



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOPLAM TİYOL TAYİNİ İÇİN YENİ BİR
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Emine Münevver GÖRÜŞÜK

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 16.12.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

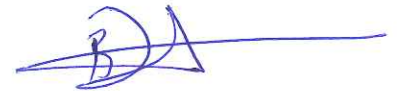
TEZ JÜRİSİ



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



Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



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



[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 abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 119Z089 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi ile desteklenmiştir.]

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK'a,

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, sabrını, samimiyetini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Burcu BEKDEŞER'e,

Tez jürimde yer alan Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK ve çok değerli hocam Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a,

Çalışmalarım boyunca destek olan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Bener, Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK ve Analitik Kimya Anabilim Dalındaki bütün hocalarıma,

119Z089 numaralı "Toplam tiyol tayini için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi" isimli araştırma projesi ile tezime burs desteği veren TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sonsuz sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam Celil GÖRÜŞÜK, annem Ayten GÖRÜŞÜK ve kardeşim Halit Reha GÖRÜŞÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2019

[Emine Münevver GÖRÜŞÜK]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. BİYOTİYOLLER	3
2.2. BİYOTİYOL BİLEŞİKLER	4
2.2.1. Glutasyon	4
2.2.2. N-asetil sistein	5
2.2.3. Sistein	5
2.2.4. Homosistein	6
2.2.5. Sisteamin	7
2.3. BİYOTİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ.....	8
2.4. KATI FAZ EKSTRAKSİYONU	9
2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi.....	9
2.5. LİTERATÜRDEKİ TİYOL TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	10
2.6. İSTATİSTİKSEL ÇALIŞMALAR	12
3. MALZEME VE YÖNTEM	13
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	13
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	13
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	14
3.3.1. Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	14
3.3.2. Modifiye Ellman Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	14
3.3.3. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	14
3.3.4. Biyotiyol Çözeltilerinin Hazırlanması.....	14

3.3.5. İlaç Örneklerinin Hazırlanması	15
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	15
3.4.1. Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi	15
3.4.2. Modifiye Ellman Yöntemi.....	15
3.4.3. HPLC Yöntemi.....	16
3.4.4. Sentetik Karışımların Hazırlanması	16
3.4.4.1. <i>Biyotiyollerin İkili, Üçlü, Dörtlü Sentetik Karışımlarının Hazırlanması ve Toplam Tiyol İçeriğinin Belirlenmesi</i>	16
3.4.4.2. <i>Polifenolik Bileşikler Varlığında Biyotiyol Karışımların Hazırlanması ve Katı Faz Ekstraksiyon İşlemi</i>	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİNİN BİYOTİYOLLERE UYGULANMASI	18
4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi: Box-Behnken Deney Tasarımı.....	18
4.1.2. Biyotiyollerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi	25
4.1.2.1. <i>Biyotiyollerin kalibrasyon grafikleri</i>	25
4.1.2.2. <i>Biyotiyol bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) görünür bölge spektrumlarının eldesi</i>	27
4.1.3. Biyotiyollerin Elde Edilen Molar Absorplama Katsayıları, Doğru Denklemleri, Lineer Aralıkları ve LOD Değerlerinin Belirlenmesi.....	28
4.1.4. Sentetik Biyotiyol Karışımların Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Tayini.....	30
4.2. MODİFİYE ELLMAN YÖNTEMİNİN BİYOTİYOLLERE UYGULANMASI	31
4.2.1. Biyotiyollerin Kalibrasyon Grafikleri	31
4.2.2. Biyotiyollerin Elde Edilen Molar Absorplama Katsayıları, Doğru Denklemleri, Lineer Aralıkları ve LOD Değerlerinin Belirlenmesi.....	32
4.2.3. Sentetik Biyotiyol Karışımların Modifiye Ellman Yöntemi İle Tayini.....	34
4.3. BİYOTİYOLLERİN HPLC YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ	35
4.3.1. Biyotiyollerin Kalibrasyon Denklemlerinin Oluşturulması	35
4.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLER VARLIĞINDA BİYOTİYOLLERİN GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİ İLE TAYİNİ	37
4.4.1. Sentetik Glutatyon (GSH) ve Gallik Asit İçeren Karışımın Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Analizi ve Sonuçların HPLC Yöntemi İle Karşılaştırılması	37
4.4.2. Sentetik Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG), Kafeik asit, Kateşin ve Kuersetin İçeren Karışımın Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Analizi ve Sonuçların HPLC Yöntemi İle Karşılaştırılması	39

4.5. İLAÇ ÖRNEKLERİNİN ANALİZİ	42
4.5.1. NAC Efervesan Tabletten Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Analizi ve Referans Yöntemler İle Karşılaştırılması.....	42
4.5.2. Asist 1200 mg NAC Tozu İçeren Saşenin Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Analizi ve Referans Yöntemler İle Karşılaştırılması	43
4.6. GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİNDE SENTETİK SERUM ÖRNEĞİNE STANDART KATKI YAPILMASI	45
4.6.1. Sentetik Serum Örneğine GSH ve GSSG Standart Katkı Yapılması	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	51
EKLER	55
ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: İndirgenmiş glutatyon ve yükseltgenmiş glutatyonun kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.4: Homosistein ve homosistinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.5 : Sisteaminin kimyasal yapısı	8
Şekil 2.6: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında TNB'ye dönüşümü.....	8
Şekil 2.7: Tiyol ve disülfürlerin Ellman reaktifi ile tayini	9
Şekil 3.1: Katı faz ekstraksiyon şeması	17
Şekil 4.1: GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan yanıt yüzey modeline göre optimal sonuç grafiği.....	22
Şekil 4.2: pH ve sıcaklık değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik.....	23
Şekil 4.3: Sıcaklık ve zaman değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik.....	23
Şekil 4.4: pH ve zaman değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik	24
Şekil 4.5: GSH, N-asetilsistein (NAC) ve Sisteinin (Cys) geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre kalibrasyon grafikleri	25
Şekil 4.6: GSSG ve Homosistinin (Hcyss) geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre kalibrasyon grafikleri.....	26
Şekil 4.7: GSH'nin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumu.....	27
Şekil 4.8: GSSG'nin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumu.....	28
Şekil 4.9: GSH, N-asetil sistein (NAC) ve Sisteinin (Cys) modifiye Ellman yöntemine göre kalibrasyon grafikleri	31

Şekil 4.10: GSSG ve Homosistin (Hcys) modifiye Ellman yöntemine göre kalibrasyon grafikleri.....	32
Şekil 4.11: 1.0×10^{-3} M konsantrasyondaki Sisteamin (1), sistin (2), sistein (3), homosistin (4), homosistein (5), indirgenmiş glutatyon (6), yükseltgenmiş glutatyon (7) ve N-asetil sistein (8) standartlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramları	36
Şekil 4.12: 5×10^{-5} M GSH (1) ve 3×10^{-5} M gallik asit (2) karışımının 215 nm'deki HPLC kromatogramı	37
Şekil 4.13: Katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası 5×10^{-5} M GSH (1) ve 3×10^{-5} M gallik asit (2) karışımının 215 nm'deki HPLC kromatogramı.....	38
Şekil 4.14: 1.0×10^{-4} M GSSG (1), 2.0×10^{-5} M kateşin (2), 3.0×10^{-5} M kafeik asit (3) ve 1.0×10^{-5} M kuersetin (4) karışımlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramı	40
Şekil 4.15: Katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası 1.0×10^{-4} M GSSG (1), 2.0×10^{-5} M kateşin, 3.0×10^{-5} M kafeik asit ve 1.0×10^{-5} M kuersetin karışımlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramı	41
Şekil 4.16: 600 mg NAC efervesan tabletin 215 nm'deki HPLC kromatogramı ($t_R = 11.65$).....	42
Şekil 4.17: Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren saşenin 215 nm'deki HPLC kromatogramı ($t_R = 11.53$)	44
Şekil 5.1: ABTS radikal katyonunun oluşumu	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri.....	18
Tablo 4.2: Box-Behnken deneysel tasarım matrisi.....	19
Tablo 4.3: Varyans analizi (ANOVA).....	20
Tablo 4.4: Yanıt yüzey modeline ilişkin regresyon katsayıları sonuçları	21
Tablo 4.5: Model özet istatistikleri.....	22
Tablo 4.6: Biyotiyollerin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemiyle elde edilen molar absorplama katsayıları, lineer aralıkları ve LOD değerleri.....	29
Tablo 4.7: Sentetik biyotiyol içeren karışımların geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri	30
Tablo 4.8: Biyotiyollerin modifiye Ellman yöntemiyle elde edilen molar absorplama katsayıları, lineer aralıkları ve LOD değerleri.....	33
Tablo 4.9: Sentetik biyotiyol içeren karışımların modifiye Ellman yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri	34
Tablo 4.10: GSH, GSSG, NAC, Cys, Cyss, Hcys, Hcyss ve Sisteaminin HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve alıkonma zamanları (y:pik alanı; c: molar konsantrasyon)	35
Tablo 4.11: GSH (1) ve gallik asit (2) içeren karışımın katı faz ekstraksiyon öncesi ve katı faz ekstraksiyon sonrası elde edilen alıkonma zamanları (dk) ve molar konsantrasyon değerleri.....	38
Tablo 4.12: GSH içeren sentetik karışımın beklenen konsantrasyon değeri ve modifiye ABTS-Persülfat ve HPLC yöntemine göre bulunan konsantrasyon değerleri.....	39
Tablo 4.13: GSSG, kateşin, kafeik asit ve kuersetin karışımlarının alıkonma zamanları ve konsantrasyon (M) değerleri.....	40
Tablo 4.14: GSSG içeren sentetik karışımın beklenen konsantrasyon değeri, geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat ve HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değerleri.....	41

Tablo 4.15: 600 mg NAC efervesan tabletin bulunması beklenen konsantrasyon değeri ve geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat, modifiye Ellman ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan konsantrasyon değerleri.....	43
Tablo 4.16: Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren saşe ilaç örneğinde bulunması beklenen konsantrasyon değeri ve geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat, modifiye Ellman ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan konsantrasyon değerleri.....	44
Tablo 4.17: Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminin doğruluğu ve kesinliği	45



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
r	: Lineer korelasyon katsayısı
λ_{max}	: Maksimum dalga boyu
c	: Konsantrasyon
ΔA	: Absorbans farkı
ϵ	: Molar absorplama katsayısı

Kisaltmalar	Açıklama
GSH	: İndirgenmiş glutatyom
GSSG	: Yükseltgenmiş glutatyom
Cys	: Sistein
Cyss	: Sistin
Hcys	: Homosistein
Hcyss	: Homosistin
NAC	: N-asetil sistein
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)
TNB	: 5-tiyo- 2-nitrobenzoik asit
ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TTİ	: Toplam Tiyol İçeriği
SPE	: Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction)
LOD	: Gözlenebilme Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin Sınırı (Limit of Quantification)
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)
EDTA	: EDTA (Etilendiamintetrasetik asit)
ABTS⁺	: ABTS radikal katyonu

ÖZET

TOPLAM TİYOL TAYİNİ İÇİN YENİ BİR SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

[YÜKSEK LİSANS TEZİ]

[Emine Münevver GÖRÜŞÜK]

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

[Kimya Anabilim Dalı]

[Danışman : Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK]

[Biyotiyoller, insan vücudunda fizyolojik ve biyokimyasal süreçte önemli rol oynamaktadırlar. Hücre sel tiyol seviyesindeki anormal değişimler Alzheimer, diyabet, AIDS, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkla bağlantılıdır. Bu yüzden, biyotiyolleri kantitatif olarak belirleyebilen yöntemlerin geliştirilmesi hastalıkların oluşumunu önlemek açısından son derece önemlidir. Bu tez çalışmasında, biyotiyollerinin spektrofotometrik tayini için modifiye ABTS-Persülfat yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, biyotiyollerin, çözelti içinde mavi-yeşil olan ve maksimum 734 nm'de absorbansa sahip, ABTS radikal katyonunu renksizleştirme yeteneğine dayanır. Optimum deney koşulları (pH, sıcaklık, zaman) Box-Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Optimum şartlar pH 8, sıcaklık 60°C ve zaman 60 dk olarak elde edilmiştir. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ve modifiye Ellman yöntemi kullanılarak indirgenmiş glutatyon, yükseltgenmiş glutatyon, N-asetil sistein, sistein, sistin, homosistein, homosistin ve sisteamin gibi biyotiyol bileşiklerin

tayini yapılmıştır. Her bir biyotiyol bileşiği için molar absorplama katsayıları, lineer çalışma aralıkları belirlenmiştir. Geliştirilen yöntem, sentetik serum örneklerine uygulanarak kesinlik, doğruluk parametreleri test edilmiştir. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminde biyotiyollerin gözlenebilme sınırları (LOD) 1.30×10^{-7} M ile 8.25×10^{-7} M arasında bulunmuştur. Referans yöntem olarak kullanılan modifiye Ellman yönteminde ise 9.33×10^{-7} M ve 1.55×10^{-5} M arasında bulunmuştur. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ve modifiye Ellman yöntemi için, ikili, üçlü ve dörtlü sentetik karışımlar hazırlanarak N-asetil sistein eşdeğeri cinsinden teorik ve deneysel tiyol içerikleri değerlendirilmiştir. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi kullanılarak polifenolik bileşikler varlığında biyotiyollerin tayini yapılmış ve bulgular HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilen modifiye ABTS yöntemi ile ilaç örneklerindeki tiyol içerikleri belirlenmiş ve bulgular modifiye Ellman ve HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

|
 Aralık 2019, 72 sayfa.

Anahtar kelimeler: |Biyotiyoller, modifiye ABTS-Persülfat yöntemi, spektrofotometrik yöntem |

SUMMARY

DEVELOPMENT OF A NOVEL ASSAY FOR TOTAL THIOL DETERMINATION

M.Sc. THESIS

Emine Münevver GÖRÜŞÜK

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemistry

Supervisor : Prof. Dr. Mustafa Reşat APAK

Biothiols play an important role in the physiological and biochemical processes in human body. Abnormal changes in cellular thiol level are associated with many diseases, including Alzheimer's, diabetes, HIV, cardiovascular diseases and cancer. Therefore, the development of methods that can quantitatively determine of biothiols is extremely important to prevent the occurrence of diseases. In this thesis work, a modified ABTS-Persulfate method was developed for spectrophotometric determination of biothiols. The developed method is based upon the ability of biothiols to decolorize the ABTS radical cation ($ABTS^{+}$), which is blue-green in solution and has an absorbance maximum of 734 nm. Optimum experimental conditions (pH, temperature, time) were determined by using Box-Behnken design. Optimum condition was obtained at pH 8, temperature 60°C and time 60 minutes. Biothiol compounds such as reduced glutathione, oxidized glutathione, N-acetyl cysteine, cysteine, cystine,

homocysteine, homocystine and cysteamine were determined by using a developed modified ABTS-Persulfate method and modified Ellman assay. Molar absorption coefficients and linear concentration range were determined for each biothiol compounds. The precision, accuracy and linearity parameters of the developed method were tested by applying sentetic serum. In the developed modified ABTS-Persulfate method, limit of detection (LOD) values of biothiols were found in the range of 1.30×10^{-7} M ile 8.25×10^{-7} M. Limit of detection (LOD) values of biothiols were found in the range of 9.33×10^{-7} M ve 1.55×10^{-5} M in modified Ellman assay. The developed modified ABTS-Persulfate method and modified Ellman assay was applied to the binary, ternary, quaternary synthetic mixtures and the theoretical and experimental NAC equivalent thiol content values were evaluated. Biothiols were determined in the presence of polyphenolic compounds by using a developed modified ABTS-Persulfate method and the findings were compared with those of HPLC assay. The thiol content in pharmaceutical samples was determined by a developed modified ABTS method and findings were compared with those of modified Ellman assay and HPLC assay. |

December 2019, [72] pages.

Keywords: | Biothiols, modified ABTS-Persulfate method, spectrophotometric method |

1. GİRİŞ

Organizmada oksidan-antioksidan sistemler bir denge içerisinde bulunmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretildiği ve antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda, bu dengenin bozulması sonucu oksidatif stres oluşmaktadır (Sies, H., 1997). Biyolojik sistemlerde, tiyoller, antioksidan savunma sisteminde merkezi rol oynamaktadırlar. (Sen ve Packer, 2000). Antioksidan savunma sistemindeki rollerinin dışında, tiyoller, protein fonksiyonlarının düzenlenmesi, protein yapılarının stabilizasyonu, enzim fonksiyonlarının düzenlenmesi, kritik sistemin kalıntılarının geri dönüşümsüz oksidasyonuna karşı proteinlerin korunması ve transkripsiyon gibi biyokimyasal süreçlerde kritik rol almaktadırlar. Anormal tiyol redoks durumunun; edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS), Friedreich ataksisi, amiotrofik lateral skleroz (ALS), diyabet, kanser, karaciğer rahatsızlığı, romatoid artrit, multip skleroz (MS), Parkinson ve Alzheimer hastalığı gibi çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol aldığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Chen ve diğ., 2008).

