

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ NANO MALZEMELERİN ÜRETİMİ VE BAZI
BİYOLOJİK MADDELERİN KANTİTATİF
ANALİZİNDE KULLANILMASI**

DOKTORA TEZİ

Can Serkan KESKİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA
Enstitü Bilim Dalı : ANALİTİK KİMYA
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali Osman AYDIN
Ortak Danışman : Doç. Dr. Abdil ÖZDEMİR

Aralık 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÜMÜŞ NANO MALZEMELERİN ÜRETİMİ VE BAZI
BİYOLOJİK MADDELERİN KANTİTATİF
ANALİZİNDE KULLANILMASI**

DOKTORA TEZİ

Can Serkan KESKİN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 18 / 12 / 2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


**Prof. Dr.
Adem KILIÇ
Jüri Başkanı**


**Prof. Dr.
Ahmet GÜL
Üye**


**Prof. Dr.
Ali Osman AYDIN
Üye**


**Doç. Dr.
Uğursoy OLGUN
Üye**


**Doç. Dr.
Mehmet İŞLEYEN
Üye**

TEŞEKKÜR

Bu çalıŐmayı bŸyŸk bir titizlikle yŸneten, çalışma boyunca desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrŸbesinden istifade ettiğim kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Ali Osman AYDIN ve Doç. Dr. Abdil ŖZDEMİR'e sonsuz teŐekkŸrlerimi sunarım.

ÇalıŐmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen Kimya BŸlŸmŸ Ŗęretim Ÿyelerine ve Araştırma GŸrevlilerine teŐekkŸrlerimi sunarım.

Maddi manevi desteklerini esirgemeyen eŐim Semra YILMAZER KESKİN'e ve aileme teŐekkŸrŸ bir borç bilirim.

Bu alıŐma Sakarya Ÿniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiŐtir (Proje no: 2010-50-02-006).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xxv
ÖZET.....	xxvi
SUMMARY.....	xxvii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ.....	1
------------	---

BÖLÜM 2.

GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Amino Asitler.....	3
2.1.1. Çalışmalarda kullanılan amino asitler ve literatür çalışmaları.....	5
2.1.1.1. L-alanin (2-aminopropanoik asit).....	5
2.1.1.2. L-arginin (2-amino-5-guanidinopentanoik asit)....	7
2.1.1.3. L-asparagin (2-amino-3-karbamoilpropanoik asit).	9
2.1.1.4. L-aspartik asit (aminobutanoik asit).....	10
2.1.1.5. L-fenilalanin (2-amino-3-fenilpropionik asit).....	12
2.1.1.6. L-glutamik asit (2-aminopentandioik asit).....	14
2.1.1.7. L-glutamin (2,5-diamino-5-oxopentanoik asit).....	16
2.1.1.8. Glisin (aminosetik asit).....	18
2.1.1.9. L-histidin (2-amino-3-(4-imidazolil)propiyonik asit).....	20

2.1.1.10. L-izolösin (2-amino-3-metilpentanoik asit).....	22
2.1.1.11. L-lösin (2-amino-4-metilpentanoik asit).....	24
2.1.1.12. L-lisin (2,6-diamino kaproik asit).....	25
2.1.1.13. L-metiyonin (2-amino-4-(metiltiyo)butanoik asit).....	27
2.1.1.14. L-prolin (pirolidin-2-karboksilik asit).....	29
2.1.1.15. L-serin (2-amino-3-hidroksipropiyonik asit).....	31
2.1.1.16. L-sistein (2-amino-3-merkaptopropiyonik asit)...	32
2.1.1.17. L-treonin (2-amino-3-hidroksibutirik asit).....	35
2.1.1.18. L-triptofan (2-amino-3-(3-indolil)propiyonik asit).....	36
2.1.1.19. L-tirozin (2-amino-3-(4-hidroksifenil)propiyonik asit).....	38
2.1.1.20. L-valin (2-amino-3-metilbutanoik asit).....	40
2.2. Proteinler.....	41
2.2.1. Çalışmalarda kullanılan proteinler ve literatür çalışmaları...	42
2.2.1.1. Sığır serum albumini (BSA).....	43
2.2.1.2. Alfa laktalbumin (α -LA).....	45
2.2.1.3. Miyogloblin (Mb).....	46
2.3. Enzimler.....	48
2.3.1. Çalışmalarda kullanılan enzimler ve literatür çalışmaları.....	49
2.3.1.1. Kreatin kinaz (CK).....	49
2.3.1.2. Lizozim (LZ).....	51
2.3.1.3. Tripsin (TRY).....	53
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	56
3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	56
3.2. Modifiye Gümüş Nanoparçıklarının Sentezi.....	56
3.3. Amino Asit/Protein/Enzim Tayinleri.....	57
3.4. Karakterizasyon.....	57

