimliğiyle her zaman örnek olan, Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Ayşe Nur ÖNEM'e, Öğr. Gör. Dr. Esin KONDAKÇI AKYÜZ'e Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDEŞER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme ve çok kıymetli eşim Ferhat Can ÇİFTECİ'ye desteklerinden ötürü yürekten teşekkür ederim.

Haziran 2019

[Asuman ÇİFTECİ]

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

## İçindekiler Tablosu

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xii
SUMMARY .....	xiv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>4</b>
2.1. BİYOTİYOLLER .....	4
2.1.1. Biyotiyol Bileşikler .....	5
2.1.1.1. İndirgenmiş Glutasyon.....	5
2.1.1.2. Sistein .....	6
2.1.1.3. Homosistein.....	6
2.1.1.4. N-asetil sistein.....	7
2.1.1.5. Metiyonin.....	7
2.1.1.6. Lipoik Asit .....	8
2.1.1.7. Sisteamin, 1,4-Ditiyoeritritol, Penisilamin ve Glutasyon Etil Ester.....	8
2.2. NANOTEKNOLOJİ .....	9
2.2.1. Nanoyapılar .....	10
2.3. BİYOTİYOLLERİN TAYİN YÖNTEMLERİ.....	11
2.3.1. Spektrofotometrik Ellman Yöntemi .....	11
2.3.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri.....	12
2.3.3. Nanoparçacık Esaslı Yöntemler .....	13
2.3.3.1. Nil Kırmızısı-AuNP Yöntemi .....	13
2.3.3.2. BODIPY-AuNP Esaslı Florometrik Sensör.....	14
2.3.3.3. DTNB-AuNP Yöntemi.....	15
2.3.4. Literatürde Yer Alan Tiyol Reaktif Probları ve Kemosensörler .....	15

<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR .....	17
3.2. KİMYASAL MADDELER .....	17
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI.....	17
3.3.1. Rodamin 6G-Altın Nanoparçacık Esaslı Biyotiyol Tayini için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	17
3.3.2. AuNP (Altın Nanoparçacık) Sentezi .....	18
3.3.3. Klasik DTNB Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	18
3.3.4. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	18
3.3.5. Biyotiyol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	18
3.3.6. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması .....	18
3.3.7. İlaç Örneklerinin Hazırlanması .....	19
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER .....	19
3.4.1. Rodamin 6G-Altın Nanoparçacık Esaslı Biyotiyol Tayini Yöntemi.....	19
3.4.2. Orijinal Ellman Yöntemi .....	19
3.4.3. HPLC Yöntemi .....	19
3.4.4. Biyotiyollerin Üçlü Sentetik Karışımlarının Hazırlanması Ve Toplam Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi .....	20
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>21</b>
4.1. RODAMİN-6G ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI FLOROMETRİK BİYOTİYOL TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ .....	21
4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi .....	21
4.1.1.1. <i>Rh-6G Konsantrasyonunun Belirlenmesi</i> .....	21
4.1.1.2. <i>Rd6G/AuNP Yönteminde Reaksiyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi</i> .....	21
4.1.2. Sentezlenen Altın Nanoparçacığın Spektrofotometrik Karakterizasyonu.....	23
4.1.3. Rd6G/AuNP Yöntemi ile Biyotiyollerin Tayini.....	24
4.1.4. Rh-6G/AuNP Yönteminin Çeşitli Biyotiyollere Uygulanması .....	24
4.1.4.1. <i>Sistein</i> .....	24
4.1.4.2. <i>Sisteamin</i> .....	25
4.1.4.3. <i>N-asetilsistein</i> .....	26
4.1.4.4. <i>Penisilamin</i> .....	27
4.1.4.5. <i>1,4-Ditiyoeritritol</i> .....	27
4.1.4.6. <i>Lipoik Asit</i> .....	28
4.1.4.7. <i>Metiyonin</i> .....	29
4.1.4.8. <i>Homosistein</i> .....	29

4.1.4.9. <i>Glutasyon</i> .....	30
4.1.4.10. <i>Yükseltgenmiş Glutasyon</i> .....	31
4.1.4.11. <i>Sistin</i> .....	31
4.1.4.12. <i>Homosistin</i> .....	32
4.1.5. Biyotiyollerin Molar Floresans Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi .....	33
4.1.6. Biyotiyol Bileşiklerin Rd6G/AuNP ve Ellman Yöntemine Göre Elde Edilen Dedeksiyon Limiti (LOD) Değerlerinin Karşılaştırılması .....	34
4.1.7. Biyotiyol Bileşiklerin SETİ (Sistein Eşdeğeri Tiyol İçeriği) Katsayılarının Belirlenmesi ve Orjinal Ellman Yöntemiyle Karşılaştırılması .....	35
4.1.8. Biyotiyol Üçlü Sentetik Karışım Çözeltilerinin Rd6G/AuNP Yöntemine Göre Toplam Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi .....	36
4.1.9. Yöntemin Kesinliğinin ve Doğruluğunun Belirlenmesi .....	37
4.1.10. Rd6G/AuNP Yönteminin Farmasötik İlaçlara Uygulanması .....	37
4.1.11. İnterferans Çalışmaları .....	38
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>40</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>45</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>49</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>50</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1:İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı. ....	5
Şekil 2.2:Sistein ve sistinin kimyasal yapısı. ....	6
Şekil 2.3:Homosistein ve homosistinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.4:N-asetil sisteinin kimyasal yapısı. ....	7
Şekil 2.5:Metiyoninin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.6:Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı. ....	8
Şekil 2.7:Sisteamin, 1,4-ditiyoeritritol ve penisilamin kimyasal yapısı. ....	9
Şekil 2.8:Nanoyapılar ve özellikleri.....	11
Şekil 2.9:DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)' nin tiyol grubu bileşik varlığında TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit)' ye dönüşümü .....	12
Şekil 2.10:DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit) ve TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit)'nin dalgaboyu-absorbans grafikleri .....	12
Şekil 2.11:Hat-üstü HPLC-DTNB dedeksiyon sisteminin enstrümental şeması.....	13
Şekil 2.12:Nil Kırmızısı-AuNP Yönteminin çalışma prensibi.....	14
Şekil 2.13:(A) AuNP, BODIPY, sisteinli ve sisteinsiz BODIPY–AuNP'lerin Floresans ve B) Absorbans spektrumları .....	15
Şekil 2.14:DTNB-AuNP yönteminin tiyol varlığında TNB'ye dönüşümü.....	15
Şekil 4.1:Artan konsantrasyonlardaki Rd6G emisyon spektrumları (a) 3.33µM (sönümün gerçekleştiği konsantrasyon) (b) 4.00 µM (c) 5.66 µM (d) 6.66 µM (e) 10.0 µM .....	21
Şekil 4.2:Tiyol varlığında oluşan AuNP'lere pH'ın etkisi.....	22
Şekil 4.3: Sistein varlığında (c: 3.33 mM) Rd6G/AuNP yönteminin reaksiyon kinetiği. ....	23
Şekil 4.4:Sentezlenen altın nanoparçacığın UV-görünür bölge spektrumu ( $\lambda_{max}$ : 525 nm).....	24
Şekil 4.5:(a) 33.3 µM Rd6G çözeltisi; sistein yokluğunda (b) ve varlığında (c) elde edilen Rd6G/AuNP yönteminine ait emisyon spektrumları .....	24



<b>Şekil 4.6:</b> Sistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 1.33 µM, b: 2.66 µM, c: 3.33 µM, d: 4.00 µM, e: 5.33 µM Cys) .....	25
<b>Şekil 4.7:</b> Sistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği.....	25
<b>Şekil 4.8:</b> Sisteamin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 2.00 µM, d: 2.66 e: 3.33 µM CA).....	26
<b>Şekil 4.9:</b> N-Asetilsistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 2.66 µM, b: 4.00 µM, c: 5.33 µM, d: 6.66 µM, e: 8.00 µM NAC).....	27
<b>Şekil 4.10:</b> Penisilamin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 2.66 µM, b: 3.33 µM, c: 4.00 µM, d: 53.3 µM, e: 6.66 µM PA) .....	27
<b>Şekil 4.11:</b> 1,4-Ditiyoeritritol varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 6.66 µM, b: 1.33 µM, c: 2.00 µM, d: 2.66 µM, e: 3.00 µM DTE).....	28
<b>Şekil 4.12:</b> Lipoik asit varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 2.00 µM, d: 2.66 µM, e: 3.33 µM LA) .....	29
<b>Şekil 4.13:</b> Metiyonin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.33 µM, b: 0.66 µM, c: 1.00 µM, d: 1.33 µM, e: 1.66 µM Met).....	29
<b>Şekil 4.14:</b> Homosistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 2.00 µM, d: 2.66 µM, e: 3.33 µM H-Cys).....	30
<b>Şekil 4.15:</b> Glutasyon varlığında Rh-6G-AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 0.83 µM, c: 1.00 µM, d: 1.16 µM e: 1.66 µM GSH) .....	31
<b>Şekil 4.16:</b> Yükseltgenmiş glutasyon varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a:0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 2.00 µM, d: 2.66 µM, e: 3.33 µM GSSG).....	31
<b>Şekil 4.17:</b> Sistin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a:0.33 µM, b: 0.66 µM, c: 1.00 µM, d: 1.33 µM, e: 1.66 µM Cyst).....	32
<b>Şekil 4.18:</b> Homosistin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 1.66 µM, d: 2.00 µM, e: 2.66 µM H-Cyst).....	33
<b>Şekil 4.19:</b> Rd6G/AuNP ve HPLC yöntemlerine göre bazı farmasötik ilaç örneklerinin tiyol içeriği (N=4) P=0.05 için $t_{deneyse} = 0.28$ , $t_{tablo} = 3.18$ , $t_{deneyse} < t_{tablo}$ ) .....	38
<b>Şekil 5.1:</b> Rodamin-6G'nin moleküler yapısı ve eksitasyon/emisyon bandları .....	40
<b>Şekil 5.2:</b> Geliştirilen florometrik Rd6G/AuNP yönteminin şematik gösterimi.....	41

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 4.1:</b> Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin Tablo Rd6G/AuNP yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları.....	33
<b>Tablo 4.2:</b> Biyotiyol bileşiklerin Rd6G/AuNP ile Ellman yöntemine göre LOD değerleri.....	34
<b>Tablo 4.3:</b> Biyotiyollerin Rd6G/AuNP ve Orijinal Ellman yöntemlerine göre SETİ katsayıları. ....	36
<b>Tablo 4.4:</b> Sentetik tiyollerin karışım çözeltilerinin Rd6G/AuNP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TTC değerlerinin karşılaştırılması.....	37
<b>Tablo 4.5:</b> Geliştirilen Rd6G/AuNP yönteminin kesinliği ve doğruluğu. ....	37
<b>Tablo 4.6:</b> Girişim yapabilecek olası bileşiklerin Rd6G/AuNP yöntemine etkisi.....	38

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>r</b>	: Lineer Korelasyon Katsayısı
<b><math>\epsilon</math></b>	: Molar Floresans Katsayısı
<b>c</b>	: Konsantrasyon

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>Au-NP</b>	: Altın Nanopartikül
<b>Cys</b>	: Sistein
<b>DHLA</b>	: Dihidrolipoik Asit
<b>DTE</b>	: 1,4-Ditiyoeritritol
<b>DTNB</b>	: 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)
<b>FRET</b>	: Floresan Rezonans Enerji Transferi
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: İndirgenmiş Glutasyon
<b>GSHEE</b>	: Glutasyon Etil Esteri
<b>GSSG</b>	: Yükseltgenmiş Glutasyon
<b>Hcys</b>	: Homosistein
<b>LA</b>	: Lipoik Asit
<b>NAC</b>	: N-asetilsistein
<b>NR</b>	: Nil Kırmızısı
<b>Rd6G</b>	: Rodamin-6G
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>R-SH</b>	: Biyotiyoller
<b>SETİ</b>	: Sistein Eşdeğeri Tiyol İçeriği
<b>TNB</b>	: 5-tiyo- 2-nitrobenzoik asit
<b>TTİ</b>	: Toplam Tiyol İçeriği

## ÖZET

### **[BİYOTİYOLLERİN TAYİNİ İÇİN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI FLOROMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ]**

#### **[YÜKSEK LİSANS TEZİ]**

**[Asuman ÇİFTECİ]**

**İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**[Kimya Anabilim Dalı ]**

**[Danışman : Doç. Dr.Saliha Esin ÇELİK ]**

Düşük molekül ağırlıklı endojen biyotiyoller (sistein, N-asetil sistein, homosistein, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon vb.) insan vücudunda birçok fizyolojik ve patolojik proseslerde merkezi rol oynamaktadır. Hücresel tiyollerin seviyesi kanser, Alzheimer ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık ile bağlantılıdır. Bu nedenle, kompleks matrislerde biyotiyollerin belirlenmesi ve kantitatif tayini oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, biyotiyollerin hassas tayini için nanoparçacıkların yığın halindeki malzemelerden daha üstün ve sıradışı özelliklerinden yararlanılarak altın nanoparçacık (Au-NP) esaslı sensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu sensör, sitrat-stabilize altın nanoparçacıkların yüzeyine suda çözünen florofor Rodamin-6G (Rd6G) boyar maddesinin kovalent olmayan etkileşimle adsorbe olması sonucu floresansta bir sönüm gerçekleşmesi ve biyotiyollerin Au-NP'ların yüzeyine gösterdikleri yüksek afiniteleri sebebiyle açığa çıkan Rd6G moleküllerinin floresansının 552 nm emisyon dalgaboyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Önerilen florometrik sensör ile sistein, sistin, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon, homosistein, homosistin, sisteamin, metiyonin, lipoik asit, 1,4-ditiyoeritritol ve penisilamin gibi biyotiyol bileşiklerin standart çözeltilerinin emisyon spektrumları elde edilmiştir. Her bir biyotiyol için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve bu bileşiklerin floresans katsayıları ile

lineer konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. Geliştirilen sensör, doku homojenatlarına uygulanarak kesinlik, doğruluk, lineerlik parametreleri test edilmiş ve yöntem valide edilmiştir. Biyotiyollerin gözlenebilirlik sınırları (LOD) 0.11  $\mu\text{M}$  ile 1.06  $\mu\text{M}$  arasında bulunmuştur. Üçlü sentetik karışımlar hazırlanarak teorik ve deneysel sistemin eşdeğeri tiyol içerikleri kıyaslanmıştır. Florometrik Rd6G/Au-NP yöntemi kullanılarak elde edilen biyotiyollerin sistemin eşdeğeri tiyol içeriği (SETİ) değerleri, DTNB (5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)) reaktifinin kullanıldığı orjinal Ellman yöntemiyle elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır. İki yöntem bulgularının birbiriyle uyumlu olduğu ve anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Ellman yöntemi sadece sülfidril (-SH) grubu biyotiyollere cevap verirken, geliştirilen sensör hem sülfidril hem de disülfür (S-S) grubu biyotiyollere cevap vermektedir. Çeşitli girişim yapıcı bileşiklerin (polifenoller, plazma antioksidanları vb.) reaksiyon ortamını bozucu etkileri incelenmiştir. Florometrik Rd6G/Au-NP sensörü bazı farmasötik ilaç örneklerine başarıyla uygulanarak tiyol içerikleri belirlenmiş ve bulgular HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. |

Haziran 2019, [65] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** biyotiyoller, Rodamin-6G, altın nanoparçacıklar, florometrik sensör |

## SUMMARY

### DEVELOPMENT OF GOLD NANOPARTICLE BASED FLUOROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF BIOTHIOLS

M.Sc. THESIS

Asuman ÇİFTECİ

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Saliha Esin ÇELİK

Endogenous low molecular weight biothiols (cysteine, N-acetylcysteine, homocysteine, reduced and oxidized glutathione etc.) play a central role in a variety of physiological and pathological processes in the human body. The levels of certain cellular thiols have been linked to a number of diseases, including cancer, Alzheimer's, and cardiovascular disease. Therefore, detection and quantification of biothiols in complex matrices is very important. In this thesis study, it was aimed to develop gold nanoparticle (Au-NP) based sensor utilizing superior and extraordinary properties of nanoparticles compared to that of bulk materials for the sensitive determination of biothiols. This sensor is based on the adsorption of water-soluble fluorophore Rhodamin-6G (Rd6G) dye to the surface of citrate-stabilized gold nanoparticles by non-covalent interaction resulting in a quenching of fluorescence and measurement of fluorescence increment at 552 nm emission wavelength as a result of the release of Rd6G molecules from the nanoparticle surface in the presence of biothiols due to their high surface affinities.

Emission spectra of biothiol standard solutions such as cysteine, cystine, reduced and oxidized glutathione, homocysteine, homocystine, cysteamine, methionine, lipoic acid, 1,4-

Dithioerythritol and penicillamine were obtained by using the proposed fluorometric sensor. Calibration curves were generated for each biothiol and the linear concentration ranges were determined by the molar fluorescence coefficient of these compounds. The precision, accuracy and linearity parameters of the developed sensor were tested by applying tissue homogenates and the method was validated. Limit of detection (LOD) values of biothiols ranged between 0.11  $\mu\text{M}$  and 1.06  $\mu\text{M}$ . The experimental and theoretical cysteine equivalent thiol content (CETC) values of ternary synthetic mixtures were evaluated. CETC values obtained by using fluorometric Rd6G/AuNP method of biothiols were compared with the original Ellman assay using DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) reagent. It was observed that the findings of two assays were in accordance with each other and had no significant difference ( $p < 0.05$ ). While Ellman assay merely responds to sulphhydryl (-SH) group, the developed sensor responds to biothiols that have both sulphhydryl and disulphide (S-S) groups. The effects of various interferent compounds (polyphenols, plasma antioxidants, etc.) were evaluated. Fluorometric Rd6G/AuNP sensor was successfully applied to some pharmaceutical samples, their thiol contents were determined and the findings were compared with those of HPLC assay. |

June 2019, 65 pages.

**Keywords:** biothiols, Rhodamin-6G, gold nanoparticles, fluorometric sensor |

## 1. GİRİŞ

Biyotiyoller, vücutta antioksidan savunma sistemlerinde birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde etken rol oynamaktadır (Deneke, 2000). Biyolojik antioksidanlar düşük molekül ağırlıklı, hücrel yağları, proteinleri ve nükleik asitleri serbest radikallerin oksidatif hasarından koruyan bileşikler içermektedir. Biyotiyoller, reaktif oksijen türleri (ROS) giderme kapasitesi ve güçlü indirgeyebilme güçlerinden dolayı bu bileşikler arasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Wlodek, 2002). Bu bileşiklerin insan sağlığına olan yararlarından dolayı (kanser, kalp hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkların önlenmesi gibi) toplam içeriğinin değerlendirilmesi ve beslenme ve tıp alanındaki uygulamaları oldukça önem kazanmıştır (Gutteridge, 1994). Organizmada biyotiyol düzeylerinin azalmasının karaciğer yetersizliği, koroner atardamar hastalığı, felç ve diğer nörolojik rahatsızlıklar gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu görülmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda karaciğer hasarı, cilt lezyonları, yavaş büyüme ve ödem gibi çeşitli hastalıklara sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle biyolojik yaşam sistemlerinde biyotiyollerin konsantrasyon değişimlerini izlemek son derece önemlidir. Glutasyonun indirgenmiş ve yükseltgenmiş formlarının (GSSG/GSH) redoks potansiyeli, hücre içerisindeki redoks ortamının temel bir indikatörüdür (Schafer, 2001) ve GSH hücreler arası dehidroaskorbik asitten askorbik asit oluşumunda rol oynar. Bu nedenlerden dolayı biyotiyollere olan ilgi oldukça artmıştır.