Hücre içi biyotiyoller, indirgenmiş tiyoller ile oksitlenmiş disülfürler arasındaki redoks durumunu düzenleyerek, redoks dengesini korumada ve oksidatif stres ile mücadelede önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden tiyollerin ve disülfürlerin redoks durumlarının belirlenmesi son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir. Özellikle GSH/GSSG, Cys/Cyss ve Hcys/Hcyss redoks çiftleri dikkat çekmektedir. Biyotiyollerin redoks durumlarının analizi iki seviyede yapılmalıdır. Bunlardan biri, farklı tiyoller ve disülfürlerde redoks kimliğinin belirlenmesi, diğeri ise belli bir redoks çiftinin redoks oranının belirlenmesidir. Bahsedilen bu altı tiyol ve disülfürün anormal bir şekilde değişmesi farklı patolojik süreç ve hastalıklarda yer aldığından, bu redoks türleri arasında ayırım yapabilen yeni yöntemlerin geliştirilmesi, fizyolojik fonksiyonların ve ilgili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için son derece önemlidir. Biyotiyollerin tayininde yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC), elektrokemilüminesans, yüzeyle zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır. (Zhang ve diğ., 2019).

Bu yöntemler, umut vaad eden yöntemler olmasına rağmen, karmaşık örnek ön işlem prosedürleri, pahalı ekipman, profesyonel cihaz kullanımı, uzun reaksiyon süreleri ve örnek modifikasyonları gibi dezavantajları vardır.

Bu tez çalışması kapsamında, biyotiyollerin tayini için spektrofotometrik modifiye ABTS-Persülfat yöntemi geliştirilmiştir. Literatürde ABTS radikal katyonu kullanılarak TEAC/ABTS antioksidan kapasite tayini yapılmaktadır. Bu method üzerinde birtakım optimizasyon çalışmaları (pH, sıcaklık, zaman) yapılarak biyotiyollerin (sülhidril ve disülfür grubu) tayini yapılabilmektedir. Optimum deney koşulları (pH 8, sıcaklık 60⁰C ve zaman 60 dk) Box-Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Geliştirilen bu yöntem, biyotiyoller varlığında, ABTS molekülünün potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşan ABTS radikal katyonun, 734 nm absorbansta meydana gelen azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ve modifiye Ellman yöntemi ile sentetik karışımlarda N-asetilsistein eşdeğeri cinsinden toplam tiyol içeriğine bakılmış ve geliştirilen modifiye ABTS-persülfat yöntemi ile elde edilen sonuçlar daha hassas bulunmuştur. Polifenolik bileşikler varlığında biyotiyollerin toplam tiyol içerikleri geliştirilen yöntem ve HPLC yöntemi ile tayin edilmiş ve sonuçlar uyumlu bulunmuştur. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile farmasötik ilaç örneklerinin toplam tiyol içerikleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar modifiye Ellman ve HPLC yöntemi ile elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermiştir. Sentetik serum örneğine GSH ve GSSG standart katkı yöntemi uygulanarak, geliştirilen yöntemin doğruluk ve kesinlik parametrelerine bakılmıştır.

Geliştirilen yöntem; uygulama kolaylığı tanınması, hızlı sonuç vermesi ve maliyetinin düşük olması gibi avantajlar sağladığından, biyotiyollerin belirlenmesi için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. |

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİYOTİYOLLER

Tiyoller, bunların aktif halleri olan sülfhidril kalıntılarının (-SH) varlığı ile tanımlanmış bir organik kükürt türevleri sınıfıdır. Kimyasal olarak, tiyoller merkaptanlardır (R-SH) ve biyolojik merkaptanlar genellikle biyotiyoller olarak adlandırılırlar. Biyotiyoller, büyük molekül ağırlıklı protein tiyolleri ve düşük molekül ağırlıklı serbest tiyoller olarak sınıflandırılabilirler.

Tiyollerin bir başka önemli özelliği de, indirgeme yeteneğine sahip olmalarıdır. Tiyoller indirgen özellikte olup, negatif standart indirgeme potansiyellerine sahiptir. Bir oksidan-tiyol etkileşimi durumunda, oksidan tiyolün indirgeyici gücünün harcanmasıyla daha az toksik bir yan ürüne dönüşür, tiyolün kendisi ise disülfür haline (R-S-S-R) yükseltgenir. Bir tiyol (R-SH), hidrojen atomunu sülfhidril grubundan (-SH) kaybettiğinde veya sülfürden bir elektronu kaybettiğinde bir thiyl radikali (R-S) oluşur. Fizyolojik pH koşulları altında, thiyl radikalleri kararsızdır ve disülfür haline dönüşebilir (Sen ve Packer, 2000).

Birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Glutatyon peroksidaz enzimi, glutatyonun indirgenmiş formunu, yükseltgenmiş hale dönüştürmektedir. Hücre içinde düşük molekül ağırlıklı tiyol/disülfür havuzunu temelde GSH/GSSG oluşturmakta olup GSH baskın bulunan formdur. Disülfür bağları, çözünebilir proteinlerin yapısal kararlılığının sağlanmasında temeldir. Bu bağların oluşması ve kırılması, ortamın redoks potansiyelini tayin eden donör ve akseptörlerin varlığına bağlıdır. Böylece hücre içi veya hücre dışı ortama tiyol ilavesi protein yapı ve fonksiyonunda kuvvetli etkilere neden olabilir (Curello ve diğ., 1987).

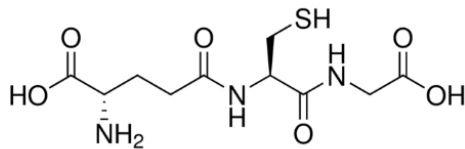
Hücrelerde tiyol redoks durumu, protein yapısı ve aktivitesi, sinyal iletimi, membran taşınması, apoptozis (programlanmış hücre ölümü), ksenbiyotik metabolizması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi, hücre büyümesi ve çoğalması gibi biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır (Sen ve Packer, 2000).

2.2. BİYOTİYOL BİLEŞİKLER

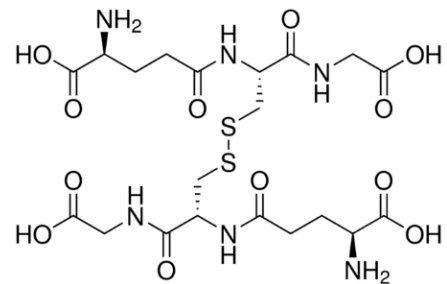
2.2.1. Glutasyon

Glutasyon (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin) hemen hemen tüm hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan önemli bir tiyoldür (Meister, 1984). İlk olarak J.de Rey-Paihade tarafından 1888 yılında maya hücresinde bulunduğundan sonra 1921'de Hopkins tarafından keşfedilmiştir (Hopkins, 1921). Önceleri glutamil-sisteinden oluşan bir dipeptid olduğu ileri sürülmüştür. Fakat 1929 yılında kristal halinde elde edildikten sonra yapısının tripeptid olduğu anlaşılmıştır (Hopkins, 1929). 1935 yılında ise Harrington ve Mead tarafından L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin halinde sentezlenmiştir (Harrington ve Med, 1935).

Glutasyon; glutamat, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Bu sentezlenme iki aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşamada glutamin-sistein sentetaz isimli enzim GSH'nin prekürsör aminoasitleri olan glutamat ve sisteinden, γ -glutamilsisteininin oluşumunu katalizler. İkinci aşamada ise glutasyon sentetaz, glisin ve γ -glutamilsisteinden glutasyonu oluşturur. İndirgenmiş glutasyon, serbest bir sülfhidril grubu içeren bir tripeptiddir. İndirgenmiş durumda hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin sistein artıklarını muhafaza eden bir sülfhidril tamponu olarak görev yapar. İndirgenmiş glutasyonun (GSH), yükseltgenmiş forma (GSSG) oranı normalde yaklaşık 500/1'dir. İndirgenmiş form, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin sebep olduğu detoksifikasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır (Ulakoğlu ve diğ., 1998).



İndirgenmiş glutasyon



Yükseltgenmiş glutasyon

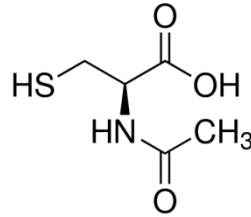
Şekil 2.1: İndirgenmiş glutasyon ve yükseltgenmiş glutasyonun kimyasal yapısı

Hücrelerde bulunan en zengin endojen olan glutatyon, toksinlere karşı savunma mekanizması, sinyal iletimi, gen regülasyonu, serbest radikallerin ve peroksidlerin nötralizasyonu gibi birçok biyolojik proseste önemli rol oynamaktadır. Glutatyonun anormal seviyeleri, Alzheimer hastalığı, diyabet, HIV, erken yaşlanma, karaciğer hasarı ve çeşitli kanser türleri gibi fizyolojik koşullardan kısmen sorumlu olduğu bildirilmiştir (Zhao ve diğ., 2019).

2.2.2. N-asetil sistein

Tiyol grubu bileşiklerden olan N-asetil sistein (NAC), sistein ve indirgenmiş glutatyonun prekürsörüdür. N-asetil sistein, yapısındaki sülfhidril grubundan dolayı mukoproteinlerdeki disülfür bağlarını azaltarak mukolitik etki göstermektedir (Zafarullah ve diğ., 2003).

N-asetil sisteinin karbon tetraklorürü ile oluşturulan karaciğer hasarında; oksidatif zararı onarmada, oksijen radikallerinin uzaklaştırılarak reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korumada yararlı olduğu, oksidan strese karşı dokuların savunmasını destekleyebildiği, GSH ve GSH ilişkili enzimlerin aktivitesinde artışa neden olabileceği ve direkt antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir (Akşit ve diğ., 2015).



Şekil 2.2: N-asetil sisteinin kimyasal yapısı

Asetaminofen toksisitesine karşı koyma kabiliyeti ile bilinen NAC, sistein/GSH eksikliğini tolere edebilen güvenli bir antidottur. N-asetil sistein, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve HIV enfeksiyonu dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonlarda, genetik ve metabolik bozukluklarda GSH eksikliğini tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır (Atkuri, 2007).

2.2.3. Sistein

Tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin vücut metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. Sistein, esansiyel olmayan aminoasitler olarak sınıflandırılmasına rağmen, insan vücudunda sentezlenebilir. Vücut metabolizmasında

sistein; metiyonin, tiamin, biotin, koenzim A, ve Fe/S (Demir/Kükürt) arasındaki dengenin kurulmasında önemli bir yere sahiptir. Ayrıca sistein, ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi hücrel proseslerde önemli rol oynamaktadır (Nur ve diğ., 2014).

Farmasötik alanında, sistein antidot olarak kullanılmakta ve asetaminofen toksitesine karşı koyma kabiliyeti ile bilinmektedir. HIV enfeksiyonu ve KOAH da dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarda, genetik kusurlarda ve metabolik bozukluklarda GSH eksikliğini tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır (Nur ve diğ., 2014).

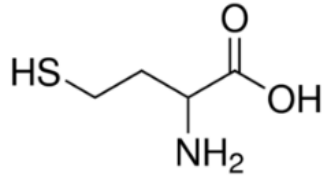
İnsan plazmasındaki major tiyol/disülfür redoks çifti sistein ve disülfür formu olan sistindir (Jones ve Go, 2011). Son yapılan çalışmalar, sistein eksikliğinin Parkinson hastalığı, cilt lezyonları, lökosit kaybı, karaciğer hasarı, büyümede gerileme, sedef hastalığı ve uyusukluk ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Zhao ve diğ., 2019).



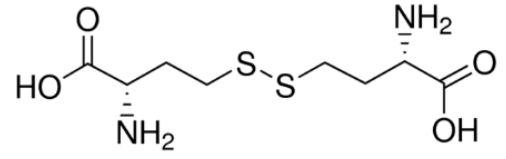
Şekil 2.3: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı

2.2.4. Homosistein

Tiyol grubu içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan homosistein, ilk olarak 1932 yılında Butz ve Du Vigneaud tarafından bulunmuş sülfür içeren bir aminoasittir (Butz ve Vigneaud, 1932). Homosisteinin yükseltgenmiş hali homosistindir. Homosistin ve protein bağlı homosistein gibi homosisteinin yükseltgenmiş formlarını içeren toplam plazma homosisteinindeki artış kalp rahatsızlıklarında başlı başına bir risk faktörüdür (House ve diğ., 1999).



Homosistein



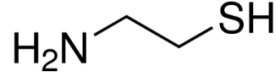
Homosistin

Şekil 2.4: Homosistein ve homosistin kimyasal yapısı

2.2.5. Sisteamin

Sisteamin (2-Aminoethanethiol), vücutta bulunan bir aminoasit olan sisteinin dekarboksilasyonu sonucu oluşan önemli bir biyojen amindir. Koenzim A'nın yapısına girmesi nedeniyle enerji üretimi için gerekli olup antioksidan ve antiklastojenik bir maddedir (Miller ve Schlensinger,1993).

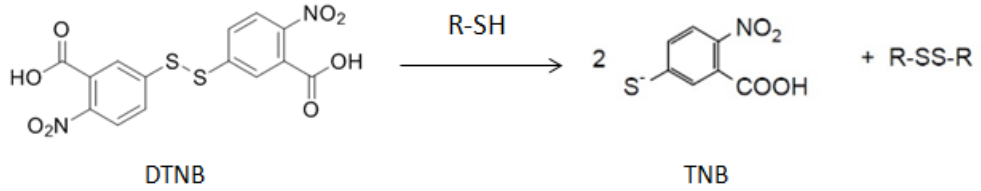
Sisteamin, insan vücudunda sistin birikmesi sonucu ortaya çıkan ve nadir görülen metabolik hastalık olan sistinozisin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalıkta sistin kristalleri böbrek, göz, kas ve beyin gibi organlarda hücre içine fazla miktarda çökerek sistinozis denilen hastalığa neden olmaktadır (Gahl ve diğ., 2002; Topaloğlu ve diğ., 2012). Sisteamin tedavisi ile lizozomlarda biriken sistin kristallerinin birikimi azaltılarak, böbrek fonksiyonlarının bozulması ve böbrek dışı komplikasyonların oluşması engellenmektedir (Markello ve diğ. 1993; Gahl ve diğ.,1987). Ayrıca topikal olarak uygulanan sisteamin, gözlerde korneal sistin kristallerinin birikimini geciktirebilmekte ve azaltabilmektedir (Jones ve diğ., 1991; Makuloluwa ve Shams, 2018).



Şekil 2.5 : Sisteaminin kimyasal yapısı

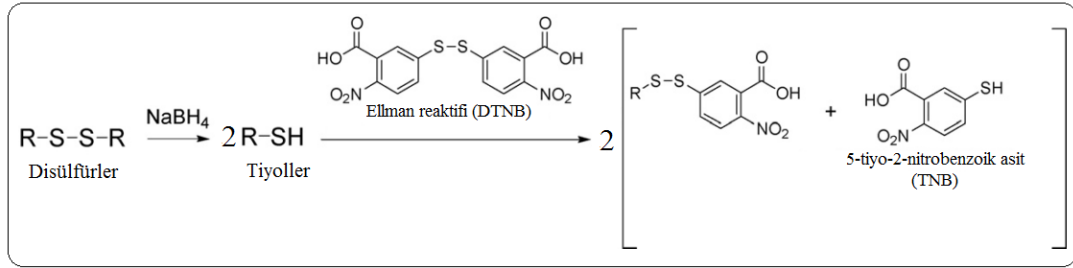
2.3. BİYOTİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ

Spektrofotometrik Ellman yöntemi; Orjinalinde Ellman reaktifi olarak bilinen DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2- nitrobenzoik asit)) ile tiyol grupları kantitatif olarak türevlendirilir ve reaksiyon esnasında eşdeğer miktarda TNB serbest kalır. Oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 412 nm de ölçülür. Hızlı ve çok yönlü bir yöntem olmasına rağmen DTNB reaktifi sadece sülfhidril grubu içeren tiyol bileşikleri ile reaksiyon vermektedir. Tiyol grubunun pKa ve pH değerleri reaksiyon hızı ile yakından ilişkilidir. (Hansen, 2007).



Şekil 2.6: DTNB'nin tiyol grubu bileşik varlığında TNB'ye dönüşümü

Modifiye Ellman Yöntemi; Erel ve diğ. tarafından orijinal Ellman yöntemi modifiye edilmiştir. Modifiye Ellman yönteminde, tiyol/disülfür dengesinin hem yükseltgenebilir tiyol düzeyi hem de indirgenebilir disülfür düzeyi hem de sistemin tamamı değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemde oksidasyon sonucu oluşan disülfür bağları sodyum borhidrat ile serbest sülfhidril gruplarına indirgenmektedir. Sodyum borhidratın fazlası formaldehidle bağlanarak ortamdan uzaklaştırılır. Native (doğal) tiyol miktarı ve disülfür bağlarının indirgenmesi ile oluşan total tiyol miktarı DTNB (5,5'-dithio-bis-(2 nitrobenzoik asit) kromojeni ile 412 nm'de ölçülmektedir (Erel ve diğ. 2014).



Şekil 2.7: Tiyol ve disülfürlerin Ellman reaktifi ile tayini

2.4. KATI FAZ EKSTRAKSİYONU

Katı faz ekstraksiyonu (SPE), sıvı faz ekstraksiyonuna alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. SPE metodunda, kromatografik yöntemlere benzer şekilde analiz edilecek madde, çözücü ve dolgu maddelerinin özelliklerine göre çeşitli ayırma mekanizmaları rol oynar. Ayırma mekanizmaları olarak normal faz, ters faz ve iyon değişim (katyonik ve anyonik değişim) sayılabilir. Normal faz; polar bileşiklerin polar olmayan matrikslerden ayrılması işlemidir. Bu yöntemde en fazla kullanılan dolgu maddesi silikadır. Ters faz, dolgu madde polaritesinin örnek çözeltisinden daha düşük olduğu sistemdir. Oktadesil (C-18) bu teknik için en fazla kullanılan madde olmakla birlikte, oktil (C-8), sikloheksil, bütül, fenil gibi çeşitli örnekler için seçici olmaları nedeniyle tercih edilirler. SPE sahip olduğu bu avantajlar sayesinde özellikle çevre, gıda, biyokimya, toksikoloji, kozmetik ve organik sentez gibi alanlarda en fazla kullanılan örnek hazırlama metodlarından birisi haline gelmiştir. (Yavuz ve Aksoy, 2006).