BÖLÜM 4.

DENEYSEL SONUÇLAR.....	59
4.1. Modifiye Gümüş Nanoparçıklarının Özellikleri ve Karakterizasyonu.....	59
4.2. Amino Asit Tayinleri.....	67
4.2.1. L-sistein tayini.....	67
4.2.1.1. Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini.....	67
4.2.1.2. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini.....	72
4.2.1.3. Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini.....	78
4.2.1.4. Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini.....	83
4.2.1.5. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini.....	87
4.2.2. L-histidin tayini.....	92
4.2.2.1. Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini.....	92
4.2.2.2. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini.....	98
4.2.2.3. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini.....	103
4.2.3. L-arginin tayini.....	109
4.2.3.1. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-arginin tayini.....	109
4.2.3.2. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-arginin tayini.....	115
4.2.4. L-lisin tayini.....	120
4.2.4.1. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-lisin tayini.....	120
4.2.4.2. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-lisin tayini.....	125
4.2.5. L-metiyonin tayini.....	130
4.2.5.1. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda L-metiyonin tayini.....	130
4.3. Protein Tayinleri.....	136
4.3.1. Sığır serum albumini tayini.....	136
4.3.1.1. Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini.....	136
4.3.1.2. Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini.....	140
4.3.1.3. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini.....	143

4.3.1.4. Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini.....	146
4.3.1.5. Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini.....	149
4.3.1.6. Sığır serum albumini için alınan FTIR spektrumları..	152
4.3.2. α-laktalbumin tayini	154
4.3.2.1. Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda α-laktalbumin tayini.....	154
4.3.2.2. Fe ³⁺ iyonu bulunan ortamda α-laktalbumin tayini.....	158
4.3.2.3. Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda α-laktalbumin tayini.....	161
4.3.2.4. Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda α-laktalbumin tayini.....	164
4.3.2.5. α-laktalbumin için alınan FTIR spektrumları.....	167
4.4. Enzim Tayinleri.....	169
4.4.1. Kreatin kinaz tayini.....	169
4.4.1.1. Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini.....	169
4.4.1.2. Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini.....	172
4.4.1.3. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini.....	175
4.4.1.4. Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini.....	178
4.4.1.5. Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini.....	181
4.4.1.6. Kreatin kinaz için alınan FTIR spektrumları....	184
4.4.2. Lizozim tayini.....	186
4.4.2.1. Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	186
4.4.2.2. Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	190
4.4.2.3. Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	193
4.4.2.4. Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	196
4.4.2.5. Fe ³⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	199
4.4.2.6. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	202
4.4.2.7. Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	205

4.2.2.8. Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini.....	208
4.2.2.9. Lizozim için alınan FTIR spektrumları.....	211
4.4.3. Tripsin tayini.....	213
4.4.3.1. Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini.....	213
4.4.3.2. Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini.....	216
4.4.3.3. Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini.....	219
4.4.3.4. Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini.....	222
4.4.3.5. Tripsin için alınan FTIR spektrumları.....	225
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	228
KAYNAKLAR.....	242
ÖZGEÇMİŞ.....	285