Biyotiyollerin kompleks matrislerde tayin edilmesinde yaşanan zorluklardan bazıları, elverişsiz fizikokimyasal özelliklere (güçlü bir kromofor veya florofor gruba sahip olmamaları) sahip olmalarıdır. Yüksek polariteleri, suda çözünürlükleri bu analizleri zorlaştırmakla beraber tiyol gruplarının oksidasyona açık olmaları yani kararsız yapıları hatalı analitik sonuçlara sebep olmaktadır. Bu bağlamda, tiyol tespitinde floresan özelliğe sahip probalar/sensörler işlemsel kolaylık, yüksek belirginlik, düşük dedeksiyon limitleri, *in-vivo* görüntüleme gibi belirgin avantajlara sahiptir (Huang ve Murray, 2002), (Işık ve diğ., 2013), (Li ve diğ. 2010).

Son yıllarda, nanomalzemeler biyolojik makromoleküllerle boyutsal benzerlikleri, optik ve elektronik özellikleri itibarıyla biyolojik tayinlerde kullanım açısından gittikçe daha çekici



hale gelmektedirler (Chen, 2004). Ortaya çıkan fiziksel özellikler yığın halindeki metalin ve moleküler bileşiklerin özelliklerine benzemez, bu özellikler parçacık boyutuna, parçacıklar arasındaki uzaklığa, koruyucu organik kabuğun doğasına ve nanoparçacıkların şekline bağlıdır (Daniel, 2004). Özellikle altın nanoparçacıkların (Au-NP'ler) asosiyasyonu ve olası agregasyonu (yığışımı) sonucunda oluşan renk değişimi, birbirinden farklı pek çok analitin basit, yüksek seçimli tayinine olanak vermektedir (Chen, 2004). Analitik veya biyolojik bilimlerde kullanılmak üzere nanoteknoloji esaslı ultra hassas tayin ve görüntüleme yöntemleri geliştirilmesi bilim dünyasında ilgi çekici hale gelmektedir. Fonksiyonel altın nanoparçacıklar, yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve rezonans ışık saçılması gibi benzersiz optik özellikleri, bir çeşit yüzey kaplama halinde birleşebilme özelliği ve mükemmel biyouyumluluk (genellikle modifiye edilmemiş Au-NP'ler toksik değildir ve modifiye edilmiş Au-NP'lerin biyolojik toksisitesi onların ligandlarına bağlıdır) gibi özelliklerinden dolayı biyolojik ve farmasötik alanlarda geniş kullanım alanı bulmuştur (Ma,2010).

Altın nanoparçacıklar, boyut-bağımlı optik özellikleri olması ve tiyoller ve tiyol modifiye edilmiş moleküllere yüksek ilgi göstermesi nedeniyle duyarlı algılama materyalleri olarak ilgi çekmektedir (Tsang, 2005). Tiyol tayininde kullanılan optik problemlerin büyük bir kısmı, tiyollerin kuvvetli nükleofilik özelliği ve metal iyonlarına bağlanma eğilimi gibi iki temel özellikten yararlanmaktadır. Bu doğrultuda, optik problemlerin büyük bir kısmı, algılamada tiyoller ve problemler arasındaki bazı özel reaksiyonları, örneğin aldehitlerle halka kapanması, sülfonamid ve sülfonat esterlerinin tiyollerle parçalanması, selenyum-azot bağının tiyollerle koparılması, metal komplekslerinin ligand değişimi, nano-taneciklerle etkileşimler ve diğer benzeri reaksiyonlar kullanılmaktadır (Chen, 2004; De Silva, 1998; Maeda, 2005). Biyolojik öneme sahip biyotiyollerin kompleks matrislerde seçimli tayininde basit, düşük-maliyetli ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Organik/inorganik hibrit malzemelerin üretiminde organik kromofor ve altın nanoparçacıkların kullanılması gelişen nanoteknoloji alanındaki ilgi çeken başlıklardan bir tanesidir. Bir fotoluminesans söndürücü olarak AuNP'lar, kromofor-AuNP kompozitlerin moleküler uyarma enerjisini oldukça verimli şekilde söndürebilmektedir. AuNP'ların bu üstün söndürme özelliği floresan rezonans enerji transferi (FRET) prosesine dayanan analizlerde kullanılmaktadır. Ancak, bu zamana kadar tiyol bileşiklerin tespiti için kromofor-AuNP kompozitlerinden faydalandığı bildirilen çalışmalar oldukça azdır (Chen ve Chang, 2004; Huang ve Chang, 2006; Xu ve diğ.,2016).

Bu tez çalışmasında, üzerinde floresans özelliği olan Rodamin-6G (Rd6G) adsorplanmış Au-NP'ler (Rd6G/AuNP'ler) varlığında biyotiyollerin tayini için yeni bir florometrik sensör geliştirilmiştir. Bu sensör, sitrat-stabilize altın nanoparçacıkların yüzeyine suda çözünen florofor Rodamin-6G (Rd6G) boyar maddesinin kovalent olmayan etkileşimle adsorbe olması sonucu floresansta bir sönüm gerçekleşmesi ve biyotiyollerin Au-NP'ların yüzeyine gösterdikleri yüksek afiniteleri sebebiyle açığa çıkan Rd6G moleküllerinin floresansının 552 nm emisyon dalgaboyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemi karmaşık biyolojik örnekler ve farmasötik ilaç örneklerindeki biyotiyol içeriğinin tespitinde ön işlem gerektirmeksizin başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Rd6G/AuNP yöntemiyle elde edilen biyotiyollerin sistein eşdeğeri tiyol içerikleri orijinal Ellman yöntemiyle elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Biyolojik örnekler ve farmasötik ilaç örneklerinde bulunan biyotiyollerin tayini için hızlı, basit ve duyarlı bir yöntem geliştirilmiştir. |

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. BIYOTİYOLLER

Biyotiyoller, sülfidril (-SH) fonksiyonel gruplarının varlığıyla tanımlanmış organik sülfür türevleri sınıfında yer alırlar. Biyolojik merkaptanlar olarak da adlandırılmaktadırlar. Biyotiyoller (R-SH) molekül ağırlıklarına göre sınıflandırılmakta olup, düşük molekül ağırlığına sahip olanlar serbest tiyoller ve yüksek molekül ağırlığına sahip olanlar protein tiyoller olarak ayrılmaktadırlar (Deneke, 2000).

Tiyol bileşiklerin en önemli fonksiyonlarından biri antioksidan özellik göstermeleridir, yani diğer bir deyişle indirgeme yeteneğine sahip olmalarıdır. Yaşayan organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asit,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, ürik asit, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri bulundururlar (Shahidi, 1996). -SH grubu içeren tiyol bileşikler, oksidan varlığında disülfür formuna yükseltgenirken, hücrelere zarar veren oksidan türleri süpürerek düşük toksisiteli ya da toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bir tiyol bileşiğinin reaktif oksijen ve azot türleri ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{O}_2\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}\cdot$  vb.) ile reaksiyonu sonucunda thiyl radikali ( $\text{R-S}\cdot$ ) oluşur (Ross ve Moldeus, 1986). Fizyolojik pH'ta thiyl radikalleri kararsızdır ve disülfür haline dönüşebilir (Wlodek, 2002). Bir tiyol bileşiğin antioksidan olarak etkinliği, yapısındaki -SH grubunun sayısı ile doğru orantılıdır. Bu durum, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikler ve enzimleri önemli hale getirir (Ma, 2010; Philip, 2008)

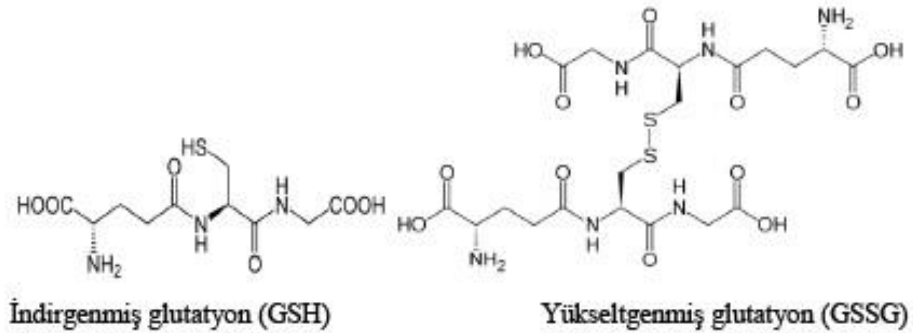
Tiyoller, tiyol/disülfür oranının düzenlenmesi, proteinlerdeki disülfid bağlarının indirgenmesi, hücre büyümesi ve çoğalması, protein sentezi, bağışıklığın düzenlenmesi, bazı redoks reaksiyonlarında substrat olarak kullanılması gibi önemli biyolojik fonksiyonlarda aktif görev almaktadır. Örneğin, hücre içi veya hücre dışı ortama tiyol ilavesi protein yapı ve fonksiyonunda kuvvetli etkilere neden olabilir. İndirgenmiş glutatyonun (GSH), yükseltgenmiş formu olan GSSG'ye oranı biyolojik bir sistemde oksidatif hasarın etkili bir ölçüsü olmuştur (Knapen ve ark., 1999).

### 2.1.1. Biyotiyol Bileşikler

Tiyol grubu içeren, vücutta üretilebilen (endojen) bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH), sistein, homosistein, dihidrolipoik asit (DHLA) ve bunların disülfürleri olan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), sistin, homosistin, lipoik asit (LA) önemli biyotiyollerdir. Diğerleri ise, N-asetilsistein (NAC), sisteamin, 1,4-ditiyoeritritol (DTE), glutatyon etil ester (GSHEE) ve metiyonindir.

#### 2.1.1.1. İndirgenmiş Glutatyon

Glutatyon (L- $\gamma$ - glutamil-L-sisteinil-glisin); düşük molekül ağırlıklı, hücrelerde suda çözünebilir yapıda olan antioksidan bir moleküldür (Shahidi, 1996). L-sistein, L-glutamat ve L-glisin amino asitlerinden oluşan ve glutamat ile sistein amino asitleri arasında  $\gamma$ -peptid bağı içeren bir tripeptittir (Şekil 2.1). Bu molekül karaciğerde sentezlenebilmektedir.



Şekil 2.1: İndirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.

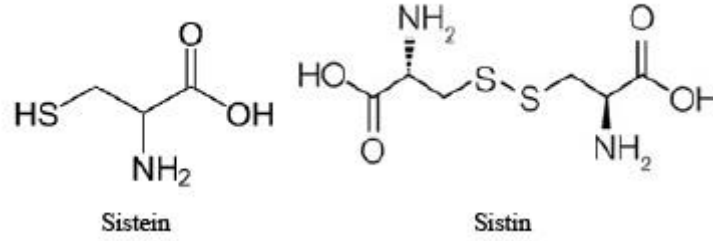
İndirgenmiş glutatyon (GSH) içerdiği tiyol grubu sayesinde hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur. Glutatyon peroksidaz (GPx) isimli enzimin kofaktörlüğünü yaparak, hidrojen peroksidi metabolize eder (Ulakoğlu, 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalar, stres faktörlerinin, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu hızlandırdığı ve lipid peroksidasyonlarına yol açtığını göstermiştir. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır ve oksidatif stres ile GSH düzeylerinin azaldığı bilinmektedir.

Hücrelerde, total glutatyonun %90'i GSH, kalan %10'lık kısmı ise okside glutatyon (GSSG) şeklinde bulunur. Glutatyon indirgenmiş durumda, hemoglobin ve eritrosit hücreproteinlerinin

sistein artıklarını muhafaza eden bir sülfidril tamponu olarak görev yapar. İndirgenmiş glutatyonun (GSH), yükseltgenmiş forma (GSSG) oranı normalde yaklaşık 500/1'dir. Kansere, diyabet, alkolik karaciğer hastalığı, katarakt, AIDS ve Parkinson hastalığı da dahil olmak üzere birçok dejeneratif durumun ve hastalığın nedeni olarak GSH/GSSG dengesinin bozulması gösterilmektedir (John ve Richie, 1992).

### 2.1.1.2.Sistein

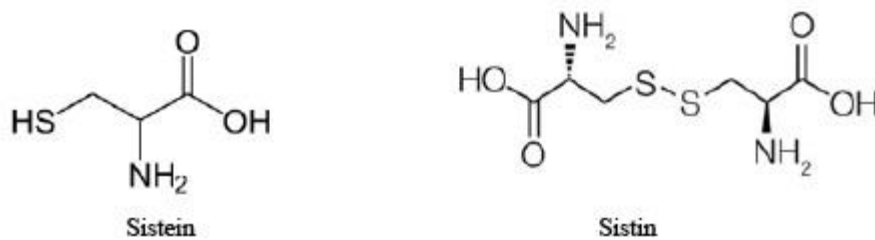
Glutasyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar yönünden önem taşımaktadır (Şekil 2.2) (Curello, 1987). Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında çok önemli rolü olan GSH'nin sentetik bir ön maddesidir (Nath, 1993).



Şekil 2.2: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı.

### 2.1.1.3.Homosistein

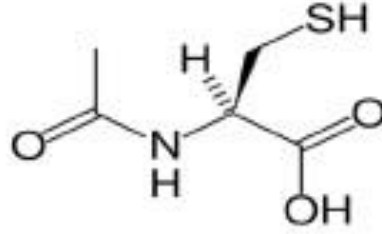
Homosistein, tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerdendir. Temel bir amino asit olan metiyonin metabolizmasında oluşan bir ara üründür ve yükseltgenmiş formu homosistindir (Şekil 2.3) (Moldeus, 1986). Homosistein, yüksek konsantrasyonlarda ateroskleroz ve vasküler hastalıklar için risk teşkil ederken, düşük konsantrasyonlarda yapısındaki -SH grubu sebebiyle antioksidan özellik gösterir (Packer ve diğ., 1995).



**Şekil 2.3:** Homosistein ve homosistin kimyasal yapısı.

#### 2.1.1.4. N-asetil sistein

N-Asetilsistein (NAC) doğal bir aminoasit ve bir tiyol molekül olan L-sistein'in N-asetillenmiş türevine verilen isimdir. N-asetil sistein, doğrudan ve dolaylı olarak antioksidan özellik gösterir (Şekil 2.4). NAC'nin içerdiği serbest tiyol grubu, ROS'un elektrofilik gruplarıyla etkileşime girebilecek kapasitededir (Moldeus, 1986; Aruoma, 1989). NAC tiyolünün ROS'la olan bu etkileşimi, son ürün olan NAC disülfürle beraber bir ara ürünün oluşumuna neden olur (Atmaca, 2004). Aynı zamanda NAC, bir GSH ön maddesi olarak dolaylı yoldan antioksidan etki gösterir (Aruoma, 2004).

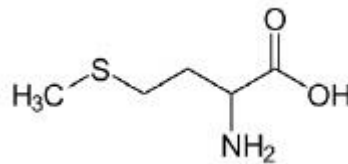


**Şekil 2.4:** N-asetil sisteinin kimyasal yapısı.

NAC, 'in vivo' ve 'in vitro' koşullarda bir antioksidan olarak yaygın kullanılmaktadır. Kuvvetli bir hipokloroz asit ve iyi bir hidroksil radikali süpürücüdür, hidrojen peroksitle ise yavaş reaksiyona girmektedir. NAC, GSH sentezinde bir substrat olarak görev yapar.  $10^{-5}$  M üstünde NAC alınması intrasellüler GSH seviyesinde yaklaşık olarak 10 kat artış meydana getirir (Atmaca, 2004).

#### 2.1.1.5. Metiyonin

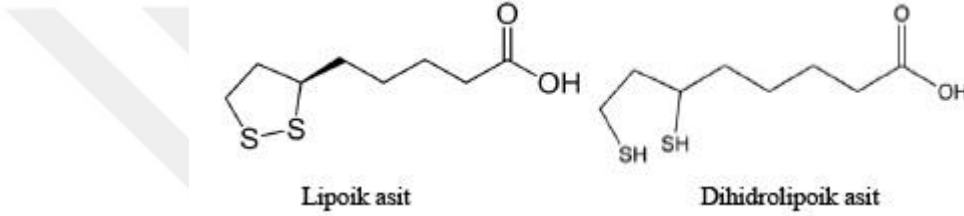
Serbest tiyol grubu değil, ancak Me-S- grubu içeren antioksidan bileşiklerden bir diğeri metiyonindir (Şeki 2.5) (Nimni, 2007). Kükürt içeren bir amino asit olan metiyonin vücudumuzda sentezlenmediği için besinler yoluyla vücuda alınmak durumundadır (Pettit, 1978).



**Şekil 2.5:** Metiyoninin kimyasal yapısı.

### 2.1.1.6.Lipoik Asit

Lipoik asit (LA) ve indirgenme ürünü olan dihidrolipoik asidin (DHHLA) antioksidan özellikleri son birkaç yıldır yaygın bir şekilde incelenmektedir.  $\alpha$ -lipoik asit (LA: 1,2-ditiyolan-3-pentanoik asit), pruvat dehidrojenaz ve ketoglutarat dehidrojenaz için koenzim olarak mitokondride bulunan bir disülfür bileşiğidir (Şekil 2.6) (Lodge, 1997). Birçok hayvan ve bitki dokusunda olduğu kadar çoğu prokaryot ve ökaryot mikroorganizmalarda da mevcuttur (Bast,1998).



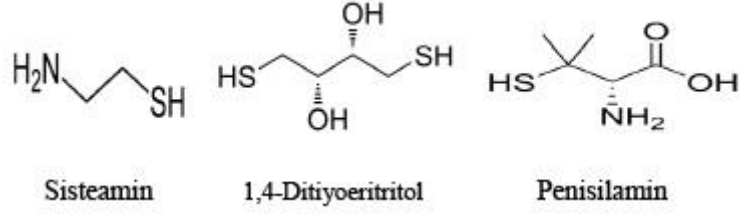
**Şekil 2.6:** Lipoik asit ve dihidrolipoik asidin kimyasal yapısı.

Yükseltgenmiş hal olan lipoik asit, hidroksil radikali, hipokloroz asit ve singlet oksijen süpürücü olarak görev alırlar ve geçiş metallerini kelatlayıcı olarak da rol oynarlar.