2.4.1. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi

Katı faz ekstraksiyon metodunda kolondan örnek geçirilmeden önce, katı fazın örnek çözücüsü ile aynı olan uygun bir çözücü kullanılarak şartlandırılma yapılır. Şartlandırma işlemi, kolondan uygun madde geçirilerek tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve matriksteki maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesi amacıyla yapılmaktadır. Ardından örnek çözeltisi kolona vakum yardımıyla çektilererek belli hacimde sisteme verilir ve analitler katı faz üzerinden deriştilir. Uygun bir çözücü ile katı faz yıkanarak, analitleri kolondan uzaklaştırmaksızın, katı faz üzerinden tutunmuş olan matriks iyonları uzaklaştırılmış olur. Son olarak kolondan uygun bir elüent geçirilerek tutunan ortam bileşenlerini almayarak, analit iyonları elüe edilir (Camel, 2003).

2.5. LİTERATÜRDEKİ TİYOL TAYİNİ İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Graaf Hess ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, HPLC yöntemi kullanılarak, lökosit ve fibroblastlarda sistein üzerinden sistin tayini yapılmaktadır. Sitozoldeki sistein ve diğer sülfhidril gruplarının girişimlerini engellemek için N-etilmaleimid (NEM) kullanılarak sisteinin sistine oksidasyonu önlenmiş olmaktadır. Açığa çıkan sistin, sodyum borhidru ile indirgenerek sisteinlere dönüşmesi sağlanır ve oluşan sistinler monobrombimane ile reaksiyona sokulup, türevlendirilerek HPLC floresans dedektör ile tayini yapılmıştır. Yöntemin tayin aralığı 1-100 μM , tayin limiti ise 0,3 μM olarak bulunmuştur. Lökositler için geri kazanım %83, fibroblastlar için ise %69 olarak tespit edilmiştir (Graaf Hess ve diğ., 1999).

Niu ve diğ. tarafından gerçekleştirilen çalışmada homosistein ve glutatyon (GSH) varlığında sisteini ayırmak için BODIPY türevi hassas ve seçici bir floresans sensör geliştirmişlerdir. Bu sensörün, homosistein ve glutatyon varlığında sistine karşı seçici özelliği olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca Hela kanser hücresinde uygulama yapılmıştır (Niu ve diğ., 2013).

Athilakshmi ve diğ., gümüş nanopartikül kullanarak sistin ve sistein aminoasitlerini tespit etmişlerdir. Renk değişimi ve gümüş nanopartiküllerin kümelenmesi UV-GB Spektroskopisi ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir (Athilakshmi ve diğ., 2013).

Güçlü ve diğ., biyolojik olarak önemli tiyoller (biyotiyoller), biyolojik numunelerde ve farmasötiklerde seçici bir şekilde belirlemek üzere Ellman reaktifini altın nanopartiküllere adsorbe ederek yeni bir optik sensör geliştirmişlerdir. Serbest sülfhidril grupların tayini için suda çözünen bileşik olan 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), kovalent olmayan bir etkileşim ile altın nanopartiküllerin üzerine adsorbe edilerek, biyotiyoller ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzonat (TNB^{2-}) anyonunun oluşmasına bağlı olarak 410 nm'deki absorban değişimi ölçülmüştür. Sensör, sistein, glutatyon, homosistein, sisteamin, dihidrolipoik asit ve 1,4-dithioerythritol içeren standart biyotiyollere geniş konsantrasyon aralığında lineer cevap vermiştir. Altın nanopartiküller, trisodyum sitrat ile altın iyonlarını indirgeyerek hazırlanmıştır ve burada sitrat hem stabilize edici hem de indirgeyici madde olarak görev almıştır (Güçlü ve diğ., 2013).

Yang ve diğ., tarafından, N-[4-metilkumarin -7-1] maleid yapısı sentezlenmiş ve özellikle sistein üzerinde 'off-on' florometrik bir prob olarak tanımlanmıştır. Ayrıca floresans artışıyla

canlı hücrelerde sistein ölçülerek probun yeteneği kanıtlanmıştır. Dedeksiyon limiti en düşük 74 nmol/L olarak bulunmuştur (Yang ve diğ., 2015).

Liu ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, sistein bileşiğine duyarlı naftalimid ve maleimid içeren iki fotonlu floresan prob sentezlemiştir. Bu prob foto-indüklenmiş elektron transferinden dolayı (d-PET) zayıf floresans şiddetine sahiptir. Sistein ile reaksiyonundan sonra d-PET prosesi bloklanarak, 470 nm dalga boyunda probun floresansı gözlenmiştir. d-PET prensibi, yoğunluk fonksiyonel teorisi ve zamana bağlı yoğunluk fonksiyonel teorisi ile teorik hesaplamaları yapılmıştır . Bu prob, diğer potansiyel girişimler üzerinde (glutasyon ve homosistein) sisteine karşı yüksek hassasiyet ve seçicilik göstermiştir. Ayrıca bu prob canlı hücrelere başarıyla uygulanmıştır (Liu ve diğ., 2015).

Adar tarafından yapılan çalışmada, sistein ve sistin karışımının parçacık dağılımı analiz edilmiştir. Parmakizi bölgesinde Raman bantlarının belirgin bir şekilde ayırt edilmesi, moleküllerdeki atomik hareketlerin yoğun bir şekilde karıştırılmasından dolayı genelde zor olduğu, fakat bu çalışmada (S-S) disülfür bağının diğer atomlararası bağlarla fark edilebilir bir şekilde ayırt edilebildiği ve Raman spektrumunda vibrasyonel bantın yaklaşık 500 cm⁻¹ dalga sayısında keskin bir bant olarak kolayca tanındığını gözlemlenmiştir. Monomer (S-H) sülfhidril fonksiyonel grubunun titreşimi, yaklaşık 2500 cm⁻¹ dalga sayısında olduğu gözlemlenmiştir (Adar, 2015).

2.6. İSTATİSTİKSEL ÇALIŞMALAR

İstatistiksel deneye dayanan yöntemlerin başında Response Surface Methodology (RSM) yani yanıt yüzey yöntemleri (YYY) gelmektedir. Bu yöntem bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi tahmin etmek için kullanılan istatistik tekniktir. Yanıt yüzey yöntemi ilk olarak 1951 yılında Box ve Wilson tarafından tanımlanmış olup kimya alanındaki araştırmalarda kullanılmıştır (Box and Wilson, 1951). Myers ve Montgomery ise yanıt yüzey yöntemini, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel verilerin birlikte değerlendirildiği bir deneysel tasarım yöntemi olarak tanımlamaktadır (Myers ve diğ., 2016).

Bu tez çalışması kapsamında, Minitab® paket programının 19.1.0 (Minitab Inc. State College PA, ABD) versiyonunda yer alan yanıt yüzey yöntemlerinden (Response Surface Methodology) biri olan Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Box-Behnken tasarımı 1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiştir (Box and Behnken, 1960). Bu tasarım, ikinci derece model parametrelerinin tahmin edilmesinde, ardışık tasarımların oluşturulmasında, modelin güven eksikliğinin analizinde ve bloklarda kullanılan bir yanıt yüzey yöntemidir (Prvan and Street, 2002).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında girdap karıştırıcı, çözeltilerin inkübasyon işlemi için Memmert marka WNB 10 model su banyosu, çözeltilerin pH'sının belirlenmesinde Hanna HI2202 model pH-metre ve bidistile su üretimi için Millipore Simpax 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanılmıştır. Absorbans ölçümlerinde Agilent marka Cary 100 Bio model UV-Vis spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için Hellma marka 10 mm ışığa yollu kuartz küvet kullanılmıştır. HPLC analizlerinde Waters HPLC Cihazı (Waters 1525 Binary HPLC pompa, Waters 2998 photodiode array (PDA) detektör, Waters In-line degasser AF, Waters C 18 kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m), Hamilton (Reno, NV, USA) marka 50 μ L enjeksiyon şırıngası) kullanılmıştır. Katı faz ekstraksiyon işlemi için, Agilent marka vakum pompası ve Sigma-Aldrich Supercos Discovery DSC-18 kartuş kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), potasyum persülfat (K₂S₂O₈), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), sodyum dihidrojen fosfat (NaH₂PO₄.H₂O), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), fosforik asit (%85), indirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), N-asetil sistein (NAC), sistein (Cys), sistin (Cyss), homosistein (Hcys), homosistin (Hcyss), sisteamin, gallik asit, kuersetin, kateşin, kafeik asit, askorbik asit, tris(hidroksimetil aminometan) (TRIS), 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sodyum klorür (NaCl), sodyum borhidrat (NaBH₄), formaldehit (CH₂O), disodyum etilendiamintetraasetik asit (EDTA), metanol (MeOH), etanol (EtOH). Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Çalışmada kullanılan NAC 600 mg efervesan tablet Basel İlaç San. Tic. A.Ş ve Asist 1200 mg NAC toz saşe Bilim İlaç San. ve Tic. A.Ş. ilaç örnekleri eczaneden temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

5×10^{-4} M konsantrasyonda ABTS çözeltisi hazırlamak için; ABTS'den 0.0274 g tartım alınarak bidistile su ile son hacmi 100 mL olacak şekilde hazırlandı. Potasyum persülfat çözeltisi 6.89×10^{-3} M konsantrasyonda olacak şekilde 0.0465 g tartım alınıp fosfat tamponu (pH 8) içerisinde 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. ABTS^{•+} radikal çözeltisi elde etmek için, potasyum persülfat çözeltisinden 2 mL alınıp ABTS stok çözeltisinin (98 mL) içerisine ilave edilerek 100 mL 'ye tamamlandı. Hazırlanan ABTS^{•+} radikal çözeltisi, 12-16 saat boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelmektedir (Walker ve Everette, 2009).

3.3.2. Modifiye Ellman Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

NaCl çözeltisi, 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde 0.05844 g tartım alınıp %50 (v/v) metanol içerisinde son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. NaBH₄ çözeltisi, 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde 0.0378 g tartım alınıp %50(v/v) metanol içerisinde son hacmi 100 mL'ye tamamlandı. 100 mM konsantrasyonda Tris tampon çözeltisi hazırlamak için; 12.113 g tartım alınarak pH 8.2 olacak şekilde bidistile su içerisinde hazırlanarak son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. 6.175 mM konsantrasyondaki formaldehitten 0.5 mL hacimde ve 10 mM konsantrasyondaki EDTA'dan (Etilendiamintetraasetik asit) 3.8 g tartım alınıp, 100 mM Tris tamponu içerisinde hazırlanarak son hacim 1000 mL'ye tamamlandı. DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi 10 mM konsantrasyonda olacak şekilde 3.963 g tartım alınıp metanol içerisinde son hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı (Erel ve diğ., 2014).

3.3.3. HPLC Yönteminde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

HPLC yönteminde hareketli faz olarak kullanılmak üzere 2.5 mM konsantrasyonda pH 2.85 fosfat tampon çözeltisi hazırlandı (Güngör ve diğ., 2011).

3.3.4. Biyotiyol Çözeltilerinin Hazırlanması

N-asetil sistein (NAC), indirgenmiş glutatyon (GSH), sistein, homosistein, sisteamin çözeltileri bidistile su ile konsantrasyonları 1×10^{-3} M olacak şekilde hazırlandı.

Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) çözeltisi bidistile su ile konsantrasyonu 1×10^{-2} M olacak şekilde hazırlandı. Sistin ve homosistin çözeltileri 1×10^{-2} M konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 N HCl asit çözeltisi ile çözdürülerek bidistile su içerisinde hazırlandı. Kateşin, kafeik asit, kuersetin ve gallik asit çözeltileri konsantrasyonları 1×10^{-3} M olacak şekilde %96'lık etil alkol içerisinde hazırlandı.

3.3.5. İlaç Örneklerinin Hazırlanması

600 mg NAC (N-asetil-L- sistein) efervesan tabletlerden 1 tablet alınıp 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlandı. Asist 1200 mg NAC (N-asetil-L-sistein) toz içeren şaşelerden 1 tane alınıp 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlandı. Hazırlanan örneklere uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat, modifiye Ellman ve HPLC yöntemi uygulandı.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine x mL örnek, (1-x) mL bidistile su ve 1 mL ABTS^{•+} radikal çözeltisi ilave edilip tüpler iyice çalkalandı. Toplam hacim 2 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler ağzı kapalı olarak 60°C sıcaklıkta su banyosunda 60 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda suya karşı 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Radikalın absorbans değerinden örneğin bulunduğu çözeltinin absorbansı çıkartılarak ΔA değerleri elde edildi.

3.4.2. Modifiye Ellman Yöntemi

Native Tiyol [-SH] tayini yönteminde; deney tüpü içerisine x mL örnek, (1-x) mL bidistile su, 1mL NaCl çözeltisi, 2,2 mL Tris tamponu ve 0,2 mL DTNB çözeltisi ilave edilip tüpler iyice çalkalandı. Toplam hacim 4,4 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 420 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

Toplam Tiyol [(-SH)+(-S-S-)] yönteminde, deney tüpü içerisine x mL örnek, (1-x) mL bidistile su, 1mL NaBH₄ çözeltisi, 2,2 mL Tris tamponu ve 0,2 mL DTNB çözeltisi ilave edilip tüpler iyice çalkalandı. Toplam hacim 4,4 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda

sıcaklığında 15 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 420 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

3.4.3. HPLC Yöntemi

Tiyol grubu içeren bileşiklerin analizi için kullanılan HPLC yönteminde; metanol (A) ve 2.5 mM pH 2,85 fosfat tamponundan (B) oluşan hareketli faza gradient elüsyon programı uygulandı. Gradient elüsyon programına göre; 1. dakika % 100 B, eğim (6.0); 8. dakika % 90 B, eğim (6.0); 11. dakika % 80 B, eğim (6.0); 15. dakika % 70 B, eğim (6.0); 20. dakika % 50 B, eğim (6.0); 25. dakika % 30 B, eğim (6.0); 30. dakika % 0 B, eğim (6.0); 32. dakika % 100 B, eğim (6.0). Sistem şartları; akış hızı 1 mL dk⁻¹, enjeksiyon hacmi 20 µL, dalga boyu 215 nm’dir. Her bir biyotiyol bileşiği için kalibrasyon doğruları oluşturuldu. Sentetik karışımlar ve ilaç örneklerinin tiyol içeriklerinin tayini yapıldı.

3.4.4. Sentetik Karışımların Hazırlanması

3.4.4.1. *Biyotiyollerin İkili, Üçlü, Dörtlü Sentetik Karışımlarının Hazırlanması ve Toplam Tiyol İçeriğinin Belirlenmesi*

Biyotiyollerin ikili, üçlü ve dörtlü kombinasyonlarda sentetik karışımları hazırlandı ve bu sentetik karışımlara geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ve modifiye Ellman yöntemi uygulanarak teorik olarak beklenen ve deneysel olarak ölçülen toplam tiyol içerikleri M NAC eşdeğeri cinsinden Eşitlik 3.1 ve 3.2’e göre hesaplandı.

$$TTI_{\text{Beklenen}} = (\text{NACETI}_1.C_1 + \text{NACETI}_2.C_2 + \text{NACETI}_3.C_3) \quad (3.1)$$

(NACET₁:NAC eşdeğeri cinsinden tiyol içeriği, C: Konsantrasyon)

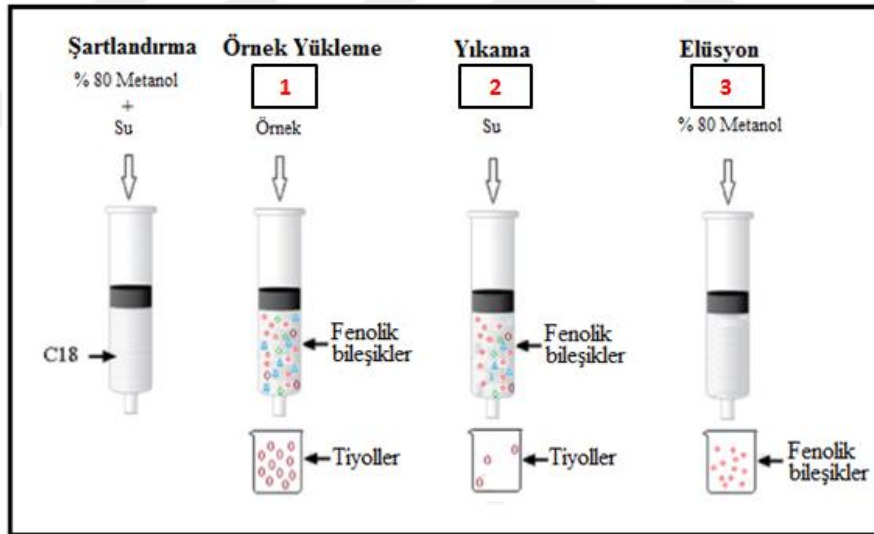
$$TTI_{\text{Deneysel}} = [(\text{Absorbans} \pm \text{kayım}) / \epsilon_{\text{NAC}}] \times 10^3 \quad (3.2)$$

3.4.4.2. Polifenolik Bileşikler Varlığında Biotiyol Karışımların Hazırlanması ve Katı Faz Ekstraksiyon İşlemi

GSH ve gallik asit içeren sentetik karışımın hazırlanması; 5×10^{-5} M GSH ve 3×10^{-5} M gallik asit içeren sentetik karışım hazırlandı.