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Ala	: Alanin
AlaDH	: L-alanin dehidrojenaz
ADP	: Adenozin difosfat
Arg	: Arginin
AgGSH	: Glutasyon ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkları
AFM	: Atomik güç mikroskobu
Asp	: Aspartik asit
ATR	: Azaltılmış toplam yansıma
BSA	: Sığır serum albumini
CK	: Kreatin kinaz
cm	: Santimetre
Cys	: Sistein
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dk	: Dakika
dm	: Desimetre
ESR	: Elektron spin rezonans
FTIR	: Fourier transform infrared spektrofotometresi
g	: Gram
GC	: Gaz kromatografisi
GEPD	: Grafit-teflon
Glu	: Glutamik asit
Gln	: Glutamin
Gly	: Glisin
GPTFE	: Grafit-etilen-propilen-dien
His	: Histidin
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

IR	: İnfared
Ile	: İzölösın
L	: Litre
LC	: Sıvı kromatografisi
Leu	: Lösın
Lys	: Lisin
LZ	: Lizozim
M	: Molar
Mb	: Miyoglobin
Met	: Metiyonin
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
MS	: Kütle spektrometresi
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş hali
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonunun eksi logaritması
Phe	: Fenilalanin
pI	: İzoelektronik nokta
pK	: Denge sabitinin negatif logaritması
PLS	: Kısmi en küçük kareler yöntemi
Pro	: Prolin
PyOD	: Piruvat oksidaz
RNA	: Ribonükleik asit
Ser	: Serin
SHL	: Salisilat hidrosilaz
SPR	: Yüzey plazma rezonansı
Thr	: Treonin

Trp	: Triptofan
TRY	: Tripsin
Tyr	: Tirozin
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
Val	: Valin
VIS	: Görünür bölge
α -LA	: Alfa laktalbumin
μ g	: Mikrogram
μ m	: Mikrometre
μ L	: Mikrolitre
μ mol	: Mikromol
% T	: Yüzde geçirgenlik

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Amino asitlerin genel gösterimi.....	3
Şekil 2.2.	Asidik ortamda amino asitlerin genel yapısı.....	4
Şekil 2.3.	Bazik ortamda amino asitlerin genel yapısı.....	4
Şekil 2.4.	Amino asitlerin tampon özelliği.....	4
Şekil 2.5.	L-alanin amino asidinin yapısı.....	6
Şekil 2.6.	L-arginin amino asidinin yapısı.....	8
Şekil 2.7.	L-asparagin amino asidinin yapısı.....	9
Şekil 2.8.	L-aspartik asit amino asidinin (a) asit ve (b) aspartat yapısı.....	11
Şekil 2.9.	L-fenilalanin amino asidinin yapısı.....	12
Şekil 2.10.	L-glutamik asit amino asidinin (a) asit ve (b) glutamat yapısı....	14
Şekil 2.11.	L-glutamin amino asidinin yapısı.....	16
Şekil 2.12.	Glisin amino asidinin yapısı.....	18
Şekil 2.13.	L-histidin amino asidinin yapısı.....	20
Şekil 2.14.	L-izolösin amino asidinin yapısı.....	22
Şekil 2.15.	L-lösin amino asidinin yapısı.....	24
Şekil 2.16.	L-lisin amino asidinin yapısı.....	26
Şekil 2.17.	L-metiyonin amino asidinin yapısı.....	28
Şekil 2.18.	L-prolin amino asidinin yapısı.....	29
Şekil 2.19.	L-serin amino asidinin yapısı.....	31
Şekil 2.20.	L-sistein amino asidinin yapısı.....	33
Şekil 2.21.	L-treonin amino asidinin yapısı.....	35
Şekil 2.22.	L-triptofan amino asidinin yapısı.....	36
Şekil 2.23.	L-tirozin amino asidinin yapısı.....	38
Şekil 2.24.	L-valin amino asidinin yapısı.....	40
Şekil 2.25.	Sığır serum albumininin A zincirinin ikincil yapısı.....	43
Şekil 2.26.	Alfa laktalbumin zincirinin ikincil yapısı.....	45