Canlı dokularda lipoik asit lipoamid dehidrojenazla DHHLA'ya indirgenir. Redüksiyon potansiyelinden dolayı DHHLA, E vitamini ve glutatyon gibi endojen antioksidanları rejenere etme yetenekleri mevcuttur (Packer, 1995). Dihidrolipoik asit, GSSG'yi GSH'a indirgeme yeteneğine sahip, reaktif tiyoldür (Packer, 1997). Askorbati rejenere edebilir. Ayrıca lipoik aside benzer durumda radikal süpürücü ve metal kelatlayıcı rol oynar.

### 2.1.1.7.Sisteamin, 1,4-Ditiyoeritritol, Penisilamin ve Glutatyon Etil Ester

Sisteamin, oksidasyona duyarlılığı arttıran ve parçalanma sonucunda disülfid sisteamine dönüşümünü sağlayan bir tiyol grubu içermektedir. 1,4-Ditiyoeritritol ise iki adet sülfidril ve hidroksil grubu bulundurur. Penisilamin, bir karbon atomuna bir karbonil ve bir amino grubu, diğer karbon atomuna ise bir sülfidril ile iki metil grubu içerir. Penisilamini sisteinden ayıran özellik sistemin ikinci karbon atomuna iki hidrojen bağlı olmasıdır. Glutatyon etil esterinin yapısında ise amino, -SH, karboksil ve ester grubu mevcuttur (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7:** Sisteamin, 1,4-ditiyoeritritol ve penisilamin kimyasal yapısı.

## 2.2.NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji kelimesini ilk defa terim olarak kullanan bilim insanı Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Norio Taniguchi'dir. Taniguchi 1974'de yayınlanan bir makalesinde nanoteknolojiyi şöyle tanımlamıştır: “Nanoteknoloji genel olarak malzemelerin atom-atom ya da molekül-molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır.” (Norio, 1974). Nanoteknoloji, elektronik ve yarı iletken teknolojisinden, biyosensörlere; nanotüplerden, nanoboyutta boyamalara, mikro cerrahiden, nano-robotlara kadar birçok alanda kullanım alanı bulmuştur.

Nanoteknoloji alanı son 20 yılda artan bir şekilde ilgi çekmiştir. Altın ve gümüş nanoparçacıklarla ilgili yayınların sayısı son yıllarda katlanarak artmıştır. Yapılan çalışma sayısındaki bu artış, nano boyuttaki materyallerin yeni ve değişen özelliklerinden kaynaklanmaktadır. İstenen boyut, şekil ve dağılımda nanoparçacıklar oluşturulmasındaki zorluk nedeniyle yeni ve hassas tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Eustis, 2006).

Nanoteknolojinin günümüzdeki uygulama örnekleri:

- 1-Karbon nanotüp,
- 2- Veri bilgi depolama,
- 3-Karbon lifler,
- 4- Hücre onarım robotları,
- 5- Nano-cerrahi,
- 6- Plastik şişelerin tek katmanlı silisyum dioksitle kaplayarak cam ve plastiğin üstün özelliklerinin birleştirilmesi,
- 7- Polietilen üretiminde zincir yapısı değişimi ile çelikten sağlam taşıyıcı halat üretimi,



- 8- Tekstilde nanoteknoloji uygulaması ile nanometre kalınlıkta liflerden, özellikle karbon liflerden kumaş hazırlanması, kumaşların tek katmanlı bir madde ile kaplanarak su tutmayan ve yanmayan ama esnekliğini koruyan kumaş üretimi,
- 9- Nanopartiküllerden boya hazırlayarak çizilmez ve dayanıklı yüzey boyamaları ve yüzey işlemleri (Doğan, 2006).

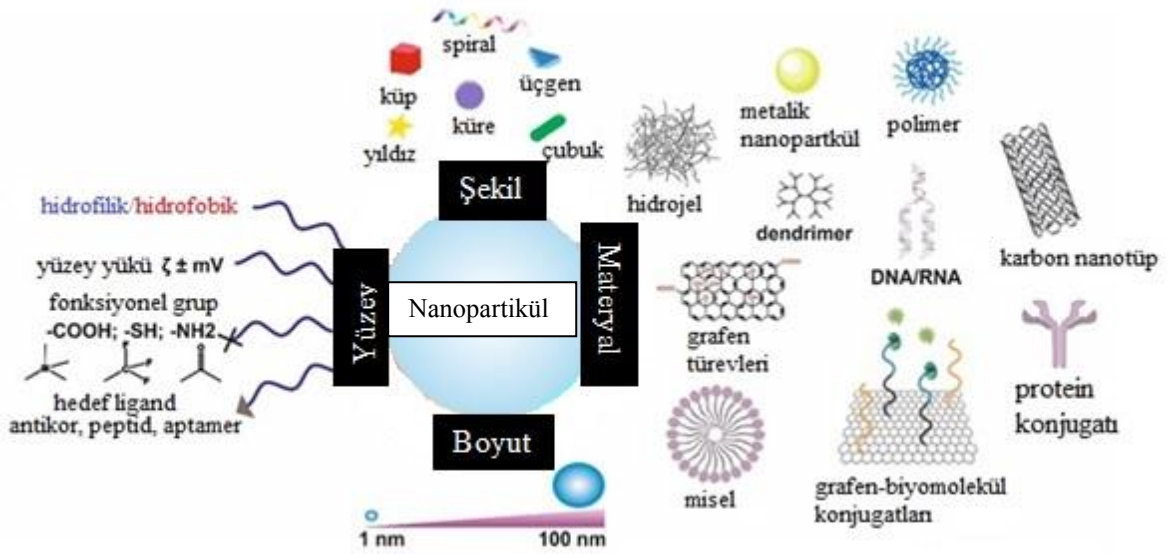
### 2.2.1. Nanoyapılar

Nanoyapılar (Şekil 2.8), yığın halindeki malzemelerden daha üstün ve olağanüstü özelliklere sahip olduğundan dolayı artan şekilde ilgi çekici hale gelmiştir (Di Ventura, 2004). Nanoyapılı malzemelerle ilgili birçok terim kullanılmaktadır.

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

Nanokristal: Nanometre boyut aralığında tek bir kristal katı parçacıktır.

Nanoyapılı ya da nano boyutlu malzemeler: Bir nano boyutlu malzeme, nanometre boyut aralığında herhangi katı bir malzemedir; üç boyutlu olanlar (parçacıklar), iki boyutlu olanlar (ince filmler) ve tek boyutlu olanlar (ince teller) (Di Ventura, 2004).

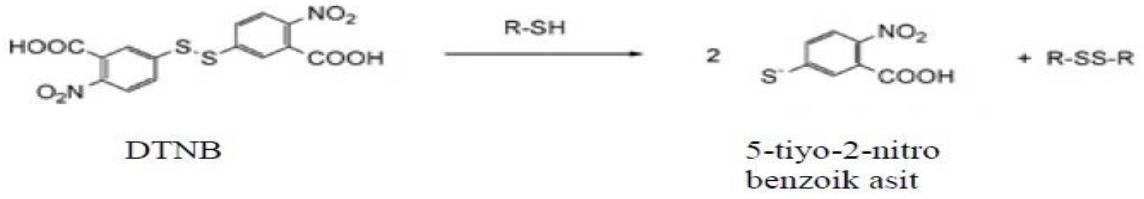


Şekil 2.8: Nanoyapılar ve özellikleri

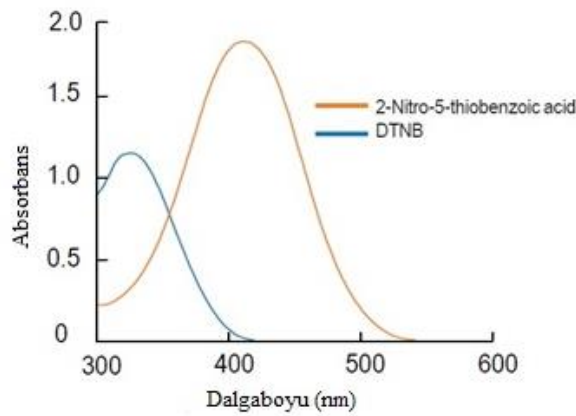
## 2.3.BİYOTİYOLLERİN TAYİN YÖNTEMLERİ

### 2.3.1. Spektrofotometrik Ellman Yöntemi

Bu yöntemde tiyol grupları Ellman reaktifi olarak da bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)) ile kantitatif olarak türevlendirilirler ve reaksiyon sırasında DTNB ile eşdeğer miktarda TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit) açığa çıkar. Oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 412 nm'de ölçülür. Hızlı ve çok yönlü bir yöntem olsa da DTNB reaktifi yalnızca -SH içeren tiyol bileşikleriyle reaksiyon verebilir, reaksiyon hızı tiyol grubunun pKa ve pH değerleri ile yakından ilişkilidir. Bu demektir ki reaksiyon en az pH 7'de olmalıdır. Ancak bu pH değerinde tiyolat anyonu alkilasyon ya da oksidasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonlar verebilir (Hansen, 2007). Ellman yöntemi protein sülfhidrilleri ile reaksiyonu sıklıkla yüksek polarite ve Ellman reaktifinin eksi yükü nedeniyle engellenmektedir (Egwim, 2001) Bu nedenle çeşitli literatürlerde Ellman yönteminin tiyol içerdiği bilinen protein örneklerine uygulanmasında yöntemde bir takım modifikasyonlar yapıldığı görülmektedir (Sava, 2005).



**Şekil 2.9:** DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit)' nin tiyol grubu bileşik varlığında TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit)' ye dönüşümü



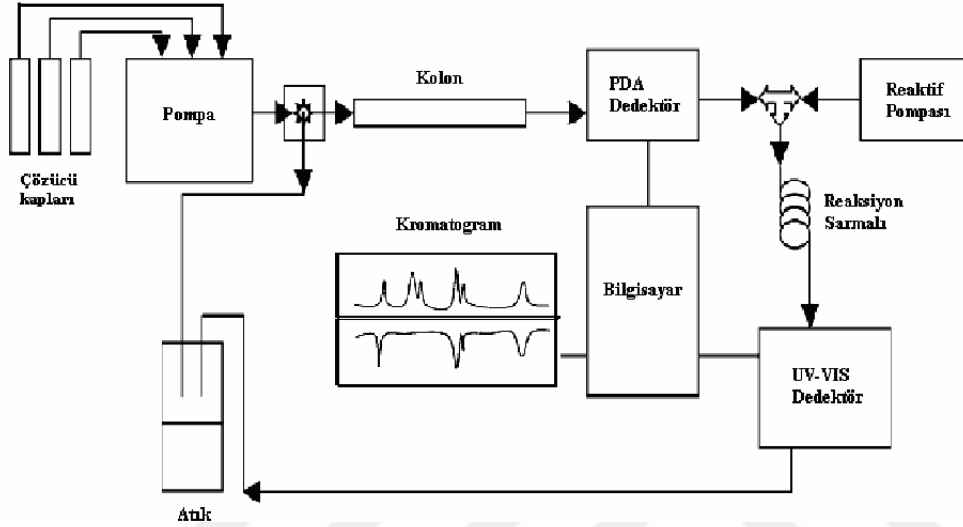
**Şekil 2.10:** DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoik asit) ve TNB (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit)' nin dalgaboyu-absorbans grafikleri

### 2.3.2. Kromatografik Analiz Yöntemleri

HPLC teknikleri diğer yöntemlere göre gıdalarda ve biyolojik örneklerde GSH ve diğer tiyollerini analiz etmek için oldukça sık kullanılır. HPLC yöntemleri, tiyol analizleri için hızlı çok yüksek spesifitesi ile tercih edilebilir bir yöntemlerdir. Özellikle biyotiyollerin kromatografik ve elektroforetik ayrımı için çeşitli tiyol-reaktif florometrik probalar (2-kloro-1-metilkinolinyum tetrafloroborat, 1-benzil-2-kloropiridinyum bromür) ile türevlendirme yapılarak HPLC (Jenke (1987), Awusu Apenden (2005)) GC-MS (Sigit 2001, CE (Chen 2004) gibi farklı analitik yöntemler geliştirilmiştir.

Kolon sonrası analiz yöntemleri biyotiyollerin standardizasyonu için daha uygundur. Özyürek ve arkadaşları (2012) ilaçlarda ve doku homojenatlarında 1-4, ditioeritritol (DTE), L-sistein(Cys), glutatyon (GSH), homosistein (HCys), N-asetilsistein (NAC) ve 1-4, ditioeritritol gibi biyolojik olarak önemli tiyollerin (biyotioller) seçici olarak belirlenmesi için

hat-üstü HPLC-DTNB yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde biyotiyoller gradyanlı elüsyon kullanılarak C18 kolonunda ayrılır, postkolon reaktifi ile pH:8 0,5%'lik M-β-CD çözeltisindeki DTNB reaktifi sarı renkli (5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'ye dönüşür ve 410 nm'de PDA dedektör ile izlenir. TNB kromoforuna bağlı olarak absorbanstaki artış ölçülerek, biyotiyol bileşenlerinin negatif pikleri tespit edilir (Ozyurek, 2012).



Şekil 2.11: Hat-üstü HPLC-DTNB dedeksiyon sisteminin enstrümental şeması.

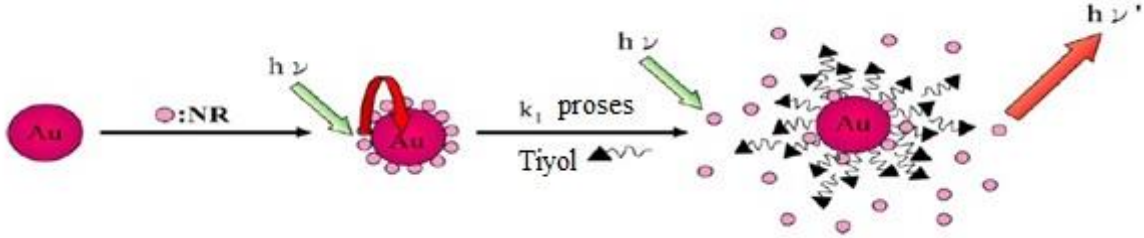
### 2.3.3. Nanoparçacık Esaslı Yöntemler

#### 2.3.3.1. Nil Kırmızısı-AuNP Yöntemi

Bu yöntemde tiyol tayini için Nil kırmızısı (NR) altın nanopartiküller (AuNPs) üzerine kovalent olmayan bir şekilde adsorbe edilerek NR-AuNP elde edilir. Nil kırmızısı ile AuNP arasında floresans rezonans enerji transferi sonucu zayıf bir şekilde floresans gözlenir. NR-AuNP çözeltilerine tiyol ilave edildikten sonra, AuNP yüzeyinden Nil Kırmızısının kopması sonucu olarak güçlü bir floresans gözlenir (Şekil 2-12). NRAuNP içeren çözeltiliye pH:4'te tiyol eklendiğinde floresans artışı gözlenirken, amino asit, alkol, bovin serum albumin ya da hemoglobinin eklendiğinde herhangi bir floresans gözlenmemiştir (Chen,2004).

Negatif yüklü tiyollerin (örn: N-(2-mercaptopropiyonil) glisin) varlığında renk değişimi gözlenmezken nötral tiyollerin (örn: 3-merkaptio-1,2-propandiyol) varlığında renk kestane renginden lavanta rengine, pozitif yüklü tiyoller (örn: sisteamin) varlığında ise morrenge döner. Buna ek olarak, homojen tahlil bazlı floresans rezonans enerji transferi (FRET)

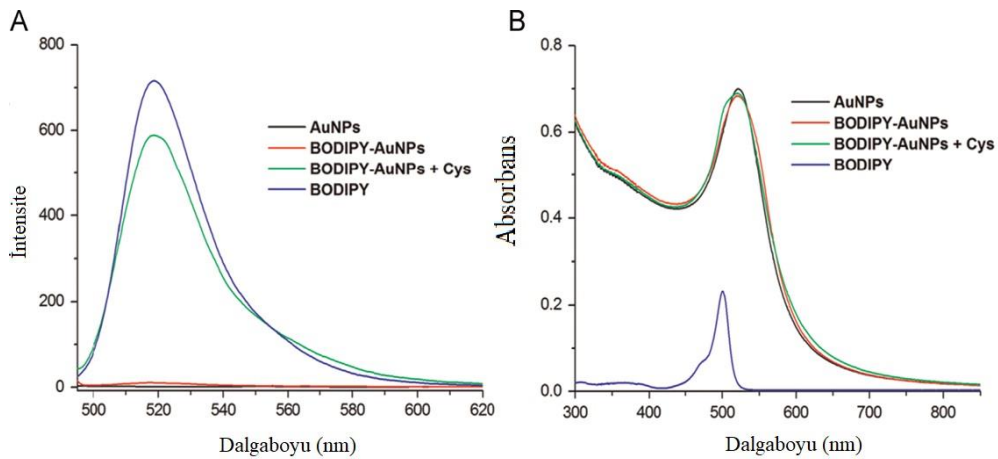
kullanılarak teşhis uygulamaları için nanopartiküller büyük bir potansiyele sahiptir. Bunların optik özelliklerine bağlı olarak, NPler alıcı (söndürücü) veya donör birimleri olarak hareket edebilir (Lee,2007).



Şekil 2.12: Nil Kırması-AuNP Yönteminin çalışma prensibi.

### 2.3.3.2. BODIPY-AuNP Esaslı Florometrik Sensör

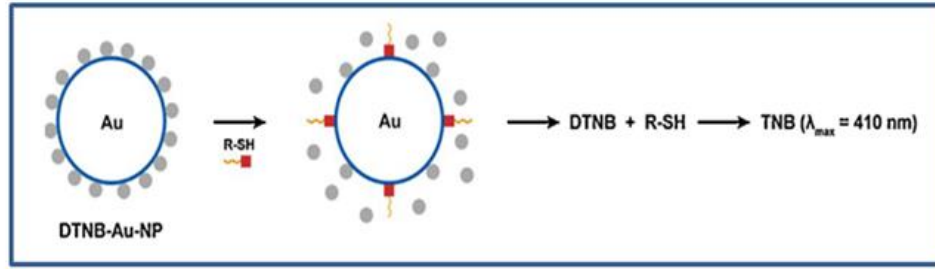
Sulu çözelti içinde tiyol tespiti için yeni bir altın nano parçacık (AuNP) tabanlı sensör geliştirilmiştir. Zayıf N---Au etkileşimleri nedeniyle mezo (4-pirinidil) tutturulmuş BODIPY kromoforu (4,4-difloro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indasen) AuNP yüzeylere bağlanır, organik/inorganik hibrit sistemlerinde floresan rezonans enerji transferi (FRET) sebebiyle floresansta sönüm gözlenir. Tiyol varlığında, mezo- (4-pirinidil) BODIPY kromoforu AuNP yüzeylerden sökülür ve serbest kalır, böylece BODIPY kromoforun floresansı geri yüklenir. Ayrıca, sensör canlı HeLa hücreleri içinde izleme ve hücre içi tiyollerin görüntülenmesi için başarıyla uygulanmıştır (Xu, 2016).