GSSG, kafeik asit, kuersetin ve kateşin içeren sentetik karışımların hazırlanması; 1×10^{-4} M GSSG, 3×10^{-5} M kafeik asit, 1×10^{-5} M kuersetin ve 2×10^{-5} M kateşin içeren sentetik karışım hazırlandı.

Hazırlanan sentetik karışımlara ayrı ayrı katı faz ekstraksiyon işlemi uygulandı. Katı faz ekstraksiyon işlemi için C-18 kartuş kullanıldı. Öncelikle C-18 kartuş, %80 metanol ve su ile şartlandırıldı. Ardından 3 mL sentetik karışım çözeltisi C-18 kartuştan geçirildi. 3 mL bidistile su ile kartuş yıkandı. Son olarak kartuşta kalan örnekler %80 metanol ile elue edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Katı faz ekstraksiyon şeması

4. BULGULAR

4.1. GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİNİN BİYOTİYOLLERE UYGULANMASI

4.1.1. Optimum Deney Koşullarının Belirlenmesi: Box-Behnken Deney Tasarımı

Yapılan ön çalışmalar sonucunda biyotiyol bileşiklerin hassas şekilde tayin edilebilmesi için pH, sıcaklık ve zaman parametrelerinin son derece önemli olduğu ve bu parametrelerin doğru olarak belirlendiğinde ABTS reaktifinin hem sülfhidril hem de disülfür gruplarının tayininde kullanılabileceği gözlemlenmiştir. Bu çalışmada optimum deney koşullarını belirlemek için üç faktör, üç seviyeli bir yanıt yüzey yöntemi(YYY) olan Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi kullanılmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Box-Behnken tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Semboller	Seviyeler		
		-1	0	1
pH	X ₁	8	9	10
Sıcaklık	X ₂	30	45	60
Zaman	X ₃	60	150	240

Box-Behnken deneysel tasarım matrisine göre üç faktör, üç seviye ve 15 deneyli olarak 2.5×10^{-5} M konsantrasyonda yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) biyotiyol bileşiği için absorpsiyon değerleri Tablo 4.2’de görüldüğü gibidir. Bu tasarım kuadratik bir model olup deney kombinasyonları kübik modelin kenarları ve kenarların orta noktalarından oluşmaktadır. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeyini, negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri ise faktörler için orta düzeyi belirtmektedir.

Tablo 4.2: Box-Behnken deneysel tasarım matrisi

Deney no	Kodlamalar			Gerçek Değerler			GSSG Absorbans değerleri
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁
1	-1	-1	0	8	30	150	0,0000
2	1	-1	0	10	30	150	0,0598
3	-1	1	0	8	60	150	0,6121
4	1	1	0	10	60	150	0,3106
5	-1	0	-1	8	45	60	0,3558
6	1	0	-1	10	45	60	0,0738
7	-1	0	1	8	45	240	0,3587
8	1	0	1	10	45	240	0,2515
9	0	-1	-1	9	30	60	0,0063
10	0	1	-1	9	60	60	0,5697
11	0	-1	1	9	30	240	0,0535
12	0	1	1	9	60	240	0,2568
13	0	0	0	9	45	150	0,3066
14	0	0	0	9	45	150	0,3345
15	0	0	0	9	45	150	0,3545

Tablo 4.3’de kuadratik modelin regresyon parametrelerine ilişkin varyans analiz sonuçları görülmektedir. Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde F-değerinin yüksek olması ve P-değeri olarak ifade edilen olasılık değerinin 0,05’ten küçük olması gerekir. Bu çalışmada GSSG absorbans değişkeni için F-değeri 8,86 olup, bu değer yüksektir. Modele

ilişkin P-değeri 0,014 olup bu değer, düşüktür ($P < 0,05$). Buradan modelin %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4.3: Varyans analizi (ANOVA)

Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F-değeri	P-değeri
Model	9	0,477526	0,053058	8,86	0,014
Lineer	3	0,382609	0,127536	21,30	0,003
pH (X_1)	1	0,049754	0,049754	8,31	0,034
Sıcaklık (X_2)	1	0,331950	0,331950	55,45	0,001
Zaman (X_3)	1	0,000905	0,000905	0,15	0,713
Kareli	3	0,022226	0,007409	1,24	0,388
pH*pH (X_1^2)	1	0,002115	0,002115	0,35	0,578
Sıcaklık*Sıcaklık (X_2^2)	1	0,014335	0,014335	2,39	0,182
Zaman*Zaman (X_3^2)	1	0,008501	0,008501	1,42	0,287
İki yönlü etkileşimler	3	0,072691	0,024230	4,05	0,083
pH*Sıcaklık (X_1*X_2)	1	0,032634	0,032634	5,45	0,067
pH*Zaman (X_1*X_3)	1	0,007639	0,007639	1,28	0,310
Sıcaklık*Zaman (X_2*X_3)	1	0,032418	0,032418	5,42	0,067
Hata	5	0,029932	0,005986		
Uyum eksikliği	3	0,028774	0,009591	16,57	0,057
Saf hata	2	0,001158	0,000579		
Toplam	14	0,507458			

Tablo 4.4’de GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan yanıt yüzey modeline ilişkin regresyon sonuçları gösterilmektedir. GSSG bileşiği için absorbansı etkileyen parametrelerden zamanın lineer etkisinin önemsiz ($P > 0,05$) olduğu, pH ve sıcaklığın lineer etkisinin ise önemli olduğu görülmektedir ($P < 0,05$). Bu modelde yer alan bağımsız değişkenlerin bileşenlerinin VIF değerleri 10’dan küçük olduğundan dolayı GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan Box-Behnken deneysel tasarımında çoklu bağlantı problemi bulunmamaktadır.

Tablo 4.4: Yanıt yüzey modeline ilişkin regresyon katsayıları sonuçları

Terim	Katsayılar	Standart hata	T-değeri	P-değeri	VIF
Sabit	0,3319	0,0447	7,43	0,001	
pH (X ₁)	-0,0789	0,0274	-2,88	0,034	1,00
Sıcaklık (X ₂)	0,2037	0,0274	7,45	0,001	1,00
Zaman (X ₃)	-0,0106	0,0274	-0,39	0,713	1,00
pH*pH (X ₁ ²)	-0,0239	0,0403	-0,59	0,578	1,01
Sıcaklık*Sıcaklık (X ₂ ²)	-0,0623	0,0403	-1,55	0,182	1,01
Zaman*Zaman (X ₃ ²)	-0,0480	0,0403	-1,19	0,287	1,01
pH*Sıcaklık (X ₁ *X ₂)	-0,0903	0,0387	-2,33	0,067	1,00
pH*Zaman (X ₁ *X ₃)	0,0437	0,0387	1,13	0,310	1,00
Sıcaklık*Zaman (X ₂ *X ₃)	-0,0900	0,0387	-2,33	0,067	1,00

VIF: varyans şişirme çarpanı

Tablo 4.3 ve 4.4'teki regresyon istatistikleri, modelin kodlanmış faktörler açısından uyumlu olduğunu göstermektedir. Matematiksel modelin son hali denklemdaki 4.1'deki gibidir.

$$Y_{GSSG} = 0,3319 - 0,0789 \text{ pH} + 0,2037 \text{ sıcaklık} - 0,0106 \text{ zaman} - 0,0239$$

$$\text{pH}*\text{pH} - 0,0623 \text{ sıcaklık}*sıcaklık - 0,0480 \text{ zaman}*zaman - 0,0903$$

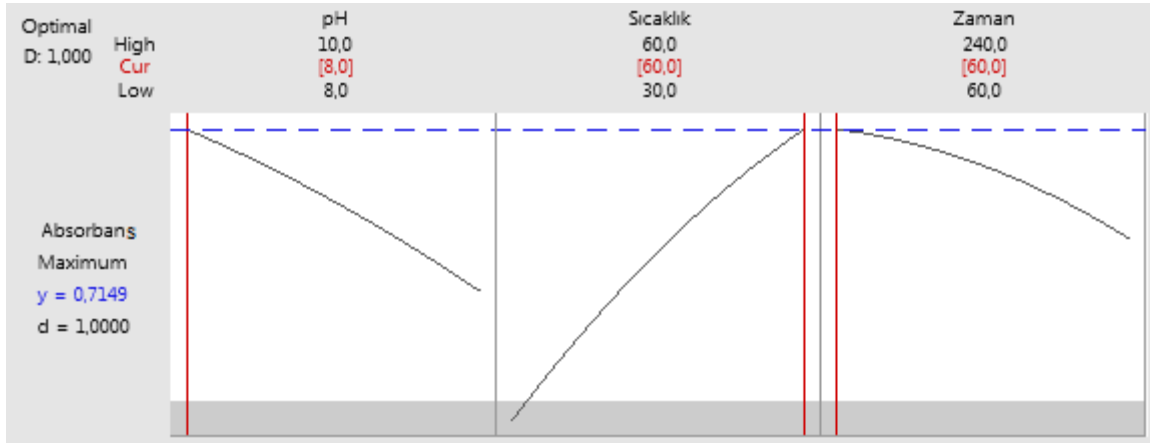
$$\text{pH}*sıcaklık + 0,0437 \text{ pH}*zaman - 0,0900 \text{ sıcaklık}*zaman \quad (4.1)$$

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi modelin R² değeri 0.9410, ayarlamalı R² değeri 0.8348 olup, bağımsız değişkenler (pH, sıcaklık ve zaman) ile GSSG absorbansı bağımlı değişkenine dayalı tahmin modeli arasındaki değişimi 0.0773 standart sapma ile açıklanabilmektedir.

Tablo 4.5: Model özet istatistikleri

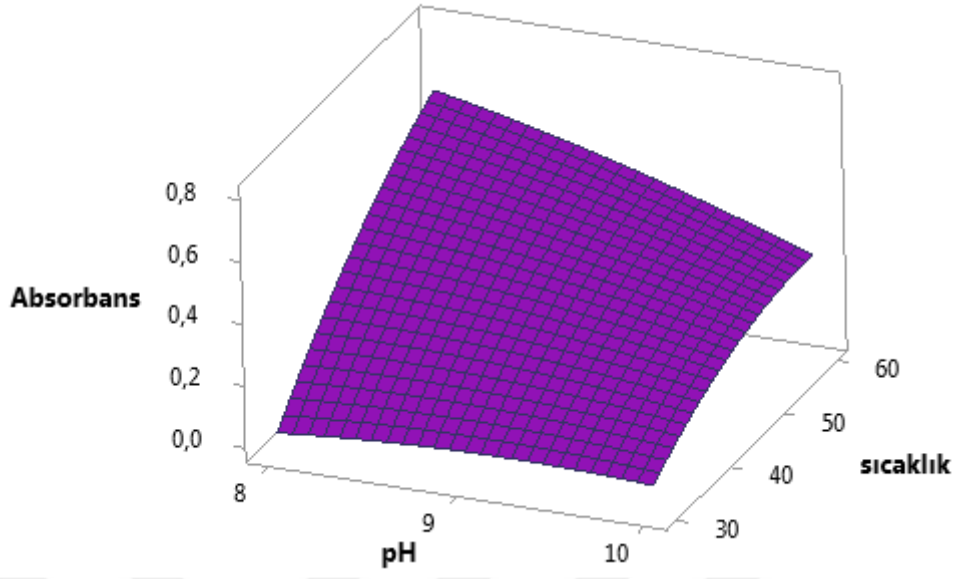
Standart Sapma	0.0773
Ortalama	0.2628
Varyasyon katsayısı	0.294
Çoklu belirleme katsayısı (R)	0.9700
R²	0.9410
Ayarlamalı R²	0.8348

GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan yanıt yüzey modeline ilişkin optimal sonuç grafiği Şekil 4.1’de görülmektedir. Box-Behnken deneysel tasarımına ait modelin maksimum noktasından elde edilen optimum sonuçlar doğrultusunda pH değeri 8, sıcaklık 60°C ve zaman 60 dakika olmalıdır.

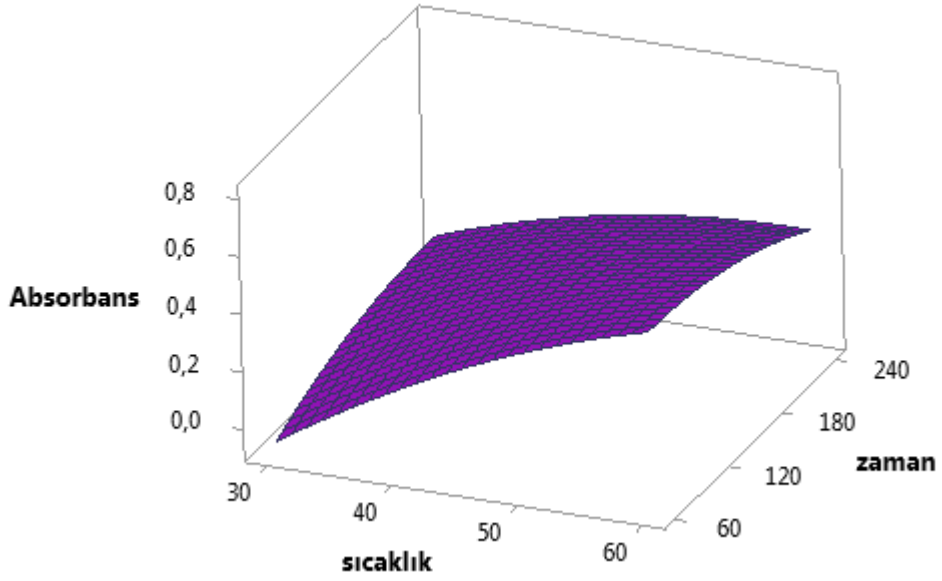


Şekil 4.1: GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan yanıt yüzey modeline göre optimal sonuç grafiği

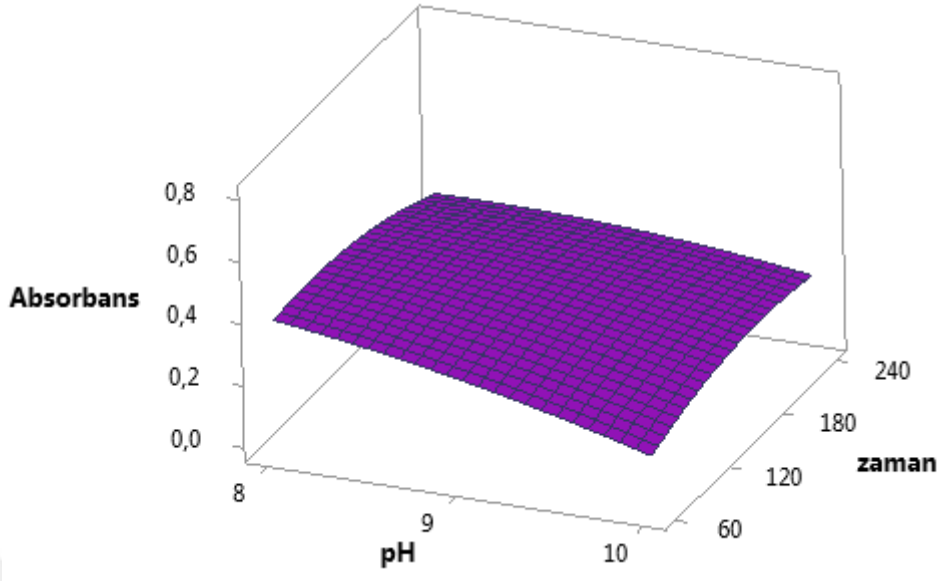
Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te görüldüğü üzere bağımsız değişkenlerin (pH, sıcaklık ve zaman) GSSG absorbans değişkeni üzerine etkileri cevap yüzey grafikleri ile üç boyutlu olarak verilmiştir.