Şekil 2.27.	Miyoglobin zincirinin ikincil yapısı.....	47
Şekil 2.28.	Kreatin kinaz zincirinin ikincil yapısı.....	49
Şekil 2.29.	Lizozim zincirinin ikincil yapısı.....	51
Şekil 2.30.	Tripsin zincirinin ikincil yapısı.....	54
Şekil 4.1.	Modifiye gümüş nanoparçacıkları ile modifiye edilmemiş gümüş nanoparçacıklarının absorpsiyon spektrumları.....	59
Şekil 4.2.	AgGSH çözeltisinin zamanla meydana gelen absorbans değişimleri.....	60
Şekil 4.3.	Nanoparçacıkların ışık ile etkileşimleri.....	60
Şekil 4.4.	GSH molekülünün değişik formları.....	61
Şekil 4.5.	AgGSH çözeltisinin değişik pH'larda absorpsiyon spektrumları.....	62
Şekil 4.6.	AgGSH nanoparçacıklarının AFM görüntüleri; agregre (10x10µm) (a); agregre (3x2µm) (b); dispers (700x1000nm) (c); çekirdek-kabuk (10x10µm) (d).....	63
Şekil 4.7.	AgGSH nanoparçacıklarının Nova_P9 programı ile hesaplanmış çap dağılımları.....	65
Şekil 4.8.	GSH ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	66
Şekil 4.9.	GSH ve gümüş nanoparçacığın muhtemel bağlanma yapısı.....	66
Şekil 4.10.	Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	68
Şekil 4.11.	AgGSHNi ²⁺ Cys, AgGSH, AgGSH ve Ni ²⁺ , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Ni ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	68
Şekil 4.12.	Ni ²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	69
Şekil 4.13.	Zamanla değişen AgGSHNi ²⁺ Cys absorbansları.....	70
Şekil 4.14	Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	70
Şekil 4.15.	AgGSHNi ²⁺ Cys yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	71

Şekil 4.16.	AgGSHNi ²⁺ Cys, Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	72
Şekil 4.17.	AgGSHNi ²⁺ Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	72
Şekil 4.18.	Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	73
Şekil 4.19.	AgGSHCo ²⁺ Cys, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	74
Şekil 4.20.	Co ²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 261,5 nm 10 – 100 µM (b), 261,5 nm 100 – 1000 µM (c), 397 nm 100 – 1000 µM (d) kalibrasyon doğruları.....	74
Şekil 4.21.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ Cys absorbansları.....	77
Şekil 4.22.	AgGSHCo ²⁺ Cys yapısının AFM görüntüsü (2,5x2,5 µm).....	77
Şekil 4.23.	AgGSHCo ²⁺ Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	78
Şekil 4.24.	AgGSHCo ²⁺ Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli	78
Şekil 4.25.	Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	79
Şekil 4.26.	AgGSHCd ²⁺ Cys, AgGSH, AgGSH ve Cd ²⁺ , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Cd ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	80
Şekil 4.27.	Cd ²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	80
Şekil 4.28.	Zamanla değişen AgGSHCd ²⁺ Cys absorbansları.....	81
Şekil 4.29.	AgGSHCd ²⁺ Cys yapısının AFM görüntüsü (2x2 µm).....	82
Şekil 4.30.	AgGSHCd ²⁺ Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	82
Şekil 4.31.	AgGSHCd ²⁺ Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	83