**Şekil 2.13:** (A) AuNP, BODIPY, sisteinli ve sisteinsiz BODIPY–AuNP’lerin Floresans ve B) Absorbans spektrumları

### 2.3.3.3.DTNB-AuNP Yöntemi

Ellman reaktifinin (DTNB) altın nanopartiküllere adsorbe edilmesiyle biyolojik örneklerde tiyol tayini için geliştirilen bir yöntemdir (Guclu, 2013). 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), çözelti içinde serbest sülfhidril grupları ölçülmesine yarayan ve suda çözünebilen bir bileşiktir. DTNB, kovalent olmayan bir etkileşim ile Au-NP üzerine adsorbe edilir ve biyotiyoller ile reaksiyon sonucunda sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat (TNB<sup>2-</sup>) anyonunun oluşmasına bağlı olarak 410 nm'deki absorbans değişimi ölçülür (Şekil 2.14). Bu çalışmada, altın nano parçacıklar, trisodyum sitrat ile altın iyonlarını indirgeme yoluyla hazırlanır, burada sitrat hem indirgeyici hem de stabilize edici madde olarak işlev görür.



**Şekil 2.14:** DTNB-AuNP yönteminin tiyol varlığında TNB’ye dönüşümü

### 2.3.4. Literatürde Yer Alan Tiyol Reaktif Problemleri ve Kemosensörler

Biyolojik tiyollerin geniş çapta kabul görmüş önemi ile yeni tespit yöntemlerinin geliştirilmesine ilgi artmaktadır. Tiyollerin seçici tespiti için bugüne kadar çok sayıda flüoresan prob bildirilmiştir. Biyolojik amino-tiyoller için problemler, nükleofilik süstitüsyon, Michael ilavesi ve disülfid / Se-N bağ bölünmesine dayananları içerir. Bu problemler arasında, nükleofilik süstitüsyon bazlı problemler yaygın olarak HPLC ölçümü için tiyollerin florometrik / kolorimetrik etiketlemede kullanılır. Diğer problemlere dayanan yöntemler hala geliştirilme aşamasındadır. H<sub>2</sub>S için flüoresan problemler, nükleofilik siklizasyon, indirgeme ve metal sülfid oluşumuna dayalı olanları içerir. Bu problemler H<sub>2</sub>S'nin önemli tespit araçları olarak ortaya çıkmaktadır. Genel olarak, çözelti veya serum içindeki çeşitli tiyollerin kantitatif ve seçici konsantrasyon tayinleri için mükemmel yöntemler mevcuttur. Halen ihtiyaç duyulan, hücre içi

konsantrasyonlarda veya in-vivo olarak hızlı dalgalanma sorunlarına, özellikle hidrojen sülfid için, yeterince hızlı olan yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Peng, 2012).

Nükleofil özellikleri nedeniyle, tiyoller Michael alıcıları ile kolayca reaksiyona girer. Bir Michael alıcısı olan Maleimide, ThioGlo1, ThioGlo3 ve ThioGlo5 gibi ticari olarak temin edilebilen bazı floresan tiyol problemlerine yol açan uzun dalga boylu floroforlara konjuge edilmiştir. Bu problemler tiyollerle hızlı bir şekilde reaksiyona girer (genellikle 2-5 dakika içinde) ve proteinlerin floresan etiketlemesi için kullanılır. |



### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG WAS220X marka analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde HI 221 Calibration Check Microprocessor pH-metre, altın nanoparçacık çözeltisinin hazırlanmasında Velp Scientifica manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, Varian Cary Eclipse spektrofloreometre ve florometrik ölçüm yapmak için HELMA marka 10 mm ışık yollu kuartz küvet, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanılmıştır.

#### 3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; Rodamin-6G (Rd6G), altın (III) klorür çözeltisi (ağırlıkça %30; sey. HCl içinde), trisodyum sitrat, sodyum tetraborat, etil alkol (%96), sistein, kateşin, glutatyon, hidroksil amin, homosistein, penisilamin, glutatyon etil esteri, lipoik asit, 1,4 ditiyoeritritol, metiyonin, sisteamin, N-asetil sistein, lipoik asit, kuersetin, askorbik asit, ürik asit, asetik asit, gallik asit, kafeik asit, 2-propanol, bilirubindir. Kullanılan kimyasallar analitik safliktadır.

Çalışılan doku homojenizatları İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesinden temin edilmiştir. Mentopin efervesan tablet Genesis İlaç ve Sağlık Ürünleri A.Ş., Asist pediatrik kullanım için 100 ml şurup hazırlamak için 40 g granül Bilim İlaç San. Ve Tic. A.Ş., NAC 600 mg efervesan tablet Basel İlaç San. Tic. A.Ş.'dan temin edilmiştir. Kullanılan ilaç örnekleri eczaneden temin edilmiştir.

#### 3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

##### 3.3.1. Rodamin 6G-Altın Nanoparçacık Esaslı Biyotiyol Tayini için Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Rodamin-6G stok çözeltisi  $10^{-3}$  M olacak şekilde suda hazırlandı.  $10^{-5}$  M a seyreltildi. Tetrakloroaurat asidinin  $5 \times 10^{-3}$  M stok çözeltisi ağırlıkça %30'luk altın klorür çözeltisinden 0,346 mL alınıp 100 mL'ye su ile seyreltilerek hazırlandı. Bu çözelti, AuNP sentezinde



kullanılmak üzere  $1.0 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde destile suyla seyreltildi. Trisodyum sitrat çözeltisi, 38,8 mM olacak şekilde trisodyum sitrat-2-hidrattan 1,14 gram tartılıp 100 mL destile suda hazırlandı.

### 3.3.2. AuNP (Altın Nanoparçacık) Sentezi

AuNP çözeltisi Turkevic ve Frens yöntemlerine göre hazırlandı. 100 mL  $1.0 \times 10^{-3}$  M Tetrakloro aurat asidi çözeltisi ( $\text{Au}^{3+}$ ), kaynayana kadar reflux altında karıştırıldı. Daha sonra üzerine 10 mL pH 7,4 trisodyum sitrat çözeltisi eklendi ve 15 dakika daha reflux altında karıştırıldı. Açık kırmızı renkli AuNP çözeltisi elde edildi ve oda sıcaklığına soğuyana kadar karıştırıcı ile karıştırıldı.

### 3.3.3. Klasik DTNB Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Ellmann reaktifi olan DTNB çözeltisi pH 7.0 fosfat tamponunda son konsantrasyonu 4 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0) tampon çözeltisi destile su içerisinde hazırlandı.

### 3.3.4. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

2.5 mM pH 2.85 fosfat tamponu hazırlandı. Bunun için 0.195 g  $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 L bidistile suda çözüldü. pH'ı  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ile 2.85'e ayarlandı.

### 3.3.5. Biyotiyol Çözeltilerinin Hazırlanması

Tüm standart tiyol bileşik çözeltileri stokları  $10^{-2}$  M, çalışma konsantrasyonu  $1.0 \times 10^{-4}$  M ve  $5.0 \times 10^{-5}$  M olacak şekilde suda günlük olarak hazırlandı.  $1.0 \times 10^{-2}$  M ürik asit  $2.0 \times 10^{-2}$  M bazda çözüldü. Askorbik asit çözeltisi  $2.0 \times 10^{-3}$  M konsantrasyonda olacak şekilde destile suda günlük olarak hazırlandı.

### 3.3.6. Biyolojik Örneklerin Hazırlanması

Doku homojenizasyonu analiz öncesinde GF/PET-45/25 0.45  $\mu\text{m}$ -gözenek çaplı polyester filtreden süzölmüş ve 1:20 oranında amonyum asetat tamponuyla seyreltilerek kullanılmıştır.  $-80^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen sentetik insan serumu örneğine pH 7.0 Tris-HCl tampon çözeltisi eklenir, santrifüj edildikten sonra kullanılır.

### 3.3.7. İlaç Örneklerinin Hazırlanması

Eczaneden temin edilen ve tiyol içerdiği bilinen ilaç örnekleri (Mentopin, Asist, NAC 600) distile su ile uygun seyreltme oranlarında seyreltilerek kullanıldı. Tüm farmasötik ilaç örnekleri analiz öncesinde 0.45 µm-gözenek çaplı polyester filtreden geçirilmiştir.

## 3.4.UYGULANAN YÖNTEMLER

### 3.4.1. Rodamin 6G-Altın Nanoparçacık Esaslı Biotiyol Tayini Yöntemi

Rd6G/AuNP esaslı tiyol tayin yönteminde, tüplere, hazırlanan 1.5 mL pH 7.4 fosfat tamponu, 0.6 mL Au-NP çözeltisi, 100 µL  $10^{-5}$  M Rd6G, x mL tiyol çözeltisi ( $10^{-4}$  M) ve (0.8-x) mL su eklenerek son hacim 3 mL'ye tamamlanarak çözeltiler hazırlandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 5 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda 552 nm'de intensite değerleri ölçüldü. Bu yöntemle biyotiyol bileşiklerin çalışma eğrileri çizilerek lineer aralıkları tespit edildi ve kalibrasyon denklemleri hesaplandı.

### 3.4.2. Orijinal Ellman Yöntemi

Orijinal Ellman yöntemine göre bir tüpe sırasıyla son hacim 10 mL olacak şekilde 3 mL  $10^{-3}$  M biyotiyol çözeltisi, 2 mL pH 8 fosfat tamponu ve 5 mL su ilave edildi. Bu hazırlanan karışımdan alınan x mL örnek çözeltisi üzerine sırasıyla (3-x) mL su ve pH 7 fosfat tamponunda hazırlanmış ve 4 mg mL<sup>-1</sup> konsantrasyonunda 0.02 mL DTNB çözeltisi ilave edildi. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 2 dakika bekletildi ve örnek bulunmayan referans çözeltilere karşı 412 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

### 3.4.3. HPLC Yöntemi

Tiyol grubu içeren antioksidan bileşiklerin analizi için kullanılan HPLC yönteminde; metanol (A) ve 2.5 mM pH 2.85 fosfat tamponundan (B) oluşan hareketli fazlar kullanıldı. Kromatografik tayin için ACE-C18 (25 cm x 4.6 cm x 5 µm) kolon kullanıldı. Gradient elüsyonu programına göre 20 µL örnek 1 mL/dakika akış hızında; 1. dakika % 95 B, eğim (1.0); 2. dakika % 85 B, eğim (1.0); 3. dakika % 75 B, eğim (1.0); 4. dakika % 70 B, eğim (1.0); 5. dakika % 50 B, eğim (1.0); 10. dakika % 50 B, eğim (1.0) oranında mobil faz bileşimi kolondan geçirildi. 205 nm dalgaboyunda dedeksiyon yapıldı. Bu çalışma koşulları

altında, biyotiyollerin konsantrasyonlarına karşılık pik alanları kullanılarak kalibrasyon denklemleri oluşturuldu. Eczaneden temin edilen etken maddesi NAC olan farmasötik ilaç örneklerinin tiyol içerikleri mg cinsinden belirlendi.

#### 3.4.4. Biyotiyollerin Üçlü Sentetik Karışımlarının Hazırlanması Ve Toplam Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi

Biyotiyollerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarında üçlü sentetik karışımları hazırlandı. Bu sentetik karışımlara Rd6G/AuNP esaslı yöntem uygulanarak beklenen ve deneysel olarak ölçülen toplam tiyol içerikleri (TTİ) mM sistein eşdeğeri cinsinden Eşitlik 3.1 ve 3.2'e göre hesaplandı.

$$TTİ_{\text{Beklenen}} = SETİ_1 \cdot C_1 + SETİ_2 \cdot C_2 + SETİ_3 \cdot C_3 \quad (3.1)$$

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

$$TTİ_{\text{deneysel}} = [(Absorbans \pm \text{kayım}) / \epsilon_{\text{cys}}] \times 10^3 \quad (3.2)$$

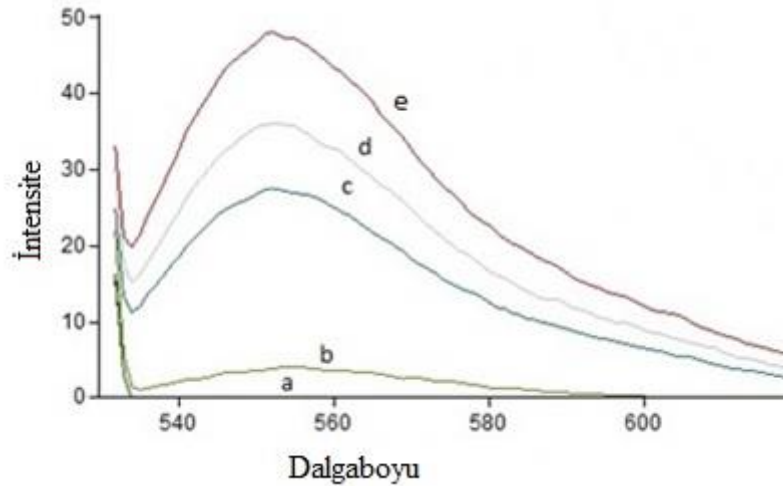
## 4. BULGULAR

### 4.1. RODAMİN-6G ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI FLOROMETRİK BİYOTİYOL TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

#### 4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi

##### 4.1.1.1. Rh-6G Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Sentezlenen sitrat-stabilize AuNP çözeltisinin Rodamin-6G varlığında sönmüldüğü optimum Rd6G konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu sebeple, AuNP çözeltisine  $3.33 \mu\text{M}$  –  $10.0 \mu\text{M}$  aralığında Rd6G eklendi ve tam olarak sönmün hangi konsantrasyonda olduğu incelendi. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi Rodamin-6G konsantrasyonu arttıkça AuNP yüzeyine tutunmayan Rd6G fazlası çözeltiliye geçmiş ve intensite artışına sebep olmuştur. Bu nedenle optimum Rd6G konsantrasyonu  $3.33 \mu\text{M}$  olarak belirlendi.

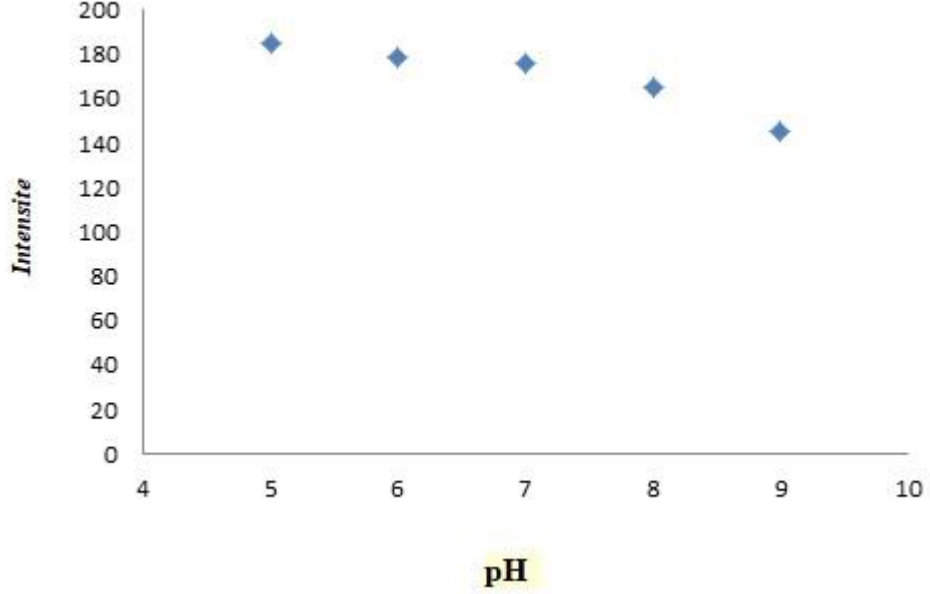


**Şekil 4.1:** Artan konsantrasyonlardaki Rd6G emisyon spektrumları (a)  $3.33 \mu\text{M}$  (sönümün gerçekleştiği konsantrasyon) (b)  $4.00 \mu\text{M}$  (c)  $5.66 \mu\text{M}$  (d)  $6.66 \mu\text{M}$  (e)  $10.0 \mu\text{M}$

##### 4.1.1.2. Rd6G/AuNP Yönteminde Reaksiyon Süresi ve pH'ın Belirlenmesi

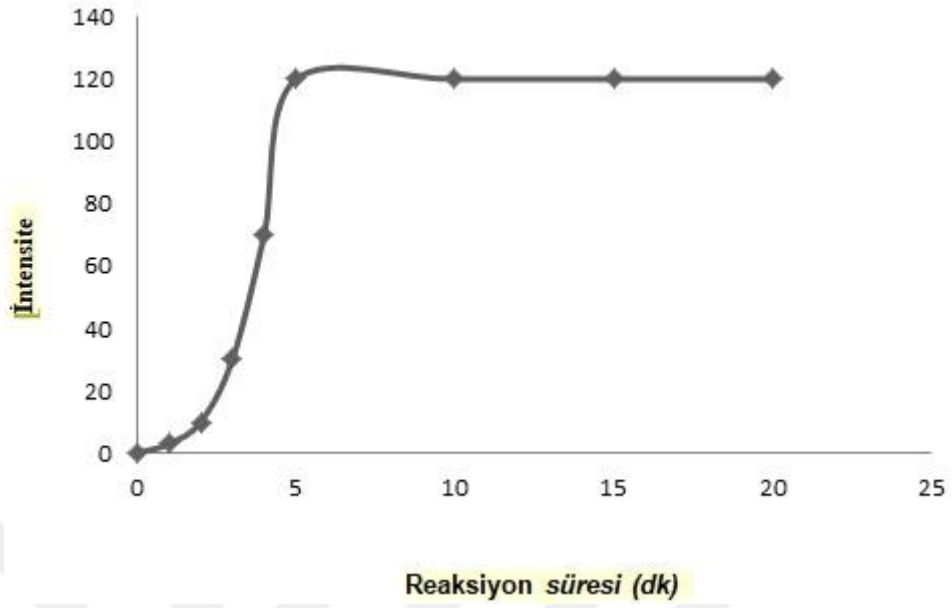
Rd6G/AuNP yöntemine göre sitrat-stabilize AuNP'lar ile tiyol tayini için optimum pH ortamı belirlenmiştir. pH 5-9 aralığı seçilmiştir. pH ortamının sağlanması için pH 5 sitrat tamponu, pH 6 sitrat tamponu, pH 7.4 fosfat tamponu, pH 8 Tris-HCl tamponu, pH 9 borat tamponu

hazırlandı. Bir tüpe 1,5 mL tampon çözeltisi, 0,6 mL Au-NP çözeltisi, 100  $\mu\text{L}$   $10^{-4}$  M sistein çözeltisi ve (3-x) mL su ilave edildi. Şekil 4.2’de pH 5 ve 9 arasında sistein varlığında oluşan Rh-6G intensitesi görülmektedir. Hem fizyolojik pH olduğundan hem de birbirlerine pH 5 ile 7 arasında yakın intensite ölçüldüğünden optimum pH 7.4 olarak belirlendi.