Şekil 4.2: pH ve sıcaklık değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik



Şekil 4.3: Sıcaklık ve zaman değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik

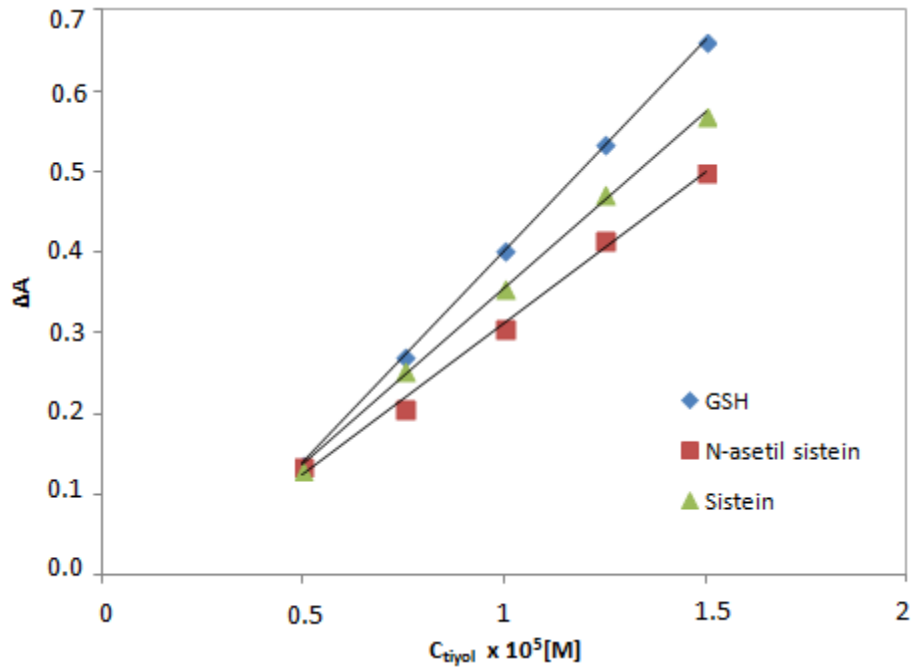


Şekil 4.4: pH ve zaman değişkenlerinin GSSG absorbansı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu grafik

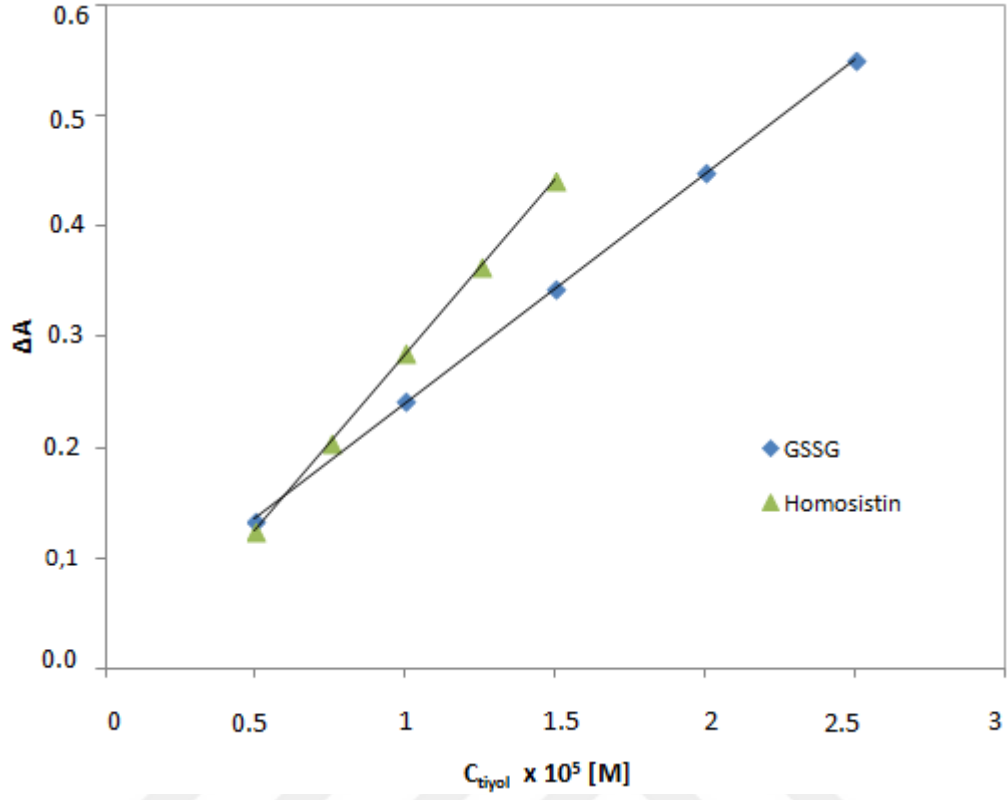
4.1.2. Biotiyollerin Kalibrasyon Grafikleri ve Görünür Bölge Spektrumlarının Eldesi

4.1.2.1. Biotiyollerin kalibrasyon grafikleri

Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi kullanılarak sülfhidril grubu (indirgenmiş glutatyon (GSH), N-asetil sistein (NAC), sistein (Cys)) içeren ve disülfür grubu (yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), homosistin (Hcyss)) içeren bazı biotiyollerin kalibrasyon grafikleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da sırasıyla görülmektedir.



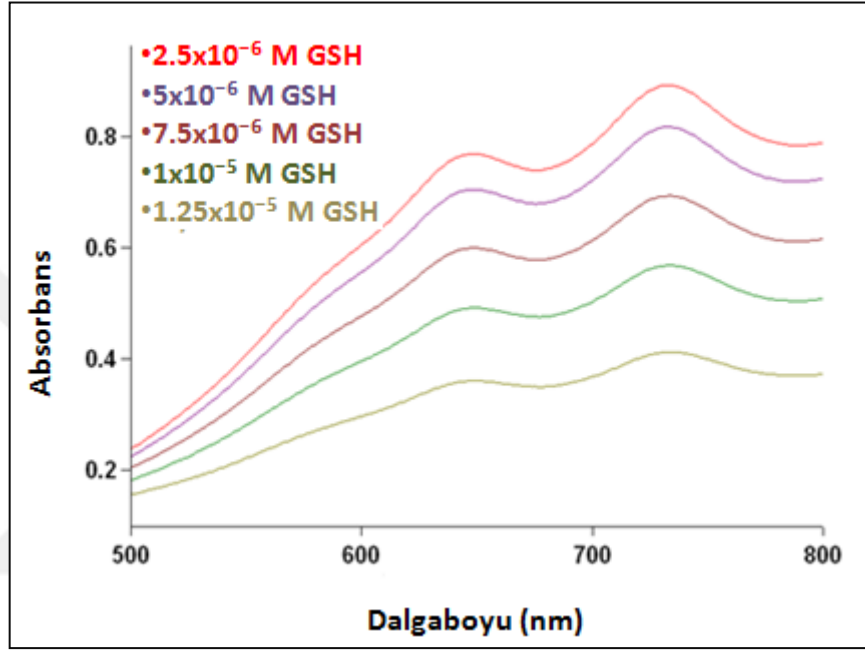
Şekil 4.5: GSH, N-asetilsistein (NAC) ve Sisteinin (Cys) geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre kalibrasyon grafikleri



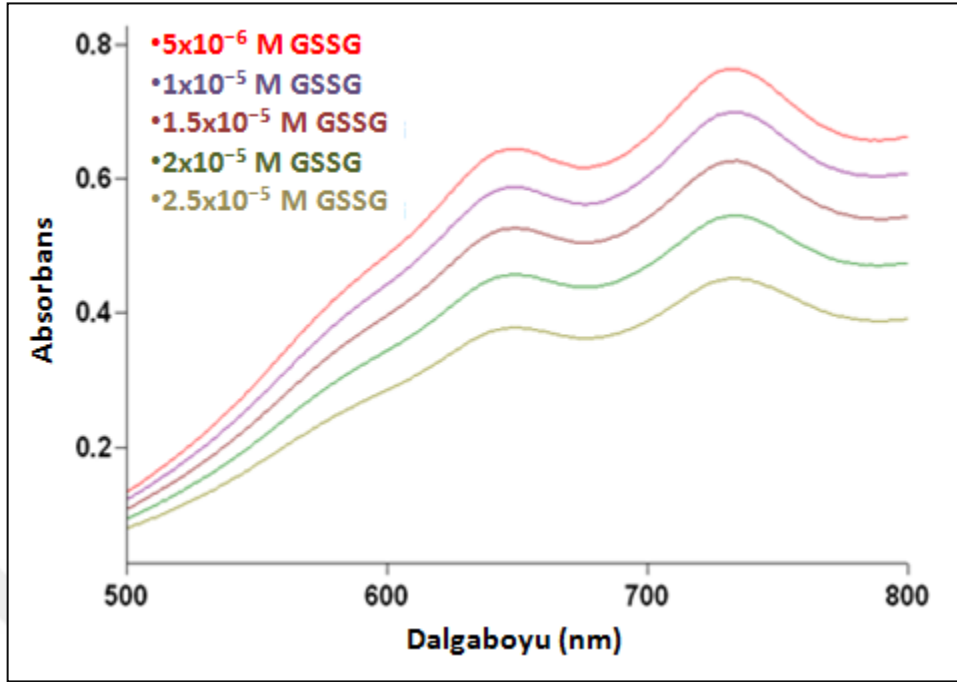
Şekil 4.6: GSSG ve Homosistin (Hcyss) geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre kalibrasyon grafikleri

4.1.2.2. Biyotiyol bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) görünür bölge spektrumlarının eldesi

Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi uygulanan biyotiyol grubu içeren bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) için görünür bölgede elde edilen spektrumlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'deki gibidir.



Şekil 4.7: GSH'nin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumu



Şekil 4.8: GSSG'nin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile elde edilen görünür bölge spektrumu

4.1.3. Biyotiyollerin Elde Edilen Molar Absorplama Katsayıları, Doğru Denklemleri, Lineer Aralıkları ve LOD Değerlerinin Belirlenmesi

Biyotiyollerin molar absorplama katsayıları (ϵ) geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları ve LOD (M) değerleri tespit edildi (Tablo 4.6). LOD değeri denklem 4.2'ye göre hesaplanmıştır. (*sbl*: blank'in standart sapması (N=3), *m*: kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.)

$$\text{LOD} = 3 \text{ sbl}/m$$

(4.2)

Tablo 4.6: Biyotiyollerin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemiyle elde edilen molar absorplama katsayıları, lineer aralıkları ve LOD değerleri

Biyotiyoller	Lineer denklem ve korelasyon katsayısı (r)	Lineer aralık (M)	LOD (M)
İndirgenmiş Glutasyon (GSH)	$y = 5.24 \times 10^4 c - 0.1229$ $r = 0.9998$	$5 \times 10^{-6} - 1.75 \times 10^{-5}$	1.30×10^{-7}
Yükseltgenmiş glutasyon (GSSG)	$y = 2.07 \times 10^4 c + 0.0329$ $r = 0.9999$	$5 \times 10^{-6} - 3.5 \times 10^{-5}$	3.29×10^{-7}
Sistein (Cys)	$y = 4.37 \times 10^4 c - 0.081$ $r = 0.9985$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	1.56×10^{-7}
Sistin (Cyss)	$y = 8.24 \times 10^3 c - 0.099$ $r = 0.9976$	$3 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-4}$	8.25×10^{-7}
Homosistein (Hcys)	$y = 2.51 \times 10^4 c - 0.0796$ $r = 0.9946$	$7.5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	2.72×10^{-7}
Homosistin (Hcyss)	$y = 3.16 \times 10^4 c - 0.0324$ $r = 0.9999$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	2.16×10^{-7}
N-asetil sistein (NAC)	$y = 3.74 \times 10^4 c - 0.0621$ $r = 0.9960$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	1.82×10^{-7}
Sisteamin	$y = 2.36 \times 10^4 c - 0.044$ $r = 0.9980$	$5 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$	2.89×10^{-7}

4.1.4. Sentetik Biotiyol Karışımların Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Tayini

İkili, üçlü ve dörtlü kombinasyonları oluşturulan sentetik biotiyol karışımların geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri bulunmuş ve % gerikazanımları hesaplanmıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Sentetik biotiyol içeren karışımların geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri

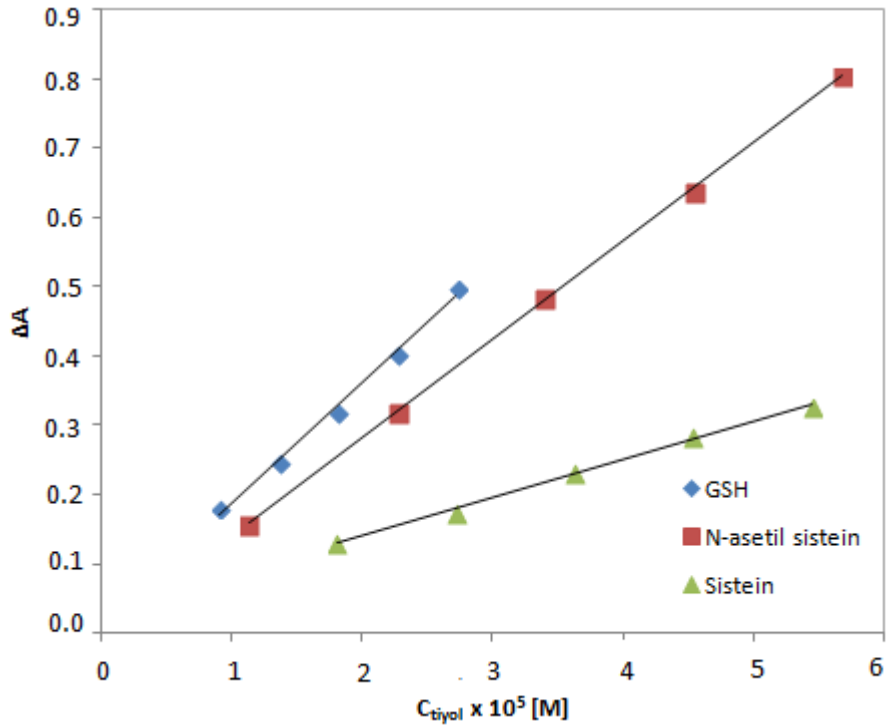
Sentetik karışımlar	Beklenen toplam tiyol içeriği (M NAC - eşdeğeri)	Bulunan toplam tiyol içeriği (M NAC - eşdeğeri)	% Geri kazanım
1 mL 2×10^{-4} M GSH 1 mL 4×10^{-4} M GSSG	1.25×10^{-5}	1.19×10^{-5}	95.2
1 mL 2×10^{-4} M GSH 1 mL 4×10^{-4} M GSSG 1 mL 2×10^{-4} M Cys	1.84×10^{-5}	1.83×10^{-5}	99.45
1 mL 4×10^{-4} M GSSG 1 mL 2×10^{-4} M NAC 1 mL 8×10^{-4} M Cyss	1.49×10^{-5}	1.43×10^{-5}	95.98
1 mL 2×10^{-4} M GSH 1 mL 4×10^{-4} M GSSG 1 mL 2×10^{-4} M NAC	1.75×10^{-5}	1.73×10^{-5}	98.85
1 mL 2×10^{-4} M CYS 1 mL 4×10^{-4} M GSSG 1 mL 2×10^{-4} M Hcys 1 mL 8×10^{-4} M Cyss	1.91×10^{-5}	1.84×10^{-5}	96.33
1 mL 4×10^{-4} M GSSG 1 mL 2×10^{-4} M Hcys 1 mL 2×10^{-4} M Cys 1 mL 2×10^{-4} M NAC	1.93×10^{-5}	1.89×10^{-5}	97.92

Relatif Hata (N=3)

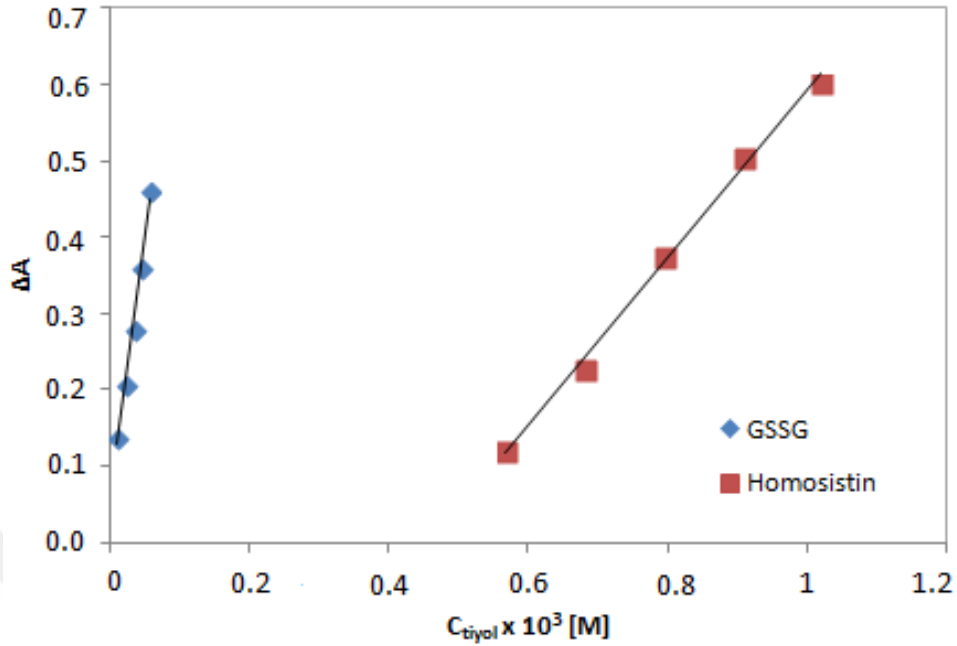
4.2. MODİFİYE ELLMAN YÖNTEMİNİN BİYOTİYOLLERE UYGULANMASI

4.2.1. Biyotiyollerin Kalibrasyon Grafikleri

Modifiye Ellman yöntemi kullanılarak sülfhidril grubu (glutatyon (GSH), N-asetil sistein (NAC), sistein (Cys)) ve disülfür grubu (glutatyon(GSSG), homosistine (Hcys)) içeren bazı biyotiyollerin kalibrasyon grafikleri sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.9: GSH, N-asetil sistein (NAC) ve Sisteinin (Cys) modifiye Ellman yöntemine göre kalibrasyon grafikleri



Şekil 4.10: GSSG ve Homosistin (Hcyss) modifiye Ellman yöntemine göre kalibrasyon grafikleri