Şekil 4.32.	Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	83
Şekil 4.33.	$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve Cys , Cys , Cys ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	84
Şekil 4.34.	Cu^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	85
Şekil 4.35.	Zamanla değişen $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ absorpsiyonları.....	86
Şekil 4.36.	$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ yapısının AFM görüntüsü ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$).....	86
Şekil 4.37.	$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	87
Şekil 4.38.	$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	87
Şekil 4.39.	Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	88
Şekil 4.40.	$\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Cys}$, AgGSH , AgGSH ve Hg^{2+} , AgGSH ve Cys , Cys , Cys ve Hg^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	89
Şekil 4.41.	Hg^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	89
Şekil 4.42.	Zamanla değişen $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Cys}$ absorpsiyonları.....	90
Şekil 4.43.	$\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Cys}$ yapısının AFM görüntüsü ($2 \times 2 \mu\text{m}$).....	91
Şekil 4.44.	$\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Cys}$ ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	92
Şekil 4.45.	$\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Cys}$ yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	92
Şekil 4.46.	Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	93
Şekil 4.47.	$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{His}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve His , His , His ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	93

Şekil 4.48.	Cu ²⁺ bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	94
Şekil 4.49.	Zamanla değişen AgGSHCu ²⁺ His absorbansları.....	95
Şekil 4.50.	AgGSHCu ²⁺ His yapısının AFM görüntüsü (2x1,8 µm).....	96
Şekil 4.51.	His, His-Cu ²⁺ , AgGSHCu ²⁺ His ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	97
Şekil 4.52.	AgGSHCu ²⁺ His yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	98
Şekil 4.53.	Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	98
Şekil 4.54.	AgGSHHg ²⁺ His, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve His, His, His ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	99
Şekil 4.55.	Hg ²⁺ bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	100
Şekil 4.56.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ His absorbansları.....	101
Şekil 4.57.	AgGSHHg ²⁺ His yapısının AFM görüntüsü (5x4 µm).....	101
Şekil 4.58.	His, His-Hg ²⁺ , AgGSHHg ²⁺ His ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	102
Şekil 4.59.	AgGSHHg ²⁺ His yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	103
Şekil 4.60.	Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	104
Şekil 4.61.	AgGSHCo ²⁺ His, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve His, His, His ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	104
Şekil 4.62.	Co ²⁺ bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	105
Şekil 4.63.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ His absorbansları.....	106
Şekil 4.64.	AgGSHCo ²⁺ His yapısının AFM görüntüsü (4,5x3 µm).....	107
Şekil 4.65.	His, His-Co ²⁺ , AgGSHCo ²⁺ His ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	108

Şekil 4.66.	AgGSHCo ²⁺ His yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	109
Şekil 4.67.	Arginin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	110
Şekil 4.68.	AgGSHCo ²⁺ Arg, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve Arg, Arg, Arg ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	110
Şekil 4.69.	Co ²⁺ bulunan ortamda artan Arg konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	111
Şekil 4.70.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ Arg absorbansları.....	112
Şekil 4.71.	AgGSHCo ²⁺ Arg yapısının AFM görüntüsü (5x4 µm).....	112
Şekil 4.72.	Arg, Arg-Co ²⁺ , AgGSHCo ²⁺ Arg ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	114
Şekil 4.73.	AgGSHCo ²⁺ Arg yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	114
Şekil 4.74.	Arginin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	115
Şekil 4.75.	AgGSHHg ²⁺ Arg, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve Arg, Arg, Arg ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	116
Şekil 4.76.	Hg ²⁺ bulunan ortamda artan Arg konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	116
Şekil 4.77.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ Arg absorbansları.....	117
Şekil 4.78.	AgGSHHg ²⁺ Arg yapısının AFM görüntüsü (3x5 µm).....	118
Şekil 4.79.	Arg, Arg-Hg ²⁺ , AgGSHHg ²⁺ Arg ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	119
Şekil 4.80.	AgGSHHg ²⁺ Arg yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	119
Şekil 4.81.	Lisin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	120