**Şekil 4.2:** Tiyol varlığında oluşan AuNP'lere pH'ın etkisi.

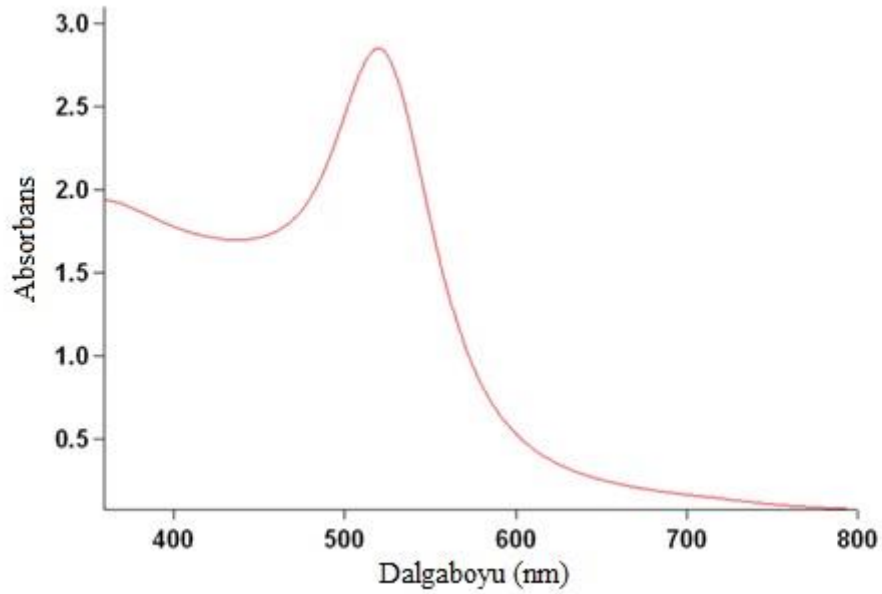
Rd6G/AuNP yönteminde; sentezlenen altın nanoparçacıklar ile tiyol tayininin optimum deney koşulları belirlenmiştir. Bir tüpe 1,5 mL pH 7,4 fosfat tamponu, 0,6 mL Au-NP çözeltisi, x mL tiyol çözeltisi ve (3-x) mL su ilave edilip altın nanoparçacıktaki zamana bağlı değişim 552 nm dalga boyunda intensite ölçümü yapılarak incelendi. 20 dakikalık zaman süresi içinde çalışıldı ve optimum süre 5 dakika olarak belirlendi. (Şekil.4.3.)



Şekil 4.3: Sistein varlığında (c: 3.33 mM) Rd6G/AuNP yönteminin reaksiyon kinetiği.

#### 4.1.2. Sentezlenen Altın Nanoparçacığın Spektrofotometrik Karakterizasyonu

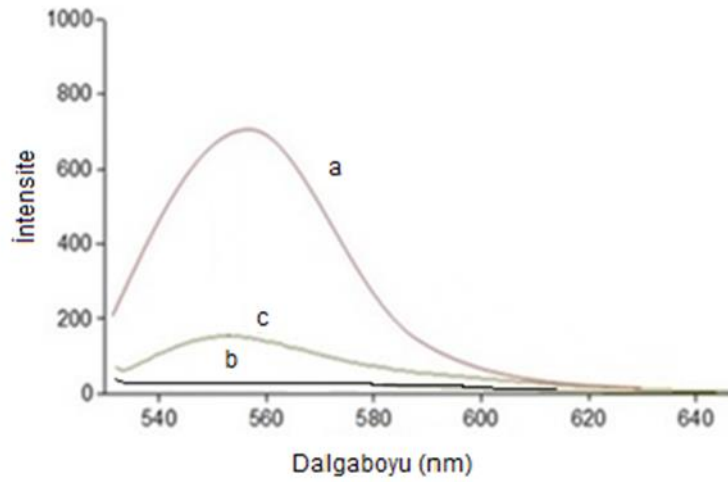
$1.0 \times 10^{-3}$  M tetra aurik asit çözeltisi ve 38.8 mM trisodyum sitrat ile reflüks altında sentezlenen altın nanoparçacığın görünür bölge spektrumu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4:** Sentezlenen altın nanoparçacığın UV-görünür bölge spektrumu ( $\lambda_{max}$  : 525 nm).

#### 4.1.3. Rd6G/AuNP Yöntemi ile Biyotiyollerin Tayini

33.3  $\mu$ M Rd6G çözeltisi (a); 3.33  $\mu$ M sistein yokluğunda (b) ve varlığında (c) oluşan emisyon spektrumları Şekil 4.6’da verilmiştir. Tiyol bileşiklerin AuNP yüzeyine afiniteleri bağlı olarak çözeltideki Rd6G’nin intensitesinde artış görülmektedir (b→c).

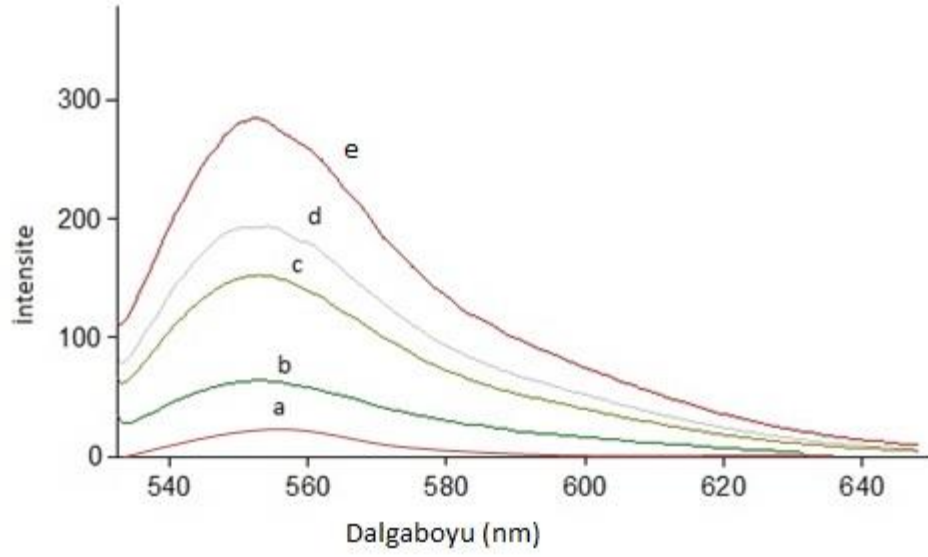


**Şekil 4.5:** (a) 33.3  $\mu$ M Rd6G çözeltisi; sistein yokluğunda (b) ve varlığında (c) elde edilen Rd6G/AuNP yönteminin emisyon spektrumları

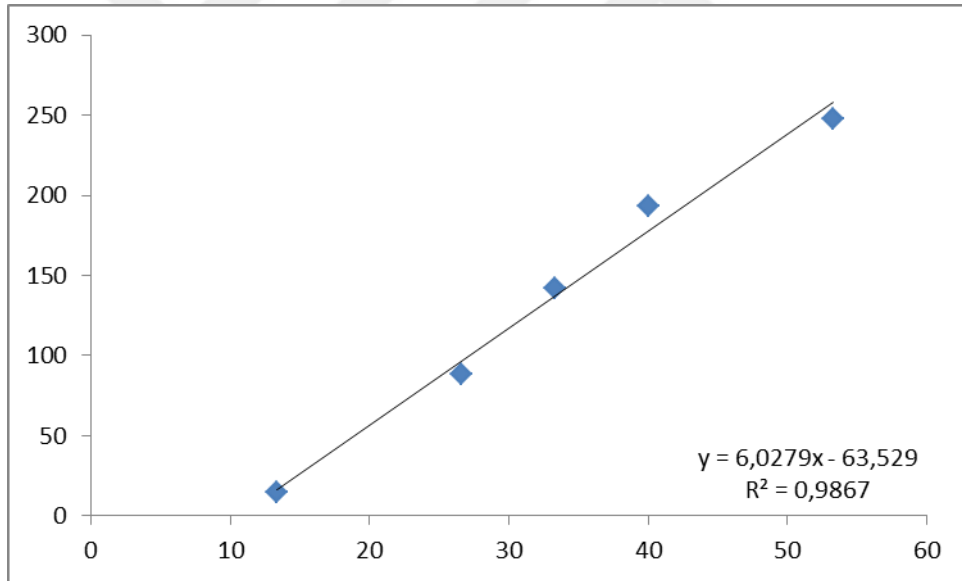
#### 4.1.4. Rh-6G/AuNP Yönteminin Çeşitli Biyotiyollere Uygulanması

##### 4.1.4.1. Sistein

1.33-5.33  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki sistein çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.6) ve kalibrasyon grafiği (Şekil 4.7) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.6:** Sistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 1.33  $\mu\text{M}$ , b: 2.66  $\mu\text{M}$ , c: 3.33  $\mu\text{M}$ , d: 4.00  $\mu\text{M}$ , e: 5.33  $\mu\text{M}$  Cys)

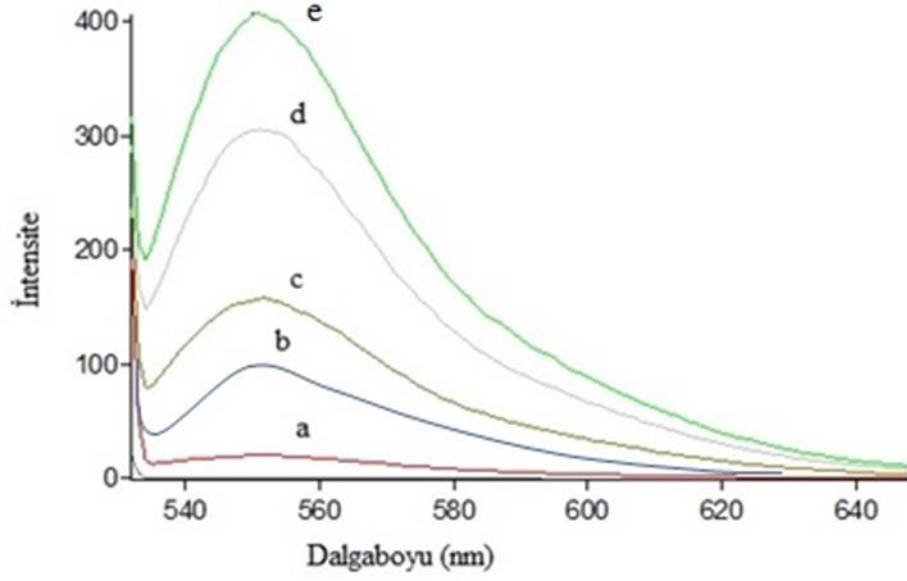


**Şekil 4.7:** Sistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği

#### 4.1.4.2. Sisteamin

0.66-3.33  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasındaki sisteamin çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.8) aşağıda verilmiştir.

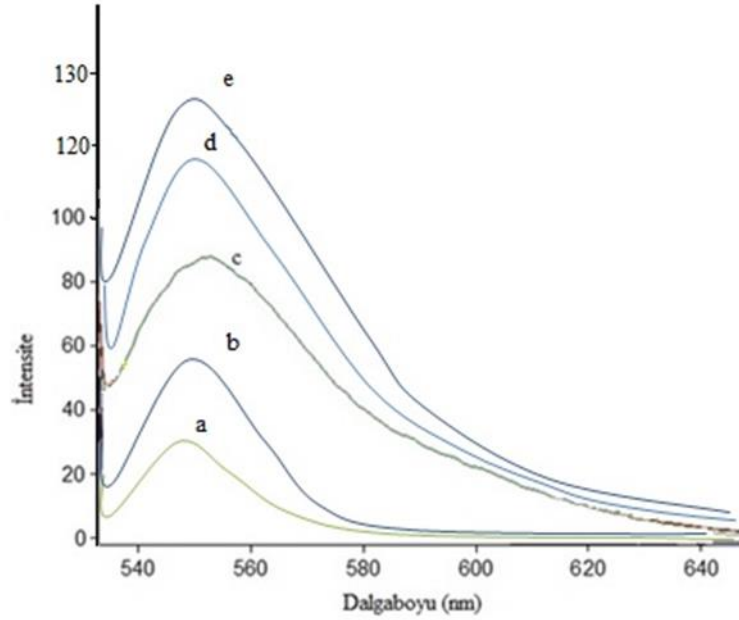




**Şekil 4.8:** Sisteamin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66  $\mu\text{M}$ , b: 1.33  $\mu\text{M}$ , c: 2.00  $\mu\text{M}$ , d: 2.66 e: 3.33  $\mu\text{M}$  CA)

#### 4.1.4.3. *N*-asetilsistein

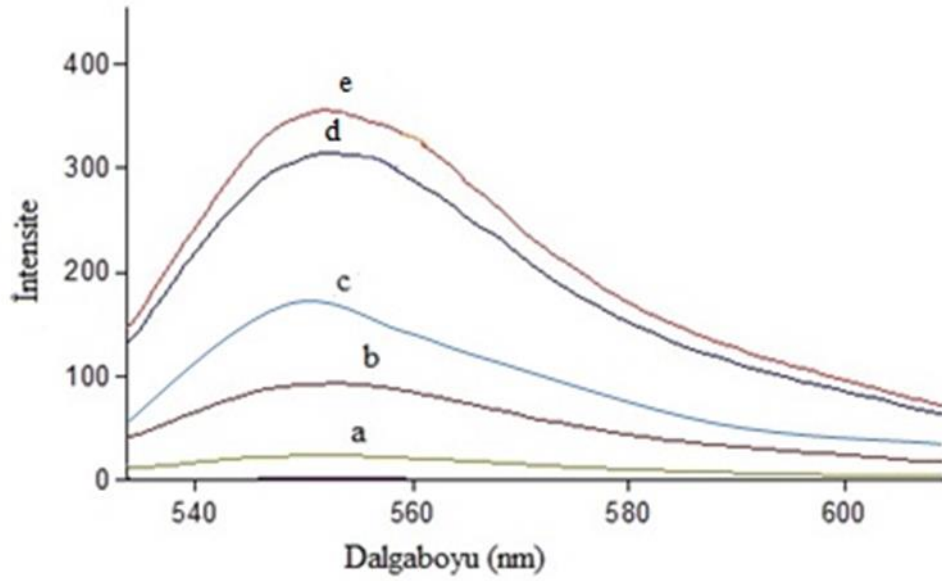
2.66-8.00  $\mu\text{M}$  konsantrasyonları arasındaki *n*-asetilsistein çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.9) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.9:** N-Asetilsistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 2.66  $\mu$ M, b: 4.00  $\mu$ M, c: 5.33  $\mu$ M, d: 6.66  $\mu$ M, e: 8.00  $\mu$ M NAC)

#### 4.1.4.4. Penisilamin

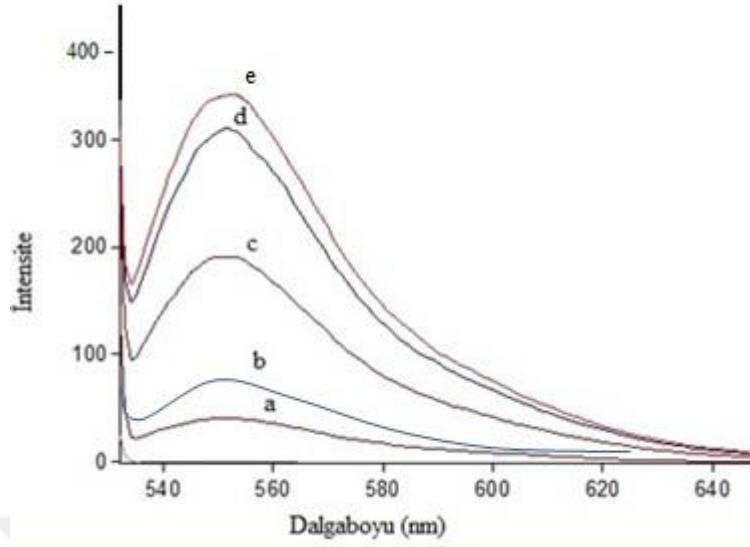
2.66-6.66  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki penisilamin çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.10) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.10:** Penisilamin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 2.66  $\mu$ M, b: 3.33  $\mu$ M, c: 4.00  $\mu$ M, d: 53.3  $\mu$ M, e: 6.66  $\mu$ M PA)

#### 4.1.4.5. 1,4-Ditiyoeritritol

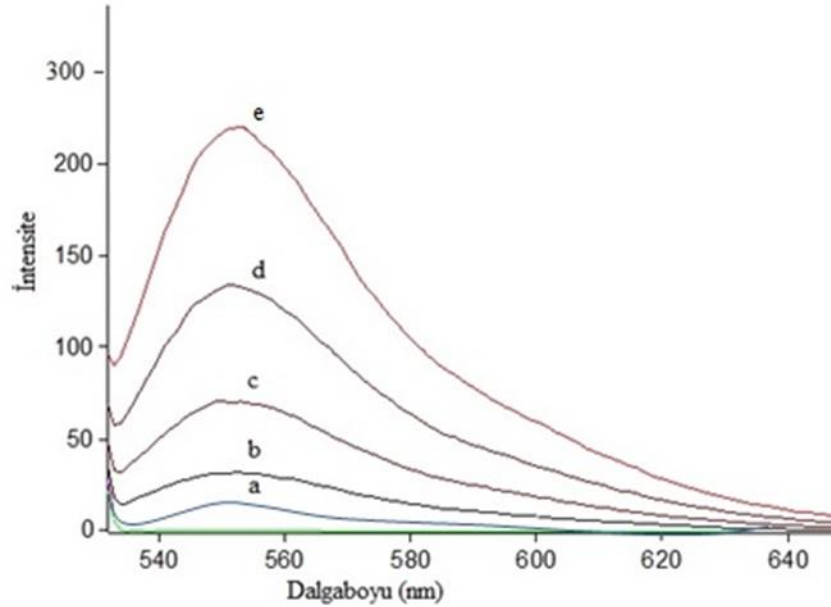
0.66-3.33  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki 1,4-ditiyoeritritol çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.11) aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.11: 1,4-Ditiyoeritritol varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 6.66  $\mu$ M, b: 1.33  $\mu$ M, c: 2.00  $\mu$ M, d: 2.66  $\mu$ M, e: 3.00  $\mu$ M DTE)