4.2.2. Biyotiyollerin Elde Edilen Molar Absorplama Katsayıları, Doğru Denklemleri, Lineer Aralıkları ve LOD Değerlerinin Belirlenmesi

Biyotiyollerin molar absorplama katsayıları (ϵ) modifiye Ellman yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Doğru denklemleri elde edilip lineer oldukları konsantrasyon aralıkları ve LOD (M) değerleri tespit edildi (Tablo 4.8). LOD değeri denklem 4.3'e göre hesaplanmıştır. (*sbl*: blank'in standart sapması (N=3), m: kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.)

$$\text{LOD} = 3 \text{ sbl}/m$$

(4.3)

Tablo 4.8: Biotiyollerin modifiye Ellman yöntemiyle elde edilen molar absorplama katsayıları, lineer aralıkları ve LOD değerleri

Biotiyoller	Lineer denklem ve korelasyon katsayısı (r)	Lineer aralık (M)	LOD (M)
Glutasyon (GSH)	$y = 1.73 \times 10^4 c + 0.0142$ $r = 0.9950$	$4.54 \times 10^{-6} - 3.18 \times 10^{-5}$	9.3×10^{-7}
Yükseltgenmiş Glutasyon (GSSG)	$y = 7.01 \times 10^3 c + 0.050$ $r = 0.9953$	$1.13 \times 10^{-5} - 7.95 \times 10^{-5}$	2.3×10^{-6}
Sistein (Cys)	$y = 5.53 \times 10^3 c - 0.0297$ $r = 0.9974$	$1.81 \times 10^{-5} - 5.45 \times 10^{-5}$	2.90×10^{-6}
Sistin (Cyss)	$y = 8.57 \times 10^3 c - 0.0037$ $r = 0.9969$	$2.27 \times 10^{-4} - 1.13 \times 10^{-3}$	1.88×10^{-5}
Homosistein (Hcys)	$y = 1.08 \times 10^4 c - 0.0076$ $r = 0.9980$	$1.13 \times 10^{-5} - 1.13 \times 10^{-3}$	1.48×10^{-6}
Homosistin (Hcyss)	$y = 1.04 \times 10^3 c - 0.4686$ $r = 0.9944$	$5.68 \times 10^{-4} - 1.77 \times 10^{-3}$	1.55×10^{-5}
N-asetil sistein (NAC)	$y = 1.41 \times 10^4 c + 0.0014$ $r = 0.9999$	$1.13 \times 10^{-5} - 7.95 \times 10^{-5}$	1.14×10^{-6}
Sisteamin	$y = 1.29 \times 10^4 c + 0,0027$ $r = 0.9996$	$1.13 \times 10^{-5} - 9.09 \times 10^{-5}$	1.25×10^{-6}

4.2.3. Sentetik Biotiyol Karışımların Modifiye Ellman Yöntemi İle Tayini

İkili, üçlü ve dörtlü kombinasyonları oluşturulan sentetik biotiyol karışımların geliştirilen modifiye Ellman yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri bulunmuş ve % gerikazanımları hesaplanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4. 9: Sentetik biotiyol içeren karışımların modifiye Ellman yöntemine göre M N-asetil sistein (NAC) eşdeğeri cinsinden teorik olarak beklenen ve deneysel olarak bulunan toplam tiyol içerikleri

Sentetik karışımlar	Beklenen toplam tiyol içeriği (M NAC -eşdeğeri)	Bulunan toplam tiyol içeriği ((M NAC-eşdeğeri)	% Geri kazanım
1 mL 8×10^{-4} M GSH 1 mL 5×10^{-4} M GSSG	1.40×10^{-5}	1.44×10^{-5}	97.15
1 mL 8×10^{-4} M GSH 1 mL 5×10^{-4} M GSSG 1 mL 10^{-3} M Cys	1.84×10^{-5}	1.39×10^{-5}	124.45
1 mL 5×10^{-4} M GSSG 1 mL 5×10^{-4} M NAC 1 mL 10^{-3} M Cyss	8.83×10^{-6}	1.07×10^{-5}	78.83
1 mL 8×10^{-4} M GSH 1 mL 5×10^{-4} M GSSG 1 mL 5×10^{-4} M NAC	1.97×10^{-5}	2.06×10^{-5}	95.44
1 mL 10^{-3} M Cys 1 mL 5×10^{-4} M GSSG 1 mL 10^{-3} M Hcys 1 mL 10^{-3} M Cyss	2.02×10^{-5}	1.63×10^{-5}	123.90
1 mL 5×10^{-4} M GSSG 1 mL 10^{-3} M Hcys 1 mL 10^{-3} M Cys 1 mL 5×10^{-4} M NAC	2.25×10^{-5}	1.89×10^{-5}	116

Relatif hata (N=3)

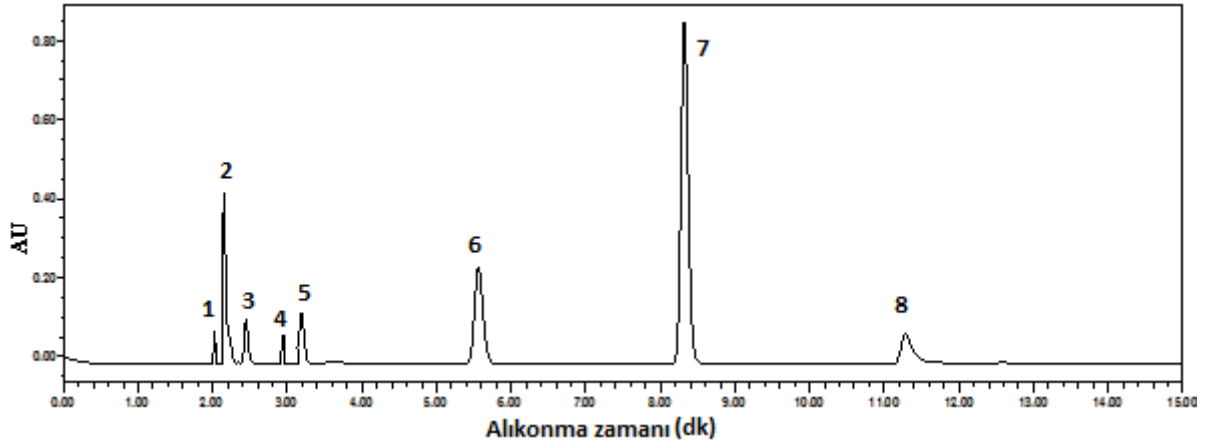
4.3. BİYOTİYOLLERİN HPLC YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

4.3.1. Biyotiyollerin Kalibrasyon Denklemlerinin Oluşturulması

Biyotiyol bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), N-asetil sistein (NAC), sistein (Cys), sistin (Cyss), homosistein (Hcys), homosistin (Hcyss) ve sisteaminin HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve alıkonma zamanları (t_R) aşağıdaki Tablo 4.10'da görülmektedir. GSH, GSSG, NAC, Cys, Cyss, Hcys, Hcyss ve Sisteamin standardının HPLC kromatogramı Şekil 4.11'deki gibidir.

Tablo 4.10: GSH, GSSG, NAC, Cys, Cyss, Hcys, Hcyss ve Sisteaminin HPLC yöntemi ile elde edilen doğru denklemleri ve alıkonma zamanları (y:pik alanı; c: molar konsantrasyon)

Biyotiyol Bileşikleri	t_R (dakika)	Doğru Denklemi
GSH	5.54	$y = 2 \times 10^9 c - 5637,9$ $r = 0,9997$
GSSG	8.20	$y = 6 \times 10^9 c - 0,708$ $r = 0,9999$
NAC	11.28	$y = 9 \times 10^8 c - 23787$ $r = 0,9921$
Cys	2.45	$y = 4 \times 10^8 c + 15868$ $r = 0,9984$
Cyss	2.20	$y = 1 \times 10^9 c + 136828$ $r = 0,9965$
Hcys	3.19	$y = 4 \times 10^8 c - 3005.1$ $r = 0,9990$
Hcyss	3.05	$y = 9 \times 10^8 c - 11813$ $r = 0,9989$
Sisteamin	2.03	$y = 2 \times 10^8 c + 8347.9$ $r = 0,9982$

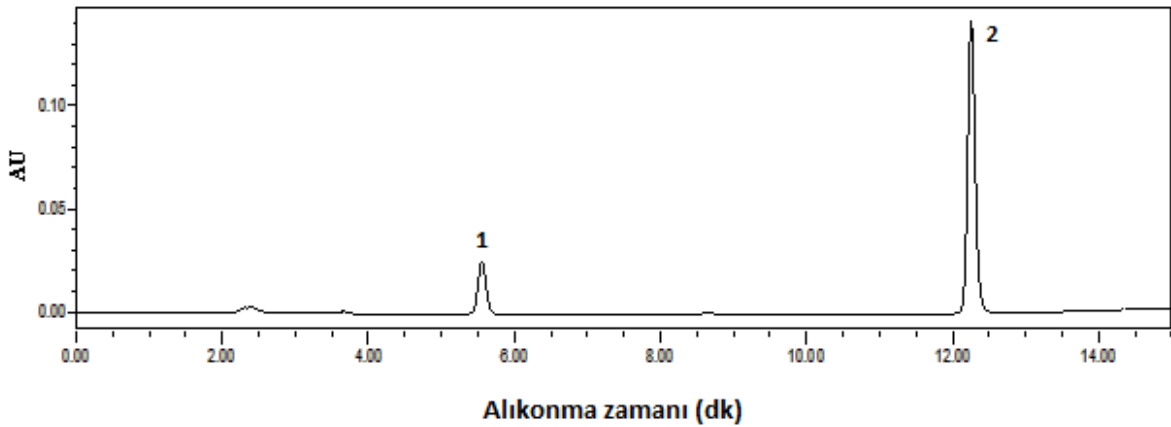


Şekil 4.11: 1.0×10^{-3} M konsantrasyondaki Sisteamin (1), sistin (2), sistein (3), homosistin (4), homosistein (5), indirgenmiş glutatyon (6), yükseltgenmiş glutatyon (7) ve N-asetil sistein (8) standartlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramları

4.4. POLİFENOLİK BİLEŞİKLER VARLIĞINDA BİYOTİYOLLERİN GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

4.4.1. Glutasyon (GSH) ve Gallik Asit İçeren Sentetik Karışımın Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Analizi ve Sonuçların HPLC Yöntemi İle Karşılaştırılması

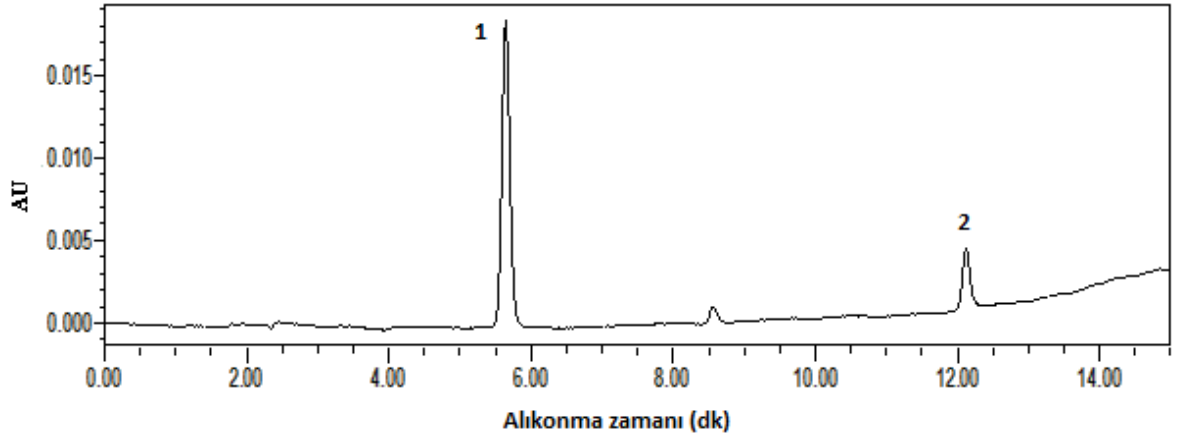
Polifenolik bileşiklerden gallik asit varlığında glutasyon (GSH) tayini yapılmıştır. Öncelikle HPLC yöntemi ile gallik asit ve GSH karışımı analiz edildi. Analiz sonucu elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.12’de, alıkonma zamanı ve molar konsantrasyonu Tablo 4.11’de görülmektedir. Ardından GSH ve gallik asit içeren karışım çözeltisini birbirinden ayırmak için malzeme ve yöntem 3.4.4.2’de anlatıldığı gibi katı faz ekstraksiyon işlemi uygulandı. C-18 kartuş kullanılarak yapılan katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası karışım çözeltilerinin HPLC kromatogramı Şekil 4.13’de ve alıkonma zamanı ve molar konsantrasyon değeri Tablo 4.11’de verilmiş olup ayırmanın hangi oranda gerçekleştiği tespit edildi. GSH ve gallik asit karışımında, GSH bileşiğinin % 83’ününün C-18 kartuştan geçtiği molar konsantrasyon değerlerinden hesaplandı. HPLC yöntemi ile elde edilen değerler, geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile elde edilen değerlerle karşılaştırılarak geri kazanım % 102.89 olarak bulundu (Tablo 4.12).



Şekil 4.12: 5×10^{-5} M GSH (1) ve 3×10^{-5} M gallik asit (2) karışımının 215 nm’deki HPLC kromatogramı

Tablo 4.11: GSH (1) ve gallik asit (2) içeren karışımın katı faz ekstraksiyon öncesi ve katı faz ekstraksiyon sonrası elde edilen alıkonma zamanları (dk) ve molar konsantrasyon değerleri

Sentetik karışım	Alıkonma zamanı (dk)	Konsantrasyon (M)
GSH (katı faz ekstraksiyon işlemi öncesi)	5.55	5.01×10^{-5}
GSH (katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası)	5.64	4.16×10^{-5}



Şekil 4.13: Katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası 5×10^{-5} M GSH (1) ve 3×10^{-5} M gallik asit (2) karışımının 215 nm'deki HPLC kromatogramı

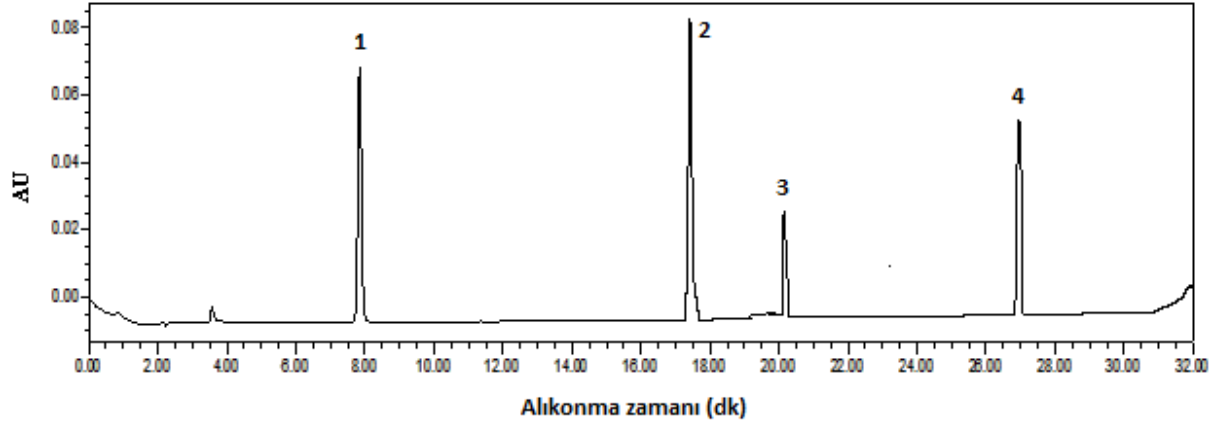
Tablo 4.12: GSH içeren sentetik karışımın beklenen konsantrasyon değeri ve modifiye ABTS-Persülfat ve HPLC yöntemine göre bulunan konsantrasyon değerleri

Sentetik Karışım	Beklenen konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	% Gerikazanım
GSH	5 x10 ⁻⁵	4.27x10 ⁻⁵	4.15x10 ⁻⁵	102.89

Gerikazanım (N=3)

4.4.2. Yükseltgenmiş Glutatyon (GSSG), Kafeik asit, Kateşin ve Kuersetin İçeren Sentetik Karışımın Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Analizi ve Sonuçların HPLC Yöntemi İle Karşılaştırılması

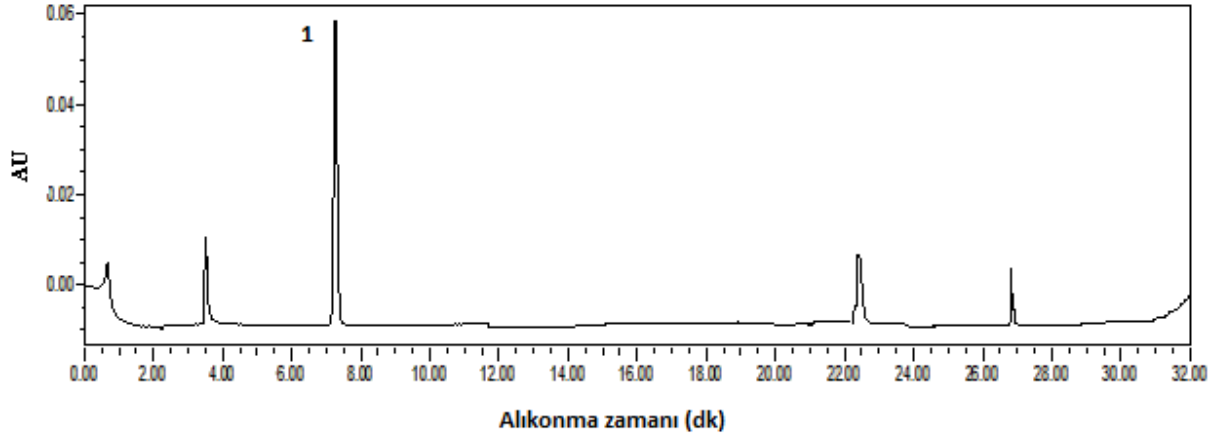
Polifenolik bileşikler olan kafeik asit, kuersetin ve kateşin varlığında yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) tayin edilmiştir. Öncelikle HPLC yöntemi ile karışım analiz edildi ve HPLC kromatogramı Şekil 4.14’de, alıkonma zamanı ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.13’de görülmektedir. Ardından GSSG bileşimini, polifenolik bileşiklerden (kafeik asit, kuersetin ve kateşin) ayırmak için malzeme ve yöntem 3.4.4.2’de anlatıldığı gibi katı faz ekstraksiyon işlemi uygulandı. C-18 kartuş kullanılarak yapılan katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası karışım çözeltilerinin HPLC kromatogramı (Şekil 4.15) ve GSSG bileşimine ait alıkonma zamanı ve konsantrasyon değerleri Tablo 4.13’de verilmiş olup ayırmanın hangi oranda gerçekleştiği tespit edilmiştir. GSSG ve polifenolik bileşik olan kafeik asit, kuersetin ve kateşin karışımında, glutatyon (GSSG) bileşiminin %85.2’sinin C-18 kartuştan geçtiği molar konsantrasyon değerlerinden hesaplandı. HPLC yöntemi ile elde edilen değerler, geliştirilen modifiye ABTS yöntemi ile elde edilen değerlerle karşılaştırılarak gerikazanım % 104.34 olarak bulundu (Tablo 4.14).