#### 4.1.4.6. Lipoik Asit

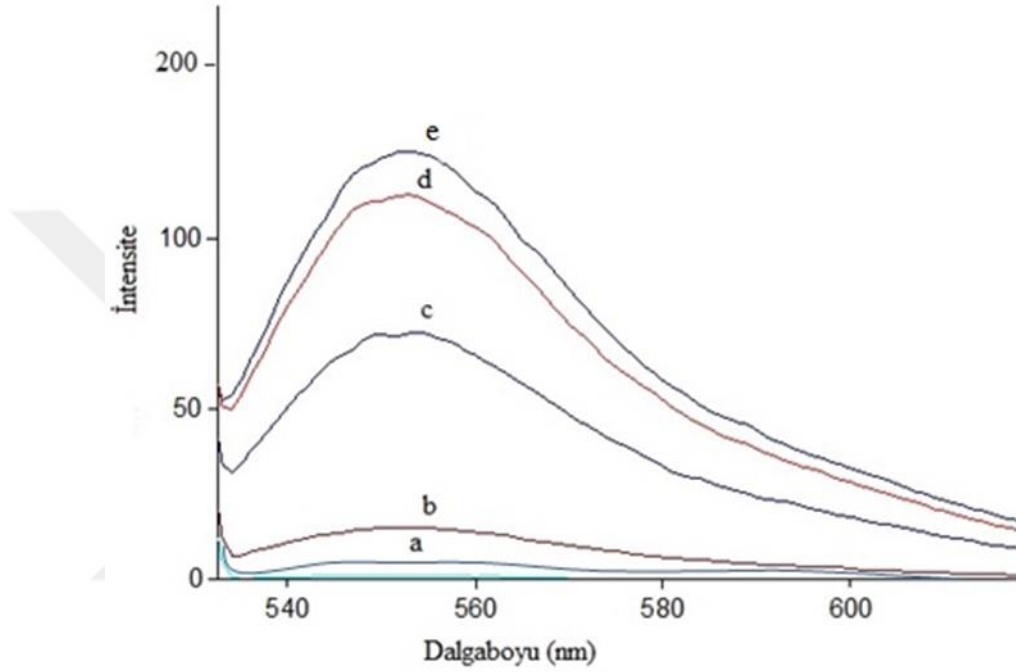
0.66-3.33  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki lipoik asit çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.12) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.12:** Lipoik asit varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66  $\mu$ M, b: 1.33  $\mu$ M, c: 2.00  $\mu$ M, d: 2.66  $\mu$ M, e: 3.33  $\mu$ M LA)

#### 4.1.4.7. Metiyonin

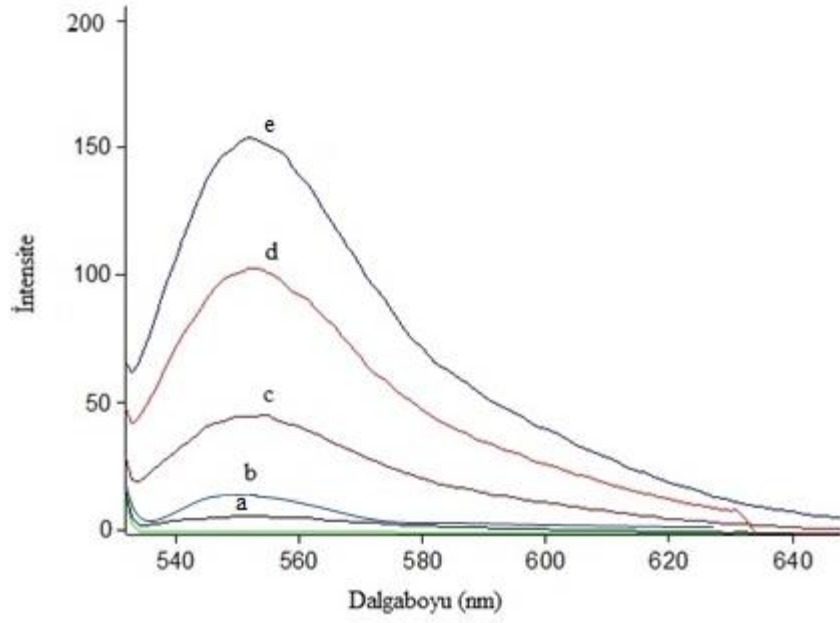
0.33-1.66  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki metiyonin çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.13) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.13:** Metiyonin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.33  $\mu$ M, b: 0.66  $\mu$ M, c: 1.00  $\mu$ M, d: 1.33  $\mu$ M, e: 1.66  $\mu$ M Met)

#### 4.1.4.8. Homosistein

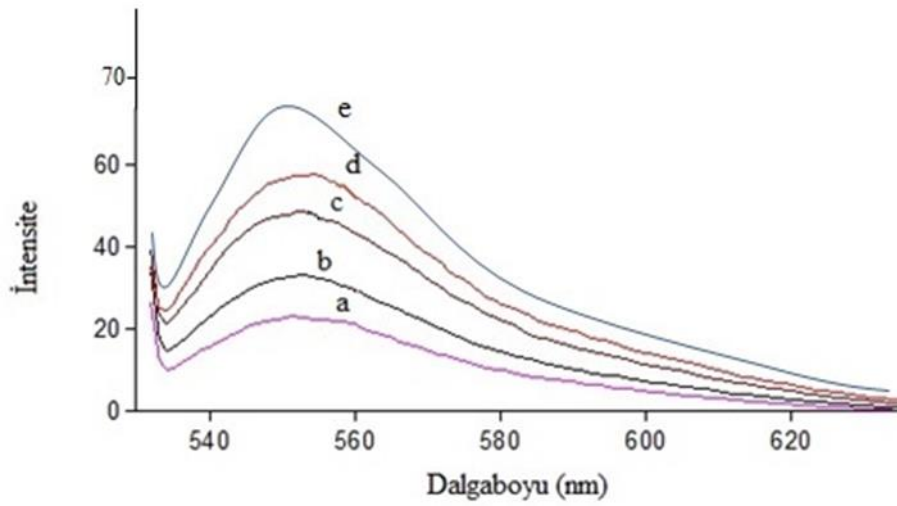
0.66-3.33  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki homosistein çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.14) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.14:** Homosistein varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66  $\mu$ M, b: 1.33  $\mu$ M, c: 2.00  $\mu$ M, d: 2.66  $\mu$ M, e: 3.33  $\mu$ M H-Cys)

#### 4.1.4.9. Glutasyon

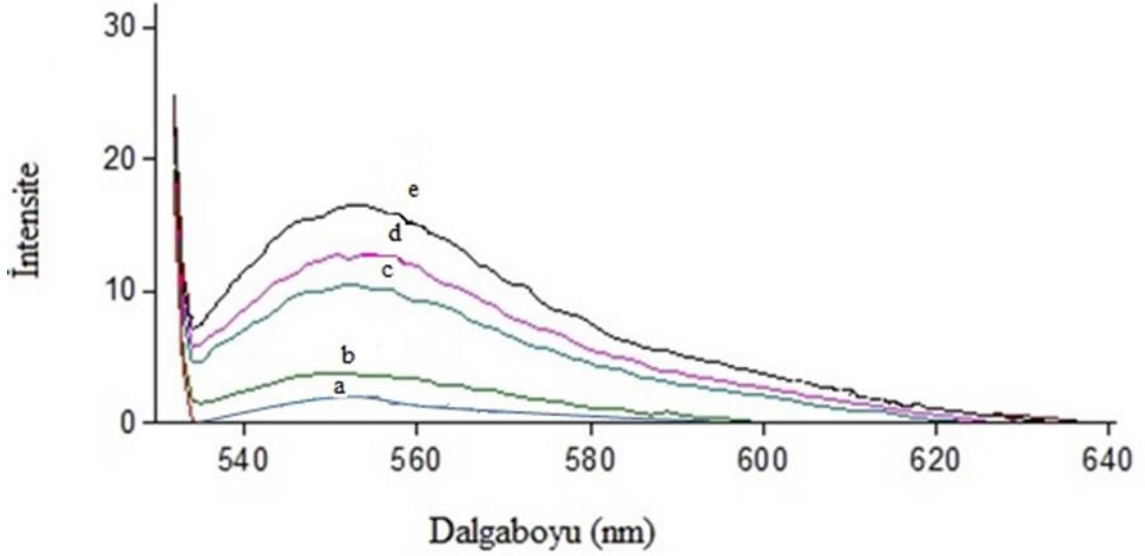
0.66-1.66  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki glutasyon çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.15) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.15:** Glutasyon varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66  $\mu$ M, b: 0.83  $\mu$ M, c: 1.00  $\mu$ M, d: 1.16  $\mu$ M e: 1.66  $\mu$ M GSH)

#### 4.1.4.10. Yükseltgenmiş Glutasyon

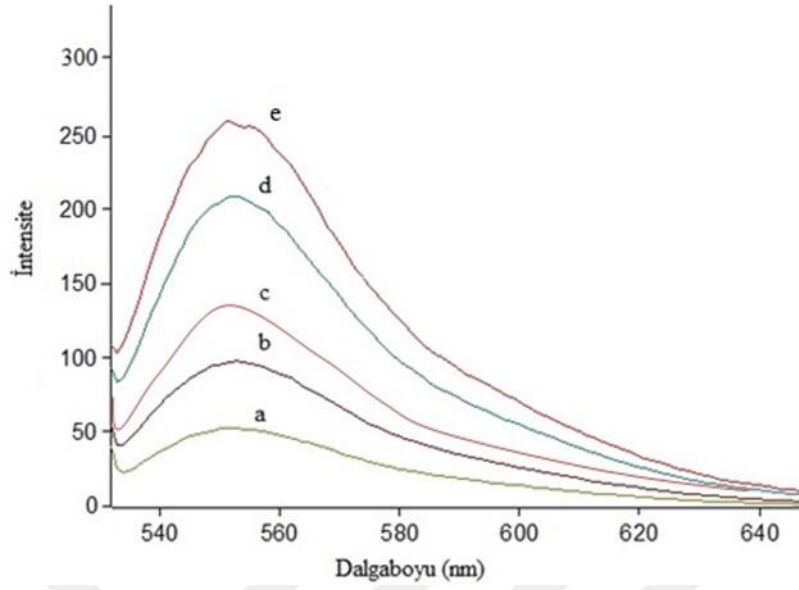
0.66-3.33  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki yükseltgenmiş glutasyon çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.16) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.16:** Yükseltgenmiş glutasyon varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a:0.66  $\mu$ M, b: 1.33  $\mu$ M, c: 2.00  $\mu$ M, d: 2.66  $\mu$ M, e: 3.33  $\mu$ M GSSG)

#### 4.1.4.11. Sistin

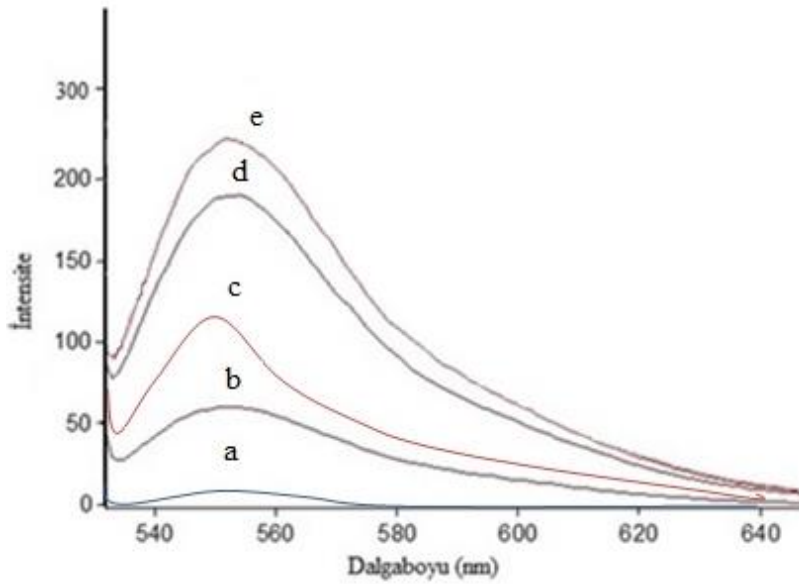
0.33-1.66 $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki sistin çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.17) ve aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.17: Sistin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a:0.33  $\mu$ M, b: 0.66  $\mu$ M, c: 1.00  $\mu$ M, d: 1.33  $\mu$ M, e: 1.66  $\mu$ M Cyst)

#### 4.1.4.12. Homosistin

0.66-2.66  $\mu$ M konsantrasyonları arasındaki homosistin çözeltileri varlığında elde edilen emisyon spektrumu (Şekil 4.18) aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.18:** Homosistin varlığında Rd6G/AuNP yöntemi ile elde edilen emisyon spektrumu (a: 0.66 µM, b: 1.33 µM, c: 1.66 µM, d: 2.00 µM, e: 2.66 µM H-Cyst)

#### 4.1.5. Biotiyollerin Molar Floresans Katsayıları, Doğru Denklemleri ve Lineer Aralıklarının Belirlenmesi

Biyotiyol bileşiklerin molar floresans katsayıları ( $\epsilon$ ) Rd6G/AuNP esaslı yöntemle göre molar konsantrasyon-intensite arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları tespit edildi (Tablo 4.1). Lineer kalibrasyon doğrularındaki sembollerden c: molar konsantrasyon, y: intensite ve r: korelasyon katsayısıdır.

**Tablo 4.1:** Tiyol grubu antioksidan bileşiklerin Tablo Rd6G/AuNP yöntemiyle elde edilen lineer denklemleri, korelasyon katsayıları, molar absorptivite ve lineer aralıkları.

Tiyol Bileşikler	Lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayısı (r)	$\epsilon$ (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	Lineer aralık (µM)
Sistein	$y=6.03 \times 10^7 c - 63$ $r= 0.9938$	$6.03 \times 10^7$	1.33-5.33
Sisteamin	$y = 14.29 \times 10^7 c + 0.025$ $r= 0.9891$	$14.29 \times 10^7$	0.66-3.33
N-Asetilsistein	$y = 15.78 \times 10^7 c + 0.004$ $r= 0.9988$	$15.78 \times 10^7$	2.66-8.00
Penisilamin	$y = 9.62 \times 10^7 c - 227$ $r=0.9959$	$9.62 \times 10^7$	2.66-6.66
1,4-Ditiyoeritritol	$y = 15.97 \times 10^7 c - 133$ $r= 0.9894$	$15.97 \times 10^7$	0.66-3.33
Lipoik Asit	$y = 8.18 \times 10^7 c - 68$ $r= 0.9479$	$8.18 \times 10^7$	0.66-3.33
Metiyonin	$y = 9.62 \times 10^7 c - 31$ $r= 0.9952$	$9.62 \times 10^7$	0.33-1.66
Homosistein	$y = 6.04 \times 10^7 c - 58$ $r= 0.9518$	$6,04 \times 10^7$	0.66-3.33
İndirgenmiş Glutasyon	$y = 7.17 \times 10^7 c - 44$ $r=0.9843$	$7.17 \times 10^7$	0.66-1.66
Yükseltgenmiş Glutasyon	$y = 0.55 \times 10^7 c - 0,02$ $r=0.9994$	$0.55 \times 10^7$	0.66-3.33



Sistin	$y = 18.93 \times 10^7 c - 43$ $r = 0.9985$	$18.934 \times 10^7$	0.33-1.66
Homosistin	$y = 11.78 \times 10^7 c - 88$ $r = 0.9798$	$11.789 \times 10^7$	0.66-2.66

#### 4.1.6. Biyotiyol Bileşiklerin Rd6G/AuNP ve Ellman Yöntemine Göre Elde Edilen Dedeksiyon Limiti (LOD) Değerlerinin Karşılaştırılması

Biyotiyollerin geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemi ve referans yöntem olan kullanılan Ellman yöntemine göre elde edilen LOD değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. LOD değerleri aşağıda verilen Eşitlik 4.1’ e göre hesaplanmıştır.

$$\text{LOD} = 3.3 \text{ s}_b / m \quad (\text{m: eğim, s}_b: \text{kör numunenin standart sapması})$$

4.1

**Tablo 4.2:** Biyotiyol bileşiklerin Rd6G/AuNP ile Ellman yöntemine göre LOD değerleri.

Biyotiyol Bileşikler	LOD	
	Rd6G/AuNP Yöntemi	Orijinal Ellman Yöntemi
Sistein	0.47 $\mu\text{M}$	1.46 $\mu\text{M}$
Sisteamin	0.79 $\mu\text{M}$	2.00 $\mu\text{M}$
N-Asetilsistein	0.11 $\mu\text{M}$	0.68 $\mu\text{M}$
Penisilamin	1.06 $\mu\text{M}$	0.79 $\mu\text{M}$
1,4-Ditiyoeritritol	0.38 $\mu\text{M}$	1.06 $\mu\text{M}$
Lipoik Asit	0.38 $\mu\text{M}$	1.45 $\mu\text{M}$
Homosistein	0.43 $\mu\text{M}$	1.46 $\mu\text{M}$
İndirgenmiş Glutasyon	0.28 $\mu\text{M}$	1.03 $\mu\text{M}$
Yükseltgenmiş Glutasyon	0.23 $\mu\text{M}$	- <sup>a</sup>

Sistin	0.11 $\mu\text{M}$	_a
Homosistin	0.34 $\mu\text{M}$	_a
Metiyonin	0.15 $\mu\text{M}$	_a

a: Orijinal Ellman yöntemi yalnızca -SH içerikli biyotiyollere yanıt vermektedir.

#### 4.1.7. Biyotiyol Bileşiklerin SETİ (Sistein Eşdeğeri Tiyol İçeriği) Katsayılarının Belirlenmesi ve Orjinal Ellman Yöntemiyle Karşılaştırılması

Biyotiyollerin Rd6G/AuNP esaslı yöntem ve referans yöntem olan Orijinal Ellman yöntemine göre SETİ (Sistein Eşdeğeri Tiyol İçeriği) katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.2'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Her iki yöntemde göre referans bileşik olarak kullanılan sisteinin kalibrasyon doğru denklemleri ve molar floresans katsayıları verilmiştir. Bu molar floresans katsayıları kullanılarak tiyol grubu antioksidan bileşiklerin SETİ katsayıları hesaplanmış ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

- Rd6G/AuNP yöntemine göre;

$$A_{552} = 6.03 \times 10^7 C_{\text{Cys}} - 63.529$$

$$r = 0.9938$$

$$\epsilon_{\text{Cys}} = 6.03 \times 10^7 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

- Orijinal Ellman yöntemine göre;

$$A_{410} = 1.17 \times 10^4 C_{\text{Cys}} + 0.04$$

$$r = 0.9996$$

$$\epsilon_{\text{Cys}} = 1.17 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Rd6G/AuNP yöntemine göre glutatyonun SETİ katsayısı, glutatyonun molar floresans katsayısının sisteininkine oranlanması ile hesaplanmaktadır.

$$\epsilon_{\text{Cys}}: 6.02 \times 10^7 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{GSH}}: 7.17 \times 10^7 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\text{SETI}_{\text{GSH}} = \epsilon_{\text{GSH}} / \epsilon_{\text{Cys}} = 1.19$$

**Tablo 4.3:** Biyotiyollerin Rd6G/AuNP ve Orijinal Ellman yöntemlerine göre SETİ katsayıları.

Biyotiyol Bileşikler	SETİ <sub>Rd6G-(AuNP)</sub>	SETİ <sub>Ellman</sub>
Sistein	1.00	1.00
Sisteamin	0.94	0.92
N-Asetilsistein	1.06	1.09
Penisilamin	1.60	1.16
1,4-Ditiyoeritritol	2.65	2.04
Lipoik Asit	1.38	1.44
Homosistein	1.00	1.10
İndirgenmiş Glutasyon	1.19	1.26
Yükseltgenmiş Glutasyon	0.09	_ <sup>a</sup>
Sistin	3.14	_ <sup>a</sup>
Homosistin	1.96	_ <sup>a</sup>
Metiyonin	1.60	_ <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Orijinal Ellman yöntemi yalnızca -SH içerikli biyotiyollere yanıt vermektedir

#### 4.1.8. Biyotiyol Üçlü Sentetik Karışım Çözeltilerinin Rd6G/AuNP Yöntemine Göre Toplam Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi

0.1 mM konsantrasyonunda tiyol grubu antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda üçlü karışımlar hazırlanarak geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve ölçülen toplam tiyol içerikleri (TTİ) 3.7 ve 3.8 denklemlerine göre hesaplandı ve sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldı (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4:** Sentetik tiyollerin karışım çözeltilerinin Rd6G/AuNP yöntemine göre mM sistein (Cys) cinsinden beklenen ve deneysel olarak ölçülen TTİ değerlerinin karşılaştırılması.

Karışımın İçeriği	TTİ Bileşen (mM sistein-Eşdeğeri)	TTİ <sub>teorik</sub> (mM sistein-Eşdeğeri)	TTİ <sub>DENEYSEL</sub> (mM sistein-Eşdeğeri)
0,1 mL $5 \times 10^{-5}$ M Metiyonin 0,16 mL $10^{-4}$ M N-asetilsistein 0,06 mL $10^{-4}$ M 1,4-Ditiyoeritritol	$5.32 \times 10^{-3}$ mM $5.04 \times 10^{-3}$ mM $5.00 \times 10^{-3}$ mM	$5.12 \times 10^{-3}$ M	$(6.19 \pm 0.12) \times 10^{-3}$
0,06 mL $5 \times 10^{-5}$ M Sistin 0,1 mL $5 \times 10^{-5}$ M Metiyonin 0,12 mL $5 \times 10^{-5}$ M Sisteamin	$4.73 \times 10^{-3}$ mM $4.62 \times 10^{-3}$ mM $5.07 \times 10^{-3}$ mM	$4.80 \times 10^{-3}$ mM	$(4.19 \pm 0.17) \times 10^{-3}$
0.1 mL $10^{-4}$ M Penisilamin 0.1 mL $5 \times 10^{-5}$ M Metiyonin 0.1 mL $10^{-4}$ M Lipoik Asit	$5.37 \times 10^{-3}$ mM $5.56 \times 10^{-3}$ mM $5.42 \times 10^{-3}$ mM	$5.45 \times 10^{-3}$ mM	$(6.17 \pm 0.18) \times 10^{-3}$
0,06 mL $5 \times 10^{-5}$ M Sistin 0,1 mL $5 \times 10^{-5}$ M Metiyonin 0,16 mL $10^{-4}$ M N-asetilsistein	$4.64 \times 10^{-3}$ mM $4.82 \times 10^{-3}$ mM $5.08 \times 10^{-3}$ mM	$4.85 \times 10^{-3}$ mM	$(5.25 \pm 0.15) \times 10^{-3}$

#### 4.1.9. Yöntemin Kesinliğinin ve Doğruluğunun Belirlenmesi

Geliştirilen Rd6G/AuNP yönteminin kesinlik ve doğruluğunun tespiti amacıyla için doku homojenatlarına sistein (Cys) standart çözeltilerinin katkısı yapıldı (Tablo 4.5). Bir tüpe 20  $\mu$ L böbrek homojenatı veya sentetik serum ve  $10^{-4}$  M Cys çözeltisinin 60  $\mu$ L'si ilave edildi. Cys katkısı yapılan çözeltilere Rd6G/AuNP yöntemi uygulandı.

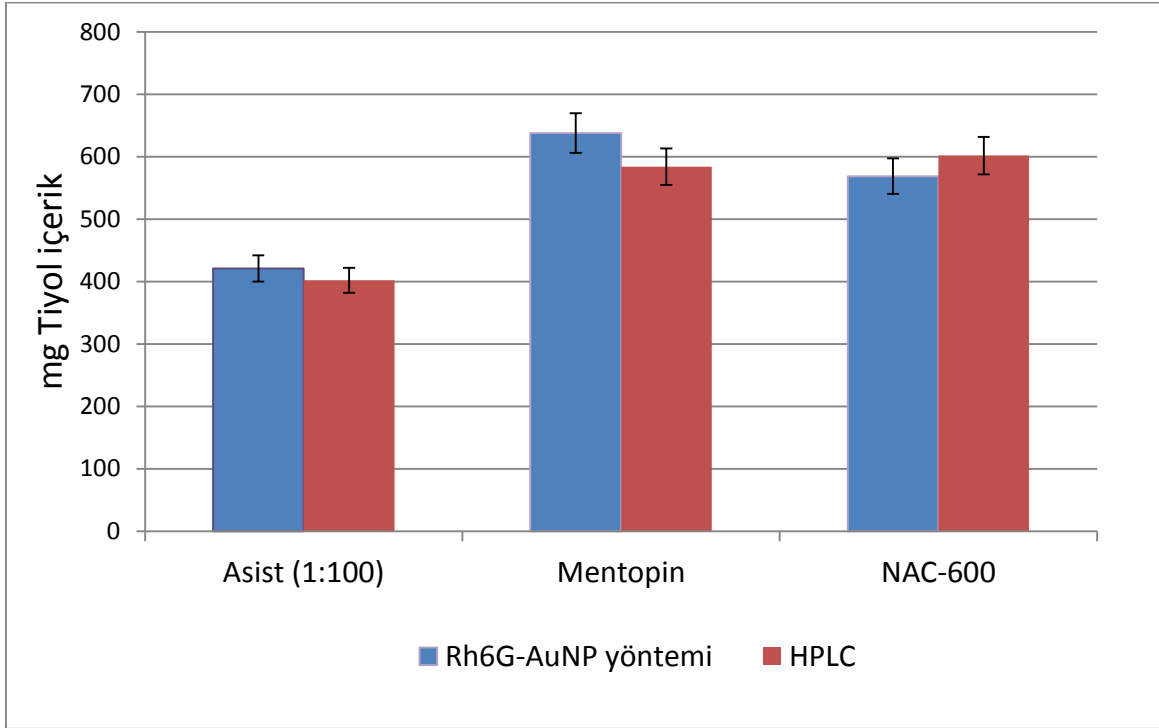
**Tablo 4.5:** Geliştirilen Rd6G/AuNP yönteminin kesinliği ve doğruluğu.

Doku örneklerine tiyol katkısı	Eklenen kons. ( $\mu$ M)	Ortalama ( $\mu$ M)	R.S.D. <sup>a</sup> (%)	REC <sup>b</sup> (%)
1:20 seyreltilmiş böbrek dokusuna CYS katkısı	2.00	$2.13 \pm 0.27$	7.24	106.5
1:20 seyreltilmiş sentetik serumu CYS katkısı	2.00	$2.23 \pm 0.20$	8.58	111.5

<sup>a</sup>Relatif standart sapma (N=6); <sup>b</sup>Geri kazanım (N=3).

#### 4.1.10. Rd6G/AuNP Yönteminin Farmasötik İlaçlara Uygulanması

Geliştirilen yöntem Asist, Mentopin, NAC-600 efervesan tabletlere başarılı bir şekilde uygulandı. Geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemi ve HPLC yöntemi için bu farmasötik ilaçların tiyol içerikleri Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.19: Rd6G/AuNP ve HPLC yöntemlerine göre bazı farmasötik ilaç örneklerinin tiyol içeriği (N=4) P=0.05 için  $t_{deneyisel} = 0.28$ ,  $t_{tablo} = 3.18$ ,  $t_{deneyisel} < t_{tablo}$ )

#### 4.1.11. İnterferans Çalışmaları

Biyolojik ve farmasötik örneklerde yaygın olarak bulunan bileşiklerin enterfere edici etkileri geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemine göre test edilmiştir. Bunun için bu bileşiklerin  $10^{-4}$  M sistein (sulu çözeltisi) ortamındaki etkileri incelenmiştir. % Rölatif hata değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

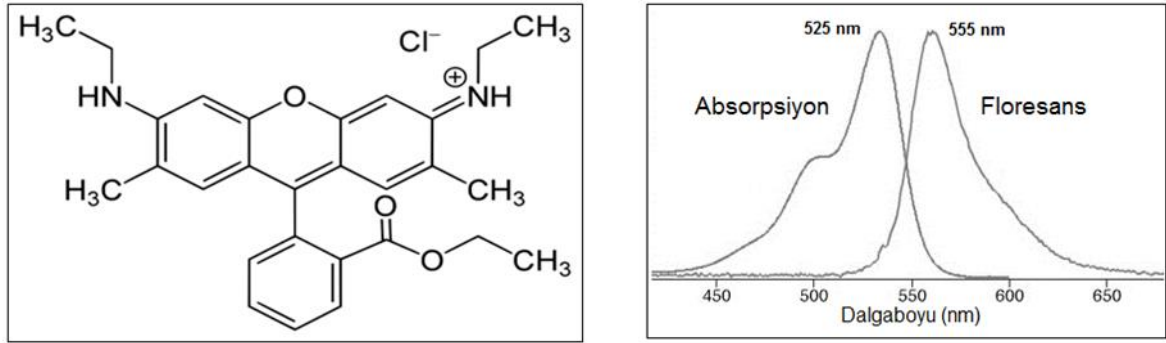
Tablo 4.6: Girişim yapabilecek olası bileşiklerin Rd6G/AuNP yöntemine etkisi.

İnterferans bileşik	Karışım bileşimi	Eklene CYS derişimi (mM)	Bulunan CYS derişimi (mM)	Relatif hata, (%)
Kateşin (CT)	100µL 0.1 mM CYS	$33.3 \times 10^{-7}$	$36.4 \times 10^{-7}$	9.3
	100µL 0.1 mM CT			
Gallik asit (GA)	100µL 0.1 mM CYS	$33.3 \times 10^{-7}$	$35.1 \times 10^{-7}$	5.4
	20µL 2 mM GA			
Kuersetin (QR)	100µL 0.1 mM CYS	$33.3 \times 10^{-7}$	$36.6 \times 10^{-7}$	9.9

	100µL 0.1 mM QR			
Etanol (EtOH)	100µL 0.1 mM CYS 100µL EtOH	$33.3 \times 10^{-7}$	$33.3 \times 10^{-7}$	0
Hidroksil amin (HA)	100µL 0.1 mM CYS 20µL 2 mM HA	$33.3 \times 10^{-7}$	$33.3 \times 10^{-7}$	0
Bilirubin (BIL)	100µL 0.1 mM CYS 100µL 0.1 mM BIL	$33.3 \times 10^{-7}$	$32.0 \times 10^{-7}$	-3.9
Ürik asit (UA)	100µL 0.1 mM CYS 100µL 0.1 mM UA	$33.3 \times 10^{-7}$	$36.1 \times 10^{-7}$	8.4
Askorbik asit (AA)	100µL 0.1 mM CYS 20µL 2 mM AA	$33.3 \times 10^{-7}$	$33.3 \times 10^{-7}$	0
Kafeik asit (CFA)	100µL 0.1 mM CYS 20µL 2 mM CFA	$33.3 \times 10^{-7}$	$32.3 \times 10^{-7}$	-3.0

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, biyotiyollerin (sistein, sisteamin, N-asetil sistein, homosistein, indirgenmiş glutatyon, yükseltgenmiş glutatyon, homosistin, 1,4-ditiyoeritritol, sistin, lipoik asit, penisilamin, metiyonin) sentetik karışımlarının, biyolojik ve farmasötik örneklerdeki sistein eşdeğeri tiyol içeriklerinin belirlenmesi için yeni bir Rd6G/AuNP esaslı florometrik sensör geliştirilmiştir. Rodamin-6G, yüksek oranda fluoresan bir rodamin ailesi boyar maddesidir ve çözeltisi, 525 nm’de eksitasyon dalgaboyuna, 555 nm’de ise floresans emisyon bandına sahiptir (Chen ve diğ. 2007) (Şekil 5.1).

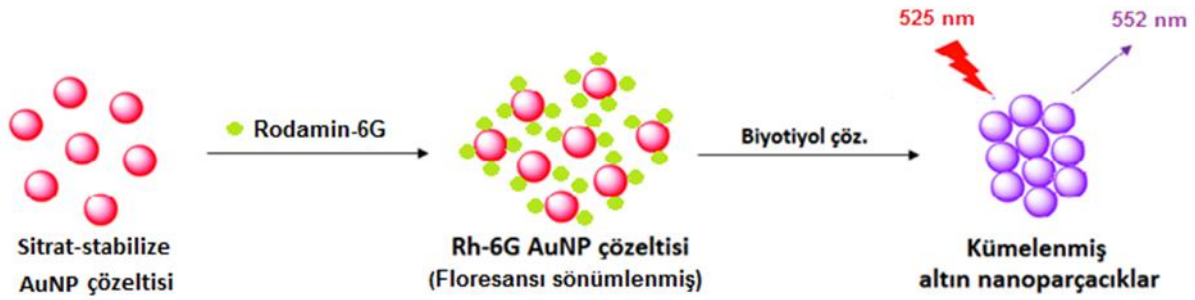


**Şekil 5.1:** Rodamin-6G’nin moleküler yapısı ve eksitasyon/emisyon bandları.

Au-NP’ler Turkevich ve Frens yöntemine göre, indirgeyici/stabilize edici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat varlığında altın (III) bileşiklerinin altın atomlarına indirgenmesiyle sentezlenmiştir (Turkevich ve diğ. (1951); Frens, 1973). Bu yöntem parçacık yüzeylerindeki sitrat ligandlarının gevşek kabuğundan ötürü istenen ligandlarla kolayca yer değiştirebilmesinden dolayı sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Ma ve diğ. (2010)). Altın nanoparçacıklar, boyut-bağımlı optik özellikleri olması ve tiyoller ve tiyol modifiye edilmiş moleküllere yüksek ilgi göstermesi nedeniyle duyarlı algılama materyalleri olarak ilgi çekmektedir (Tseng ve diğ. (2005)). Tiyol tayininde kullanılan optik problemlerin büyük bir kısmı, tiyollerin kuvvetli nükleofilik özelliği ve metal iyonlarına bağlanma eğilimi gibi iki temel özellikten yararlanmaktadır.

Bu çalışmada, sitrat-stabilize altın nanoparçacıkların yüzeyine suda çözünen florofor Rd6G boyar maddesinin kovalent olmayan etkileşimle adsorbe olması sonucu floresansında bir

sönüm gerçekleşmekte ve ardından bu nanoparçacıkların tiyollerle işleme sokulması sonucu, biyotiyollerin kuvvetli nükleofilik özelliği ve altın nanoparçacıklara bağlanma eğilimi sebebiyle oluşan agregasyon (kümelenme) ile birlikte açığa çıkan Rd6G molekülleri tekrar floresans göstermektedir (Şekil 5.2).



**Şekil 5.2:** Geliştirilen florometrik Rd6G/AuNP yönteminin şematik gösterimi.

Bir fotolüminesans söndürücü olarak AuNP'lar, kromofor-AuNP kompozitlerin moleküler uyarma enerjisini oldukça verimli şekilde söndürebilmektedir. AuNP'ların bu üstün sönmüleme özelliği floresan rezonans enerji transferi (FRET) prosesine dayanan analizlerde kullanılmaktadır. FRET, bir çarpışma gerektirmeyen, ışısız, kuantum mekaniksel bir işlemdir. Enerji aktarımı gerçekleştiğinde, alıcı molekül verici molekülün floresansını söndürür ve alıcının kendisi bir fluorokrom ise, arttırılmış veya hassaslaştırılmış fluoresans emisyonu gözlemlenir. Donör floroforun maksimum absorpsiyonuna karşılık gelen dalga boyunda hem donör hem de alıcı molekülleri içeren bir numunenin uyarılması ve alıcının maksimum emisyonuna yakın merkezli dalga boylarında yayılan ışığın tespit edilmesi ile gözlemlenebilir. Hızla gelişen alternatif bir algılama yöntemi, verici floroforun floresans ömrünü alıcının varlığında ve yokluğunda ölçmektir (Sekar ve Periasamy, 2003).

Önerilen yöntemin optimum deney koşulları (florofor derişimi, süre, ortam pH'sı) belirlenmiştir. Rd6G çözeltisinin floresansının sitrat-stabilize AuNP'lar tarafından tamamen sönmülendiği optimum Rd6G konsantrasyonu 3.33  $\mu$ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.). Rd6G konsantrasyonunun sitrat-stabilize altın nanoparçacıkların kararlılığına herhangi bir etkisi olmadığı, AuNP çözeltisinin görünür alanda 525 nm dalgaboyunda maksimum absorpsiyon veren yüzey plasmon rezonans bandında bir değişiklik gözlenmemesi ile kanıtlanmıştır. Ortam pH'sı önerilen yöntemin hassasiyetini belirlemede önemli rol oynamaktadır. Çünkü pH, Rd6G adsorpsiyonu/desorpsiyonu, tiyol bileşiklerin yer değiştirme



kabiliyetlerini etkilemektedir. Farklı pH ortamlarında (pH 5 ile 9) tampon çözeltiler kullanılarak sistein varlığında Rd6G intensitesindeki değişim izlendi. Hem fizyolojik pH'a yakın olması hem de pH 5 ile 7 arasında birbirine yakın floresans intensitesi değerleri ölçüldüğü için optimum pH 7.4 olarak seçildi (Şekil 4.2.). Sistein varlığında (3.33  $\mu$ M) Rd6G moleküllerinin AuNP yüzeyinden desorpsiyonu için zamana bağlı değişim 20 dakika boyunca izlendi ve optimum reaksiyon süresi 5 dakika olarak belirlendi (Şekil 4.3.).