Şekil 4.14: 1.0×10^{-4} M GSSG (1), 2.0×10^{-5} M kateşin (2), 3.0×10^{-5} M kafeik asit (3) ve 1.0×10^{-5} M kuersetin (4) karışımlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramı

Tablo 4.13: GSSG, kateşin, kafeik asit ve kuersetin karışımlarının alıkonma zamanları ve konsantrasyon (M) değerleri

Sentetik karışım	Alıkonma zamanı (dk)	Konsantrasyon (M)
GSSG (katı faz ekstraksiyon öncesi)	7.847	1.0×10^{-4}
GSSG (katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası)	7.623	8.52×10^{-5}



Şekil 4.15: Katı faz ekstraksiyon işlemi sonrası 1.0×10^{-4} M GSSG (1), 2.0×10^{-5} M kateşin, 3.0×10^{-5} M kafeik asit ve 1.0×10^{-5} M kuersetin karışımlarının 215 nm'deki HPLC kromatogramı

Tablo 4.14: GSSG içeren sentetik karışımın beklenen konsantrasyon değeri, geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat ve HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değerleri

Sentetik Karışım	Beklenen konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	% Gerikazanım
GSSG	1×10^{-4}	8.89×10^{-5}	8.52×10^{-5}	104.34

Gerikazanım ($N=3$)

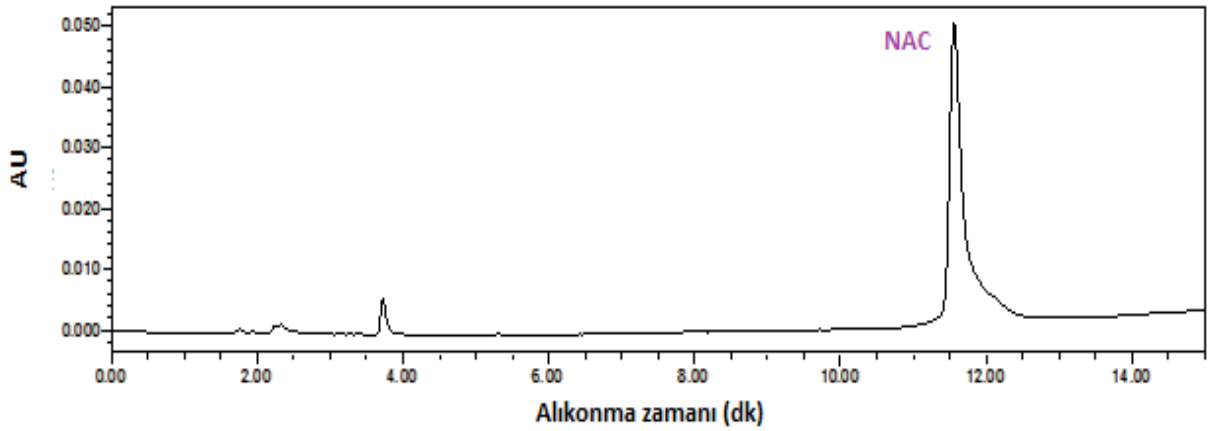
4.5. İLAÇ ÖRNEKLERİNİN ANALİZİ

4.5.1. NAC Efervesan Tabletın Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Analizi ve Referans Yöntemler İle Karşılaştırılması

600 mg N-asetil sistein içeren NAC efervesan tablet 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 5×10^{-5} M olacak şekilde seyreltilerek geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi uygulanmıştır.

600 mg N-asetil sistein içeren NAC efervesan tablet 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 5×10^{-4} M olacak şekilde seyreltilerek modifiye Ellman yöntemi uygulanmıştır.

600 mg N-asetil sistein içeren NAC efervesan tablet 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 6×10^{-4} M olacak şekilde seyreltilerek HPLC enjeksiyonu yapılmıştır. 600 mg NAC efervesan tabletin HPLC kromatogramı Şekil 4.16'da görülmektedir.



Şekil 4.16: 600 mg NAC efervesan tabletin 215 nm'deki HPLC kromatogramı ($t_R = 11.65$)

Tablo 4.15'de analiz edilen 600 mg NAC efervesan tablet ilaç örneğinde bulunması beklenen NAC konsantrasyon değeri ile geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi, modifiye Ellman yöntemi ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan NAC konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 4.15: 600 mg NAC efervesan tabletin bulunması beklenen konsantrasyon değeri ve geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat, modifiye Ellman ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan konsantrasyon değerleri

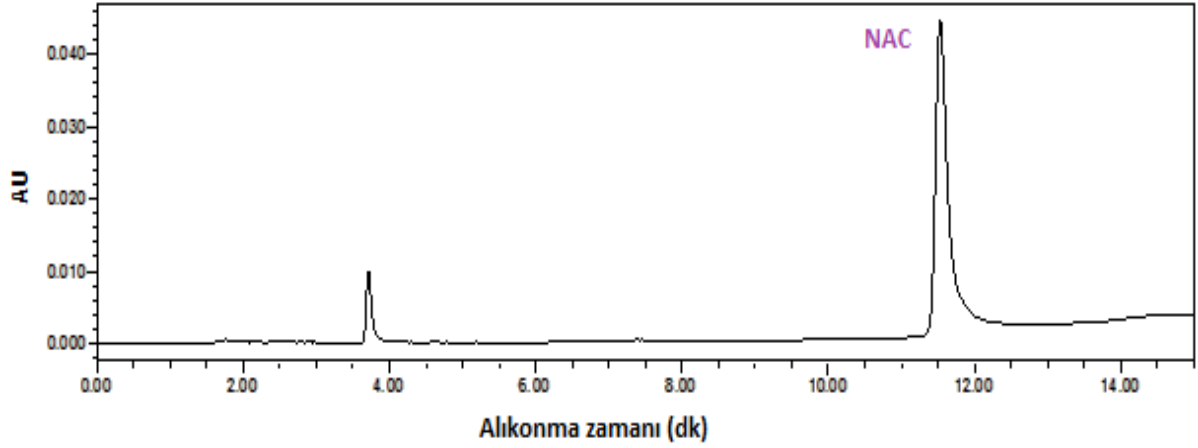
İlaç örneği	Beklenen konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	Modifiye Ellman yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)	HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L ⁻¹)
600 mg NAC efervesan tablet	3.67×10^{-2}	3.70×10^{-2}	3.55×10^{-2}	3.58×10^{-2}

4.5.2. Asist 1200 mg NAC Tozu İçeren Şaşenin Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat Yöntemi İle Analizi ve Referans Yöntemler İle Karşılaştırılması

Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren şaşeden 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 5×10^{-5} M olacak şekilde seyreltilerek geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi uygulanmıştır.

Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren şaşeden 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 5×10^{-4} M olacak şekilde seyreltilerek modifiye Ellman yöntemi uygulanmıştır.

Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren şaşeden 100 mL bidistile su ile çözüldükten sonra son konsantrasyonu 6×10^{-4} M olacak şekilde seyreltilerek HPLC enjeksiyonu yapılmıştır. Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren şaşenin HPLC kromatogramı Şekil 4.17'de görülmektedir.



Şekil 4.17: Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren saşenin 215 nm'deki HPLC kromatogramı ($t_R = (11.53)$)

Tablo 4.16'de analiz edilen Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren saşe ilaç örneğinde bulunması beklenen NAC konsantrasyon değeri ile geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi, modifiye Ellman yöntemi ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan NAC konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması görülmektedir.

Tablo 4.16: Asist 1200 mg N-asetil sistein tozu içeren saşe ilaç örneğinde bulunması beklenen konsantrasyon değeri ve geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat, modifiye Ellman ve HPLC yöntemine göre deneysel olarak bulunan konsantrasyon değerleri

İlaç örneği	Beklenen konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	Geliştirilen Modifiye ABTS-Persülfat yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	Modifiye Ellman yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L^{-1})	HPLC yöntemi ile bulunan konsantrasyon değeri (mol L^{-1})
Asist 1200 mg NAC toz saşe	7.35×10^{-2}	7.33×10^{-2}	7.39×10^{-2}	7.54×10^{-2}

4.6. GELİŞTİRİLEN MODİFİYE ABTS-PERSÜLFAT YÖNTEMİNDE SENTETİK SERUM ÖRNEĞİNE STANDART KATKI YAPILMASI

4.6.1. Sentetik Serum Örneğine GSH ve GSSG Standart Katkı Yapılması

0.2:100 (v/v) oranında seyreltilmiş sentetik serum örneğine ayrı tüplerde 5.0×10^{-6} M GSH standart çözeltisinden 0.2 mL hacimde ve 1.0×10^{-5} M GSSG standart çözeltisinden 0.2 mL hacimde eklenerek geliştirilen modifiye ABTS-persülfat yöntemi uygulanmıştır.

Tablo 4.17: Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminin doğruluğu ve kesinliği

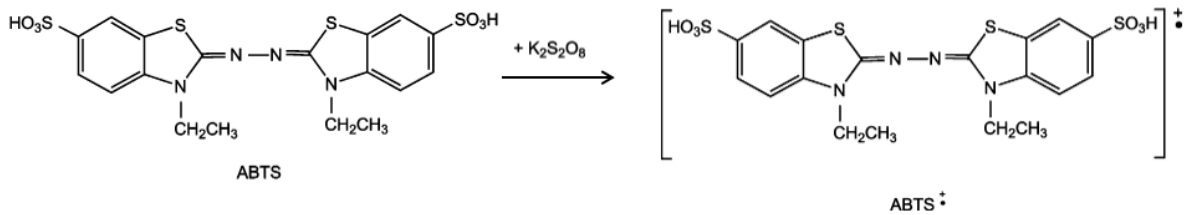
Biyotiyoller	Eklene konsantrasyon (M)	Ortalama (M)	Standart sapma	Bağlı standart sapma	% Gerikazanım
Sentetik serum örneğine GSH katkısı	5.0×10^{-6}	5.02×10^{-6}	0.0040	0.079	100.4
Sentetik serum örneğine GSSG katkısı	1.0×10^{-5}	1.01×10^{-5}	0.00047	0.046	101

Bağlı standart sapma ($N=3$); Gerikazanım ($N=3$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, sülfhidril grubu (indirgenmiş glutatyon, N-asetil sistein, sistein, homosistein, sisteamin) ve disülfür grubu (yükseltgenmiş glutatyon, sistin, homosistin) içeren biyotiyollerin, sentetik karışımlarda ve ilaç örneklerinde toplam tiyol içeriklerinin tayini için spektrofotometrik yolla ölçülebilen modifiye ABTS-persülfat yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, referans yöntem olarak kullanılan spektrofotometrik modifiye Ellman yöntemi ve HPLC yöntemi ile karşılaştırılmıştır.

ABTS^{•+} radikal kasyonu, Miller ve diğ. tarafından trolox eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilen TEAC/ABTS yönteminde kullanılmaktadır (Miller ve diğ., 1993). Orijinal yöntemde ABTS^{•+} radikal kasyonu, H₂O₂ ile metmiyoglobinin reaksiyonu sonucu oluşan ferrimiyoglobinin ile ABTS arasındaki etkileşimden meydana gelmektedir. Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde ise ABTS molekülünün potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} radikal kasyonu oluşmaktadır (Şekil 5.1). Bu metodun orijinal metoddan farkı hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan tayininde kullanılabilir olması ve bir renk giderimi yöntemi olmasıdır. Oluşturulan ABTS^{•+} radikal kasyon oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. ABTS^{•+} radikal kationunun karakteristik absorpsiyon spektrumu 660, 734, 820 nm'de maksimum vermektedir (Re ve diğ. 1999). Bir diğer Walker ve Everette tarafından modifiye edilen yöntemde ise, ABTS molekülünün sodyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS^{•+} radikal kasyonu oluşmaktadır (Walker ve Everette, 2009).



Şekil 5.1: ABTS radikal kationunun oluşumu

Literatürde TEAC/ABTS yöntemi kullanılarak sülfhidril grubu içeren tiyollerin (R-SH: GSH, Cys, Hcys, NAC, Sisteamin) antioksidan kapasitelerini içeren birçok çalışma bulunmakla birlikte, disülfür grubu içeren tiyol bileşiklerin (R-S-S-R: GSSG, Cyss, Hcyss) ABTS radikali ile reaksiyona girmemesinden dolayı antioksidan kapasite tayinleri yapılamamıştır

(Aliaga ve Lissi 2000). Aliaga ve Lissi tarafından yapılan çalışmada, ABTS radikalinin amino asitler ile reaksiyon kinetiği ve mekanizması incelenmiş ve en yüksek hız sabiti sistein (R-SH) için bulunmuştur. Aynı çalışmada sistinin(R-S-S-R) 1 saatlik zaman diliminde hiç ABTS radikali tüketmediği, yani ABTS ile reaksiyona girmediği belirtilmiştir. Walker ve Everette tarafından yapılan bir başka çalışmada ise ABTS radikal katyonunun yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) karşı yavaş reaksiyon kinetiği ile reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir (Walker ve Everette, 2009).

Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi için yapılan ön çalışmalarda ve literatür çalışmalarında pH, sıcaklık ve zaman parametrelerinin biyotiyol bileşiklerinin tayininde önemli rol oynadığı görülmüştür (Zheng ve diğ., 2016). ABTS reaktifinin sıcaklık, pH ve zaman parametrelerinin doğru bir şekilde belirlemek ve sülfhidril ve disülfür gruplarını içeren bileşiklerin en hassas şekilde tayin edebilmek için optimum deney koşulları belirlenmiştir. Optimum deney koşullarının belirlenmesinde, istatistiksel deney tasarım yöntemlerinden biri olan yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Tablo 4.1'de görüldüğü üzere yanıt yüzey yöntemlerinden üç ya da daha fazla faktöre sahip ikinci dereceden yanıt yüzey modeli olan Box-Behnken tasarım yöntemi kullanılmıştır. Box-Behnken deneysel tasarım matrisine göre üç faktör, üç seviye ve 15 deneyli olarak yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) biyotiyol bileşiği için absorbans değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.2). Tablo 4.3'te varyans analiz sonuçları ile Tablo 4.4'te GSSG absorbans değişkeni için oluşturulan yanıt yüzey modeline ilişkin regresyon sonuçlarına göre; GSSG bileşiği için, P değerlerine baktığımızda absorbansı etkileyen parametrelerin lineer etkisinin sırasıyla sıcaklık, pH ve zaman olduğu görülmüştür. Modele ilişkin P-değeri 0.014 bulunmuş ve bu modelin % 95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmaktadır. Modelin R^2 değeri 0.9410, ayarlamalı R^2 değeri 0.8348 olup, bağımsız değişkenler (pH, sıcaklık ve zaman) ile GSSG absorbansı bağımlı değişkenine dayalı tahmin modeli arasındaki değişim 0.2628 standart sapma ile açıklanmıştır (Tablo 4.5). GSSG absorbans değişkeni için, Box-Behnken deneysel tasarımına ait modelin, maksimum noktasından elde edilen optimum sonuçlar doğrultusunda pH 8, sıcaklık 60°C ve zaman 60 dakika bulunmuştur (Şekil 4.1). Box-Behnken deneysel tasarım modeline göre yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) için elde edilen optimum deney koşulları, spektrofotometrik olarak geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminde diğer indirgenmiş glutatyon, N-asetil sistein, sistein, sistin, homosistein, homosistin ve sisteamin biyotiyol bileşiklerine uygulanmıştır. Tablo 4.6'da biyotiyollerin geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemiyle

elde edilen molar absorplama katsayıları, korelasyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve LOD değerleri belirlenmiştir. Biotiyollerin molar absorplama katsayıları incelendiğinde en yüksek indirgenmiş glutatyonun ($52400 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ve en düşük ise sistinin ($8240 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bulunmuştur. Bu ise bileşiğin yapısındaki indirgenmiş form ($-\text{SH}$ grubu) ne kadar fazla olursa bileşiğin o kadar güçlü antioksidan etki gösterdiği teorisini doğrulamaktadır (Atmaca, 2004). Güngör ve diğ. tarafından yapılan çalışmada, biyotiyollere ABTS-Persülfat yöntemi uygulanmış ve sülfhidril grubu içeren indirgenmiş glutatyon, sistein, homosistein, sisteamin ve N-asetil sistein doğrudan tayin edilebilmiş, fakat disülfür grubu içeren yükseltgenmiş glutatyon sistin ve homosistin bileşikleri yapılarındaki $-\text{SS}$ grubundan dolayı doğrudan tayini edilememiş ve ancak Zn/HCl indirgeme yöntemiyle glutatyon (GSH), sistein ve homosisteine indirgenildiğinde tayini yapılabilmektedir (Güngör ve diğ., 2011).