Turkevich (Turkevich ve diğ. (1951)) ve Frens yöntemine (Frens, 1973) göre hazırlanan altın nanoparçacık sentezinde, sarı renkli  $1.0 \times 10^{-3}$  M tetraaurik asit çözeltisinin 38.8 mM trisodyum sitrat ile refluks altında indirgenmesi ile sentezlenen koyu pembe renkli altın nanoparçacık çözeltisinin görünür bölge absorpsiyon spektrumu 525 nm'de ölçülmüştür (Şekil 4.4.) ve uygulanan yöntem ile ortalama 14 nm çapında altın nanoparçacıklar elde edildiği Chen ve diğ. (2007) tarafından bildirilmiştir. Rd6G molekülleri kovalent olmayan kuvvetlerle AuNP yüzeyine adsorplandığında, Rd6G ile AuNP arasında FRET meydana gelir. Bunun sonucu olarak floresans sönümü gerçekleşir. Bu durum benzer şekilde nil kırmızı boyarmaddesi ile sitrat-stabilize AuNP'lar arasında da gerçekleşmektedir (Chen ve Chang, 2004). Şekil 4.5.'de spektrum (a) Rd6G emisyon spektrumunu, spektrum (b) Rd6G'nin 555 nm floresans intensitesinin ortalama 14 nm boyutlu AuNP çözeltisi ile ciddi oranda azaldığı ve sönümlendiğini göstermektedir. Spektrum (c)'de 3.33  $\mu$ M sistein varlığında floresans intensitesinde ciddi bir artış ve maviye kayma (555 nm'den 552 nm'ye) görülmüştür. 3.33  $\mu$ M sisteinin Rd6G'nin eksitasyon ve emisyon dalga boyunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Bu durum, AuNP yüzeyinde yeni bir ürünün adsorbe olduğunu kanıtlamaktadır. Rd6G/AuNP yönteminin çeşitli biyotiyol bileşiklere uygulanabilirliği test edilmiştir. Biyotiyol derişimi ile doğru orantılı olarak AuNP yüzeyinden salınan Rd6G moleküllerinin gösterdiği emisyon şiddetindeki artış ( $\lambda_{eks}=525$  nm,  $\lambda_{em}=552$  nm) incelenerek biyotiyoller varlığında emisyon spektrumları çizilmiş ve konsantrasyon-intensite değerleri kullanılarak kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.6 – Şekil 4.19). Kalibrasyon doğrularının lineerliği oldukça yüksek bulunmuştur ( $r=0.9479-0.9994$ ) (Tablo.4.1). Önerilen sensör ile biyotiyoller  $10^7$  L M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> mertebesinde molar floresans katsayılarına sahip iken, Ellman yönteminin molar absortivite katsayısı  $10^4$  L M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> mertebesinde dir. Buna göre, florometrik Rd6G/AuNP yönteminin spektrofotometrik Ellman yönteminden daha duyarlı olduğu sonucuna varılmaktadır. Florometrik yöntemler, yüksek hassasiyete sahip, düşük dedeksiyon limitlerine ulaşabilen, az miktarda numuneye ihtiyaç duyulan yöntemlerdir. Bu

avantajları sebebiyle oldukça fazla tercih edilmektedir (Harris ve Bashford, 1987). Biotiyollerin LOD değerleri  $LOD=3.3$  sb/m eşitliğine göre hesaplanarak Rd6G/AuNP yöntemine göre  $0.11 \mu\text{M}$  ile  $1.06 \mu\text{M}$  aralığında, Ellman yöntemine göre  $0.68 \mu\text{M}$  ile  $2.00 \mu\text{M}$  aralığında belirlenmiştir (Tablo 4.2.). Önerilen yöntemde, sistein  $0.47 \mu\text{M}$  LOD değerine sahipken Ellman yönteminde bu değer  $1.46 \mu\text{M}$  bulunmuştur. Bu sonuca göre florometrik Rd6G/AuNP yönteminin daha hassas olduğu görülmektedir. Orijinal Ellman yöntemi yalnızca -SH içerikli biyotiyollere yanıt verdiği için sistin, yükseltgenmiş glutatyon, homosistin ve metiyonin tayin edilememiştir. Çünkü, yükseltgenmiş glutatyon, homosistin ve sistin yapılarında S-S bağları içerirken, metiyonin yapısında Me-S- bağları içermektedir. Oysa ki Rd6G/AuNP sensörü bu bileşikler yüksek hassasiyetle dedekte edebilmektedir.

Biyotiyol bileşiklerin molar floresans katsayılarının sisteine ait ( $\epsilon_{\text{Cys}} = 6,03 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) katsayıya oranlanması ile tüm biyotiyollerin sistein eşdeğeri tiyol içeriği (SETİ) değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.3.). Bulgular, Ellman yöntemi ile elde edilen SETİ değerleri ile karşılaştırılmıştır. Yapısında 1 adet -SH grubu içeren tiyol bileşikler sisteamin, N-asetil sistein, homosistein ve indirgenmiş glutatyonun SETİ değerleri sırasıyla 0.94, 1.06, 1.00 ve 1.19 bulunmuştur. SETİ değerlerinin 1'e yakın çıkması bu bileşiklerin sistein (1 adet -SH grubu içerir) ile benzer yapısal özellikler gösterdiklerini ispatlar niteliktedir. Penisilamin, bir karbon atomunda bir karbonil ve bir amino grubu, diğer karbon atomunda ise bir sülfidril ile iki metil grubu içerir. Penisilamini sisteinden ayıran özellik sisteinin ikinci karbon atomuna iki hidrojen bağlı olmasıdır. Penisilaminin SETİ değeri 1.60 bulunmuştur. Homosistin, 1,4-ditiyoeritritol, sistin ve lipoik asit disülfür grubuna sahip bileşikler olup sistein eşdeğeri tiyol içerikleri sırasıyla 1.96, 2.65, 3.14, 1.38 bulunmuştur. Disülfür (RSSR) bileşikleri büyük olasılıkla S-S disülfür bağının kırılmasıyla Au-NP yüzeyine (Au-S-R şeklinde) bağlandıklarından 1 molekül RSSR 2 molekül RSH adsorpsiyonuna eşdeğer boya koparmaktadır ve bu nedenle disülfürlerin molar floresans katsayıları, basit tiyollerinkinin yaklaşık 2 katı çıkmaktadır (Ionita ve diğ. (2008)). Lipoik asitin yapısındaki disülfür bağının aromatik halkada yer alması büyük olasılıkla, SETİ değerinin beklenen değer altında gözlenmesinin sebebidir. Benzer şekilde orjinal Ellman yöntemine göre de  $SETI_{LA}$  1.44 bulunmuştur. Yükseltgenmiş glutatyon ise 0.09 SETİ değeri göstermektedir. Düşük değerlerin sebebinin yapısındaki sterik etki ve tiyol gruplarına erişilebilirliğin kısıtlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Geliştirilen sensör disülfürlere cevap verebilirken, literatürde nil kırmızısı-AuNP esaslı florometrik yöntemde disülfürlerin floresansta artışa sebep

olmadıkları belirtilmiştir (Chen ve Chang, 2004). Hem –SH hem S-S grupları içeren tiyol bileşiklerin tayin edilebilmesi bu yöntemin önemli bir avantajıdır.

Çalışılan biyotiyollerden birkaçı kullanılarak farklı kombinasyonlarda üçlü sentetik karışımlar hazırlanmıştır. Karışımlara Rd6G/AuNP yöntemi uygulanmış, teorik ve ölçülen toplam tiyol içerikleri (TTİ) Eşitlik 3.1 ve 3.2’de yer alan denklemlerden yararlanılarak mM sistein eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 4.4). Teorik ve deneysel ölçülen içeriklerin birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiş ve kimyasal bir sapmaya sebep olacak bir etkileşime girmedikleri gözlenmiştir. Yöntemin kesinliği ve doğruluğunun tespiti için %RSD ve geri kazanım değerleri (%REC) hesaplanmıştır. Bu bağlamda, belirli oranlarda seyreltilmiş böbrek dokusu ve sentetik serum örneğine bilinen derişimde standart CYS çözeltisi (2 µM) katkısı yapılmıştır. Yöntemin yüzde bağıl standart sapma değeri (% RSD) (N=6) sırasıyla 7.24 ve 8.58 bulunmuştur. Yüzde geri kazanım (% REC) ise sırasıyla % 106.5 ve % 111.5 olarak belirlenmiştir. Yöntemin seçiciliğini belirlemek için interferans çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, kateşin, gallik asit, kuersetin, kafeik asit gibi polifenolik bileşikler, etanol, hidroksil amin gibi küçük organik bileşikler ve bilirubin, ürik asit ve askorbik asit gibi vücutta bulunan antioksidan bileşiklerin Rd6G/AuNP yöntemine etkisi incelenmiştir. Girişim yapabilecek bileşiklerden gallik asit, hidroksilamin, askorbik asit ve kafeik asitin konsantrasyonu sistein konsantrasyonunun 4 katı olarak belirlenmiştir. Diğerleri için oran 1:1 alınmıştır. % Bağıl hata polifenolik bileşikler için %3 (-) ila % 9.9 (+) arasında değişmektedir. Etanol, askorbik asit ve hidroksilaminin % bağıl hata değeri 0 bulunmuştur. Ürik asit için %8.4 (+), bilirubin için %3.9 (-) bulunmuştur. Son olarak yöntem bazı farmasötik ilaç numunelerine uygulanmıştır ve içerdikleri tiyol miktarları HPLC bulguları ile karşılaştırılmıştır. Asist şurup, Mentopin ve NAC-600 efervesan tabletlerin tiyol içerikleri mg cinsinden belirlenmiştir. t-testi ile her iki yöntem bulguları karşılaştırılmış ve geliştirilen Rd6G/AuNP yöntemi ile HPLC yöntemi bulgularının %95 güvenilirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği görülmüştür ( $P=0.05$  için  $t_{deneyse} = 0.28$ ,  $t_{tablo} = 3.18$ ,  $t_{deneyse} < t_{tablo}$ ). Bununla birlikte F-testi uygulanarak her iki yöntemin kesinlikleri kıyaslanmış ve iki yöntem arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır ( $P=0.05$  için  $F_{deneyse} = 1.02$ ,  $F_{kritik(tablo)} = 10.13$ ,  $F_{deneyse} < F_{(tablo)}$ ).

## KAYNAKLAR

- [Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., 1989, The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid, *Free Radical Biology & Medicine*, 6, 593–597.
- Atmaca, G., 2004, Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids, *Yonsei Medical Journal*, 45 (5), 776-788.
- Bast, A., Haenen, G.R., 1988, Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 963, 558-561.
- Chen G., Zhang L., Wang J., 2004, Miniaturized Capillary Electrophoresis System with a Carbon Nanotube Microelectrode for Liquid Separation and Detection of Thiols, *Talanta* 64 1018–1023.
- Chen SJ., Chang HT., 2004, Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticles for Selective Determination of Thiols Based on Energy Transfer and Aggregation, *Anal. Chem.*, 76, 3727-3734
- Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Cornacchiari, A., Ferrari, R., Albertini, A., 1987, Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress, *Clinical Chemistry*, 33, 1448-1449.
- Daniel, M.C., Astruc, D., 2004, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.*, 104, 293–346.
- De Silva, A.P., Gunaratne, H.Q.N., Gunnlaugsson, T., 1998, Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) reagents for thiols, *Tetrahedron Lett.*, 39, 5077–5080.
- Deneke, S.M., 2000, Thiol-based antioxidants, current topics in cellular regulation, 36:151-180.
- Di Ventra, M., Evoy, S., Heflin Jr., J.R., 2004, *Introduction to Nanoscale Science and Technology*, Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Doğan, M., 2006, "Nanoteknoloji ve Uygulamaları Kimya ile İlişkisi", *Kimya ve Sanayi Dergisi*, 39: 12-18.
- Egwim, I. O. C., Gruber, H. J., 2001, Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4,4'-dithiodipyridine, *Analytical Biochemistry*, 288, 188-194.
- Eustis, S., El-Sayed, M. A., 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes, *Chem. Soc. Rev.*, 35, 209–217.

- Guclu K., Ozyurek M., Gungor N., Baki S., Apak R., 2013, Selective Optical Sensing Of Biothiols With Ellman's Reagent: 5,5'-Dithio-Bis(2-Nitrobenzoic Acid)-Modified Gold Nanoparticles Volume 794, Pages 90-98.
- Gutteridge, J. M. C., Halliwell, B., 1994, Antioxidants in nutrition, health, and disease, Oxford University Press: Oxford, New York.
- Hansen, R.E., Østergaard, H., Nørgaard, P., Winther, J.R., 2007, Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine, *Analytical Biochemistry*, 363, 77-82.
- Harris, D.A. and Bashford, C.L., 1987, *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*. Washington, D.C., IRL Press.
- Huang, C.C., Chang, H.T., 2006, Selective Gold-nanoparticle-based “ turn-on” Fluorescent Sensors for Detection of Mercury (II) in Aqueous Solution, *Anal. Chem* 78, 8332–8338.
- Huang, T., Murray, R.W., 2002, Quenching of [Ru (bpy)<sub>3</sub> ]<sup>3+</sup> fluorescence by binding to Au nanoparticles, *Langmuir*, 18, 7077–7081.
- Ionita, P., Volkov A., Jeschke G., Chechik V., 2008, Lateral Diffusion Of Thiol Ligands on the Surface of Au Nanoparticles: An Electrom Paramagnetic Resonance Study, *Analytical Chemistry* 80 95-106.
- Isik, M., Ozdemir, T., Turan, I.S., Kolemen, S., Akkaya, E.U., 2013, Chromogenic and Fluorescent Sensing of Biological Thiols in Aqueous Solutions Using BODIPY- based Reagents, *Org. Lett.* 15, 216–219.
- Jenke, D.R., Brown D.S., 1987, Determination of Cysteine in Pharmaceuticals via Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization, *Anal. Chem.* 59 1509–1512.
- Jian Xu, Hui Yu, Yue Hu, Mingzhong Chen, Shijun Shao, 2016, A gold nanoparticle-based fluorescence sensor for high sensitive and selective detection of thiols in living cells, *Biosensors and Bioelectronics* 75 1–7.
- John, P., Richie, J.R., 1992, The role of glutathione in aging and cancer. *Exp. Gerontol.*, 27:615-626.
- Knapen, M.F.C.M., Zusterzeel P.L.M., Peters, W.H.M., Steegers E.A.P., 1999, Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reproduct. Biol.* 82:171-184.
- Lee KH., Chen SJ., Jeng JY., Cheng YC., Shiea JT., Chang HT., 2007, Fluorescence and interactions with thiol compounds of Nile Red-adsorbed gold nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science* 307 340–348.
- Li, X., Qian, S., He, Q., Yang, B., Li, J., Hu, Y., 2010, Design and Synthesis of a Highly Selective Fluorescent Turn-on Probe for Thiol Bioimaging in Living Cells, *Org. Biomol. Chem.* 8, 3627.

- Lodge, J.K., Youn, H.D., Handelman, G.J., Konishi, T., Matsugo, S., Mathur, V.V., Packer, L., 1997, Natural sources of lipoic acid: Determination of lipoyllysine released from protease-digested tissues by high performance liquid chromatography incorporating electrochemical detection, *Journal of Applied Nutrition*, 49, 3-11.
- Ma, L.N., Liu, D.J., Wang, Z.X., 2010, Synthesis and applications of gold nanoparticle probes, *Chin. J. Anal. Chem.*, 38, 1-7.
- Maeda, H., Matsuno, H., Ushida, M., Katayama, K., Saeki, K., Itoh, N., 2005, 2,4-Dinitrobenzenesulfonyl fluoresceins as fluorescent alternatives to Ellman's reagent in thiol-quantification enzyme assays, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 2922-2925.
- Moldeus, P., Cotgreave, I.A., Berggren, M., 1986, Lung protection by a thiolcontaining antioxidant: N-acetylcysteine, *Respiration*, 50, 31-42.
- Nath, K.A., Salahudeen, A.K., 1993, Autooxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate, *American Journal of Physiology*, 264, 306-314.
- Nimni, M.E., Han, B., Cordoba, F., 2007, Are we getting enough sulfur in our diet?, *Nutrition & Metabolism*, 24 (4), 1743-1765.
- Norio, T., 1974, On the Basic Concept of Nano-Technology, eds. *Proc. Intl. Conf. Prod. Eng.* Tokyo: Japan Society of Precision Engineering, 18-23.
- Owusu-Apenten R., 2005, Colorimetric Analysis of Protein Sulfhydryl Groups in Milk: Applications and Processing Effects, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 1-23.
- Ozyürek M., Baki S., Gungor N., Celik S. E., Guclu K., Apak R., 2012, Determination of biothiols by a novel on-line HPLC-DTNB assay with post-column detection, *Analytica Chimica Acta* 750 173- 181.
- Packer L, Witt E.H, Tritschler H.J., 1995, Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Bio.l Med.* 19(2):227-50.
- Packer, L., Tritschler, H.J., Wesel, K., 1997, Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid, *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 359-378.
- Packer, L., Witt, E.H., Tritschler, H.J., 1995, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radical Biology & Medicine*, 19, 227-250.
- Peng H., Chen W., Cheng Y., Hakuna L., Strongin R., Wang B., 2012, Thiol Reactive Probes and Chemosensors *Sensors* 12, 15907-15946; 10.3390/s121115907.
- Pettit, F.H., Yeaman, S.J., Reed, L.J., 1978, Purification and characterization of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex of bovine kidney, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75, 4881-4885.
- Philip, D., 2008, Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles, *Spectrochim. Acta A*, 71, 80-85.

- Ross D., Moldeus P., 1986, Thiyl Radicals--Their Generation and Further Reactions. In: Kocsis J.J., Jollow D.J., Witmer C.M., Nelson J.O., Snyder R. (eds) Biological Reactive Intermediates III. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 197. Springer, Boston, MA.
- Sava, N., Plancken, I. V. D., Claeys, W., Hendrickx, M., 2005, The kinetics of heat-induced structural changes of  $\beta$ -Lactoglobulin, *J. Dairy Sci.*, 88, 1646-1653.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001, Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.*, 30, 1191–1212.
- Sekar B. S., Periasamy A., 2003, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy Imaging of Live Cell Protein Localizations, *Journal of Cell Biology*, 160 (5): 629
- Shahidi, F., 1996, Health Effects and Applications, Natural Antioxidants Chemistry, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.
- Sigit I., Hages M., Brensing K.A., Frotscher, U., Pietrzik K., Von Bergmann K., Lutjohann D., 2001, *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 681–690.
- Tseng, W.L., Lee, K.,H., Chang, H.T., 2005, Using Nile red-adsorbed gold nanoparticles to locate glutathione within erythrocytes, *Langmuir*, 21, 10676– 10683.
- Ulakoğlu, Z.E.M., Gümüştaş, K.M., Belce, A., Altuğ, T., Kökoğlu, E., 1998, Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tüketiminin enerji metabolizması ile ilişkisi, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 29 (3), 127-131.
- Wlodek, L., 2002, Beneficial and harmful effects of thiols, *Pol. J. Pharmacol.* 54, 215– 223.
- Xu ., Yu H., Hu Y., Chen M., Shao S., 2016, A gold nanoparticle-based fluorescence sensor for high sensitive and selective detection of thiols in living cells, *Biosensors and Bioelectronics* 75, 1–7.

**EKLER**

|





## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Asuman ÇİFTECİ
Doğum Yeri	KOCAELİ
Doğum Tarihi	22.06.1991
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	5071363791
E-Posta Adresi	asuuozturk@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Sakarya Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya

Makale ve Bildiriler	