Referans yöntemlerden biri olarak kullanılan Erel ve diğ. tarafından geliştirilen ‘‘Modifiye Ellman Yöntemi’’ biyotiyol bileşiklere uygulanmıştır. Tablo 4.8’de biyotiyollerin molar absorplama katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve LOD değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değeri ile biyotiyol konsantrasyonu arasında çizilen grafiğin eğiminden ilgili biyotiyol bileşiğine ait molar absorplama katsayısı ($\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) hesaplanmıştır. Molar absorplama katsayılarına baktığımızda en yüksek indirgenmiş glutatyon ($17300 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) ve en düşük ise sistein ($5530 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) olarak bulunmuştur. Sonuçları geliştirilen modifiye ABTS yöntemi ile karşılaştırdığımızda, modifiye Ellman yönteminde biyotiyollerin molar konsantrasyonları ve LOD değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür.

Çalışılan biyotiyol grubu içeren bileşiklerden bazıları ikili, üçlü ve dörtlü sentetik karışımlar elde etmek için kullanılmıştır. Bu bileşiklerin sentetik çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda çeşitli karışımlar oluşturulmuştur. Hazırlanan sentetik karışımlara geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yöntemi uygulandığında teorik olarak beklenen toplam tiyol içeriği değerleri ile deneysel olarak bulunan toplam tiyol içeriği değerlerinin M N-asetil sistein eşdeğeri cinsinden birbiri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Sülfhidril grubu içeren GSH ile disülfür grubu içeren GSSG sentetik karışımında gerikazanımın % 95.20 olduğu görülmüştür. Üçlü sentetik karışımlarda geri kazanım değeri % 99.45 ile % 95.48, dörtlü sentetik karışımlarda ise % 97.92 ile % 96.33 arasında bulunmuştur (Tablo 4.7).

Hazırlanan sentetik karışımlara modifiye Ellman yöntemi uygulandığında teorik olarak beklenen toplam tiyol içeriği değerleri ile deneysel olarak bulunan toplam tiyol içeriği değerleri M N-asetil sistein eşdeğeri cinsinden Tablo 4.9'da verilmiştir. İkili karışım (GSH+GSSG) ve üçlü karışım (GSH+GSSG+NAC) için teorik toplam tiyol içerikleri ile deneysel olarak bulunan toplam tiyol içeriklerinin uyumlu olduğu gözlenmiştir. Diğer üçlü karışım ve dörtlü karışımlara bakıldığında ise geri kazanım % 124.45 ile % 78.83 arasında bulunmuştur. (Tablo 4.9).

Sonuç olarak, her iki yöntem ile elde edilen ϵ (molar absorplama katsayısı) değerlerine bakıldığında geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminin, modifiye Ellman yönteminden tiyol içeriği tayininde daha hassas olduğu söylenebilir. LOD değerleri $LOD = 3 \text{ sbl/m}$ eşitliğine göre hesaplanarak, geliştirilen modifiye ABTS yöntemine göre $1.30 \times 10^{-7} \text{ M}$ ile $8.25 \times 10^{-7} \text{ M}$ aralığında, modifiye Ellman yönteminde ise 9.3×10^{-7} ile $1.55 \times 10^{-5} \text{ M}$ aralığında bulunmuştur. Modifiye Ellman yönteminde; sülfhidril gruplarının tayini, DTNB reaktifinin tiyoller ile reaksiyonu sonucu oluşan TNB'ye dönüşerek 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak doğrudan ölçülmesiyle bulunmuştur. Fakat disülfür grubu içeren bileşikler sodyum borhidrür ile sülfhidril gruplarına indirgenmiş ve kalan sodyum borhidrürün uzaklaştırılması için formaldehit ilavesi yapılmıştır. Yapılan çalışmada sonuçların tutarsız olma sebebinin, indirgenmeden kaynaklandığı ve formaldehitin sodyum borhidrürü ortamdan uzaklaştırması için yeterli olmadığı görülmüştür. Trezl ve diğ., tarafından yapılan çalışmada, formaldehitin tiyol bileşikleri ile reaksiyona girdiğini ve reaksiyon sonucunda kararsız S-hidroksimetil ve kararlı -S-CH₂-NH- fonksiyonel grupları içeren ürünler oluşturduğu belirtilmiştir (Trezl ve diğ. 1988).

Referans yöntemlerden biri olarak kullanılan HPLC yöntemi ile analizi yapılan biyotiyol bileşiklerden indirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), N-asetil sistein (NAC), sistein (CYS), sistin (CYSS), homosistein (HCYS), homosistin (HCYSS) ve sisteaminin HPLC kromatogramları, alıkonma zamanları (dk) Şekil 4.11'de ve konsantrasyonlardan elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri Tablo 4.10'da görülmektedir. Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat yönteminde, polifenolik bileşik olan gallik asit varlığında GSH tayini yapılmıştır. GSH biyotiyol bileşimini gallik asitten ayırmak için C-18 kartuş kullanılarak katı faz ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve %83 oranında ayırma sağlanmıştır (Tablo 4.11). Geliştirilen modifiye ABTS-Persülfat ve HPLC yöntemi ile

bulunan konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında geri kazanım % 102.89 bulunmuştur (Tablo 4.12). Geliştirilen modifiye ABTS-Persulfat yonteminde, polifenolik bileşikler (kateşin, kuersetin ve kafeik asit) varlığında GSSG biyotiyol bileşiği tayini yapılmıştır. GSSG bileşiğini ayırt etmek için C-18 kartuş kullanarak katı faz ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve %85 oranında ayırma sağlanmıştır (Tablo 4.13). Tablo 4.14’de geliştirilen modifiye ABTS-Persulfat ve HPLC yontemi ile bulunan konsantrasyon değerleri karşılaştırıldığında geri kazanım % 104.34 bulunmuştur.

İlaç örneklerinin analizinde geliştirilen modifiye ABTS-Persulfat yontemi ve referans yontem olarak da modifiye Ellman ve HPLC yontemleri kullanılmıştır. 600 mg NAC efervesan tablet ve 1200 mg Asist NAC toz saşe içeren ilaç örneklerinin HPLC yontemi ile analizi yapıldıktan sonra N-asetil sistein (NAC) biyotiyol bileşiğinin HPLC yontemine göre elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak bu ilaçlarda bulunan NAC bileşiğinin konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu iki ilaç örneğinin geliştirilen modifiye ABTS-Persulfat yontemi ve modifiye Ellman yontemi ile analizi yapıldıktan sonra her bir yontem için elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak NAC bileşiğinin konsantrasyonları belirlenmiştir. Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da görüldüğü üzere sonuçlar birbiriyle uyumludur. Geliştirilen yontem, sentetik serum örneğine uygulanmış olup sentetik serumda biyotiyol örneğine rastlanmamıştır. Geliştirilen yontemin, kesinliği ve doğruluğunun tespiti için yüzde bağıl standart sapma ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bunun için, belirli oranlarda seyreltilmiş sentetik serum örneğine bilinen derişimde standart GSH (5×10^{-6}) ve GSSG (1×10^{-5}) katkısı yapılmıştır. Yontemin yüzde bağıl standart sapma değeri (N=3) sırasıyla 0.079 ve 0.046, yüzde geri kazanım (N=3) sırasıyla % 100.4 ve % 101 olarak bulunmuştur.

Bu alışma ilgili bilim alanına iki yönden yenilik getirmektedir: birincisi; geleneksel antioksidan kapasite tayin yontemlerinin ve özel olarak ABTS radikal süpürme tayin yonteminin sülfhidril bileşikleri dışında doğrudan dislfrlere uygulanabilirliği daha önce bilinmemekteydi. İkinicisi hem sülfhidril hem de disülfürlerin tek bir antioksidan reaktifi (ABTS radikali) yardımıyla ve n redoks tepkimeleri uygulanmadan bir arada tayini ilk kez bu çalışma ile mümkün olmuştur. şimdiye kadar tek reaktifle bir arada tayin edilmeyen sülfhidril ve dislfrler yapay ve gerçek karışımlarda makul geri kazanımlarla bir arada tayin edilmiş olmaktadır. |

KAYNAKLAR

- [Adar, F., 2015, Multiparticle Analysis by Raman Microscopy, *Spectroscopy*, 30(2), 14-24.
- Akşit, H., Akşit, D., Bildik, A., Kara, H., Yavuz, Ö., Seyrek, Ö., 2015, Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-asetil sistein'in glutasyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 1-5.
- Aliaga, C., Lissi, E.A., 2000, Reactions of the radical cation derived from 2,2' azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS⁺) with amino acids. Kinetics and mechanism. *Canadian Journal of Chemistry*, 78(8), 1052–1059
- Athilakshmi, J., Mohan, M., Chand, D.K., 2013, Selective Detection of Cysteine/Cystine Using Silver Nanoparticles, *Tetrahedron Letters*, 54(5), 427- 430.
- Atkuri, K.R., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 2007, N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency, *Curr Opin Pharmacol*, 7(4), 355-359.
- Atmaca, G., 2004, Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids, *Yonsei Med Journal*, 45(5), 776-788.
- Box, G.E.P. and Wilson, K.B., 1951, On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 13(1), 1–45.
- Box, G.E.P. and Behnken, D.W., 1960, Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables, *Technometrics*, 2, 455-475.
- Butz, L.W., and Vigneaud, V., 1932, The formation of a homologue of cystine by the decomposition of methionine with sulfuric acid, *J. Biol. Chem*, 99, 135-142.
- C.A., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Camel, V., 2003, Solid Phase Extraction of Trace Elements, *Spectrochimica Acta B*, 58, 1177-1233.
- Chen, W., Zhao, Y., Seefeldt, T., Guan, X., 2008, Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid, *J Pharm Biomed Anal*, 48(5), 1375-1380
- 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, *Clin. Chem*, 33, 1448-1449.
- Ellman, G.L., 1959, Tissue sulfhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77.

- Erel, O., and Neselioglu, S., 2014, A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis, *Clinical Biochemistry*, 47(18), 326-332.
- Gahl, W.A., Reed, G.F., Thoene, J.G., Schulman, J.D., Rizzo, W.B., Jonas, A.J., Denman D.W., Schesselman, J.J., Corden B.J., Schneider, J.A., 1987, Cysteamine therapy for children with nephropathic cystinosis. *N Engl J Med.*, 316(16), 971–977.
- Gahl, W.A., Thoene, J.G., Schneider, J.A., 2002, Cystinosis, *N Engl J Med.*, 347(2), 111–121.
- Graaf-Hess, A., Trijbels, F., Blom, H., 1999, New method for determining cystine in leukocytes and fibroblasts, *Clin Chem*, 45(12), 2224–2228.
- Güçlü, K., Özyürek, M., Güngör, 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, *Analytica Chimica Acta*, 794, 90-98.
- Güngör, N., Özyürek, M., Güçlü, K., Çekiç, S. D., & Apak, R., 2011, Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods, *Talanta*, 83(5), 1650–1658.
- 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(1), 77-82.
- Harrington, C.R., ve Thomas H.M., 1935, Synthesis of glutathione, *Biochem J.*, 29(7), 1602-1601.
- Hopkins, F.G., 1929, On glutathione a reinvestigation, *J.Biol.Chem.*, 84, 269-320.
- Hopkins, F.G., 1921, On an autooxidisable constituent of the cell, *Biochem.J.*, 15(2), 286-305.
- House, J.D., Jacobs, R.L., Stead, L.M., Brosnan, M.E., Brosnan, J.T., 1999, Regulation of homocysteine metabolism, *Adv. Enzyme Regul.*, 39, 69-91
- Jones, DP., Go, YM., 2011, Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease, *Free Radic Biol Med.*, 50(4), 495-509.
- Jones, N.P., Postlethwaite, R.J., Noble, J.L., 1991, Clearance of corneal crystals in nephropathic cystinosis by topical cysteamine 0.5%, *Br. J. Ophthalmol*, 75(5), 311-312.
- Liu, Y., Liu, Y., Liu, W., ve Liang, S., 2015, Two-photon fluorescent probe derived from naphthalimide for Cysteine detection and imaging in living cells , *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 137, 509–515.
- Makuloluwa, A.K., & Shams, F., 2018, Cysteamine hydrochloride eye drop solution for the treatment of corneal cystine crystal deposits in patients with cystinosis: an evidence-based review, *Clinical Ophthalmology*, 12, 227–236.

- Markello, TC., Bernardini, IM., Gahl, WA., 1993, Improved renal function in children with cystinosis treated with cysteamine, *N Engl J Med*, 328(16), 1157–1162.
- Meister, A., 1984, New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism, *Nutrition Reviews*, (42) 12, 397-410.
- Miller, N.J., Rice Evans, C.A., Davies, Mg.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Miller, S.L., Schlesinger, G., 1993, Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: I. Cysteamine and 2-mercaptoethanesulphonic acid (coenzyme M), *J Mol Evol*, 36 (4), 302-307.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2016, *Response surface methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 4th ed., Wiley, New York, ISBN: 978-1-118-91601-8.
- Niu, L., Guan, Y., Chen, Y., Wu, Zhu., Chen, T., ve Yang, Q., 2013, A turn-on fluorescent sensor for the discrimination of cystein from homocystein and glutathione, *The Royal Society of Chemistry*, 49(13), 1294-1296.
- Nur, I., Yumi, Z.H., Jamal, P., 2014, Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 95-101.
- Ismail, N.I., Hashim Y.Z., Jamal, P., Othman, R., Salleh H.M., 2014, Production of Cysteine: Approaches, Challenges and Potential Solution, *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 95-101.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Prvan, T., Street, D.J., 2002, An annotated bibliography of application papers using certain classes of fractional factorial and related designs, *Journal of Statistical Planning and Inference*, 106(1-2), 245–269.
- Sen, C.K., Packer, L., 2000, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 653S–669S.
- Sies, H., 1997, Oxidative stress: oxidants and antioxidants, *Exp. Physiol*, 82(2), 291-295.
- Topaloglu, R., Vilboux, T., Coskun, T., Ozaltin, F., Tinloy, B., Gunay-Aygun, M., Bakkaloglu, A., Besbas, N., Heuvel, L., Kleta, R., Gahl, WA., 2012, Genetic basis of cystinosis in Turkish patients: a single-center experience, *Pediatr Nephrol*, 27(1), 115–121.

- Trezn, L., Co, Y.B.; Dimaria, P., Kim, S., D.Lotlikar, P., Paik, W.K., 1998, Studies on reaction of formaldehyde with naturally occurring thiol compounds and ascorbic acid, *Archives of Pharmacal Research*, 11, 114.
- Ulakoğlu, Z.E.M., Gümüştaş, K.M., Belce, A., Altuğ, T., Kokoğlu, E., 1998, Strese bağlı mide mukozası hasarında endojen glutatyon tükenişinin enerji metabolizması ile ilişkisi, *Cerrahpaşa C. Med.*, 29(3), 127-131.
- Walker, R.B., Everette, J.D., 2009, Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1156–1161
- Yang, Y., Huo, F., Yin, C., Chao, J. ve Zhang, Y., 2015, An ‘OFF ON’ fluorescent probe for specially recognize on Cys and its application in bioimaging, *Dyes and Pigments*, 114, 105-109 .
- Yavuz, O., ve Aksoy, A., 2006, Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu, *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(3), 259-269,
- Zafarullah, M., Li, WQ., Sylvester, J., Ahmad, M., 2003, Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions, *Cell Mol Life Sci*, 60(1), 6-20.
- Zhang, Wanlin., Li, Y., Liang, Y., Yin, X., Liu, C., Wang, S., Tian, L., Dong, H., Li, G., 2019, Direct Determination of Redoks Statuses in Biological Thiols and Disulfides with Noncovalent Interactions of Poly(ionic liquid)s, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 11, 33, 30137-30145.
- Zhao, H., Chen, M., Ma C., 2019, Fluorescent Method for the Detection of Biothiols Using an Ag⁺-Mediated Conformational Switch, *Sensors*, 19(4), 934.
- Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q., Su, G., 2016, Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time, *Food Chemistry*, 192, 288–294.

EKLER

|



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Emine Münevver GÖRÜŞÜK
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	07.09.1986
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	0 505 3108023
E-Posta Adresi	munevvergorusuk@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Cumhuriyet Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik
Bölümü	Kimya Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	2012

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

Makale ve Bildiriler	