Şekil 4.82.	AgGSHCo ²⁺ Lys, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve Lys, Lys, Lys ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	121
Şekil 4.83.	Co ²⁺ bulunan ortamda artan Lys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	122
Şekil 4.84.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ Lys absorbansları.....	123
Şekil 4.85.	AgGSHCo ²⁺ Lys yapısının AFM görüntüsü (4x3 µm).....	123
Şekil 4.86.	Lys, Lys-Co ²⁺ , AgGSHCo ²⁺ Lys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	124
Şekil 4.87.	AgGSHCo ²⁺ Lys yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	125
Şekil 4.88.	Lisin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	125
Şekil 4.89.	AgGSHHg ²⁺ Lys, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve Lys, Lys, Lys ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	126
Şekil 4.90.	Hg ²⁺ bulunan ortamda artan Lys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	127
Şekil 4.91.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ Lys absorbansları.....	128
Şekil 4.92.	AgGSHHg ²⁺ Lys yapısının AFM görüntüsü (5x3 µm).....	128
Şekil 4.93.	Lys, Lys-Co ²⁺ , AgGSHCo ²⁺ Lys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	129
Şekil 4.94.	AgGSHHg ²⁺ Lys yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	130
Şekil 4.95.	Metiyonin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları.....	131
Şekil 4.96.	AgGSHHg ²⁺ Met, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve Met, Met, Met ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	131
Şekil 4.97.	Hg ²⁺ bulunan ortamda artan Met konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 10 – 100 µM (b), 100 – 1000 µM (c) kalibrasyon doğruları.....	132

Şekil 4.98.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ Met absorbanları.....	133
Şekil 4.99.	AgGSHHg ²⁺ Met yapısının AFM görüntüsü (2x2 µm).....	134
Şekil 4.100.	Met, Met-Hg ²⁺ , AgGSHHg ²⁺ Met ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	135
Şekil 4.101.	AgGSHHg ²⁺ Met yapısının muhtemel bağlanma şekli.....	135
Şekil 4.102.	AgGSHCd ²⁺ BSA, AgGSH, AgGSH ve Cd ²⁺ , AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Cd ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	137
Şekil 4.103.	Cd ²⁺ bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	138
Şekil 4.104.	Zamanla değişen AgGSHCd ²⁺ BSA absorbanları.....	139
Şekil 4.105.	AgGSHCd ²⁺ BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	139
Şekil 4.106.	AgGSHCu ²⁺ BSA, AgGSH, AgGSH ve Cu ²⁺ , AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Cu ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	140
Şekil 4.107.	Cu ²⁺ bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	141
Şekil 4.108.	Zamanla değişen AgGSHCu ²⁺ BSA absorbanları.....	142
Şekil 4.109.	AgGSHCu ²⁺ BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	142
Şekil 4.110.	AgGSHHg ²⁺ BSA, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	143
Şekil 4.111.	Hg ²⁺ bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	144
Şekil 4.112.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ BSA absorbanları.....	145
Şekil 4.113.	AgGSHHg ²⁺ BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	145
Şekil 4.114.	AgGSHNi ²⁺ BSA, AgGSH, AgGSH ve Ni ²⁺ , AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Ni ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	146
Şekil 4.115.	Ni ²⁺ bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	147

Şekil 4.116.	Zamanla değişen AgGSHNi ²⁺ BSA absorbansları.....	148
Şekil 4.117.	AgGSHNi ²⁺ BSA yapısının AFM görüntüsü (1x1 µm).....	148
Şekil 4.118.	AgGSHZn ²⁺ BSA, AgGSH, AgGSH ve Zn ²⁺ , AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Zn ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	149
Şekil 4.119.	Zn ²⁺ bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	150
Şekil 4.120.	Zamanla değişen AgGSHZn ²⁺ BSA absorbansları.....	151
Şekil 4.121.	AgGSHZn ²⁺ BSA yapısının AFM görüntüsü (1x1 µm).....	151
Şekil 4.122.	BSA, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-BSA yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	153
Şekil 4.123.	AgGSHCd ²⁺ αLA, AgGSH, AgGSH ve Cd ²⁺ , AgGSH ve αLA, αLA, αLA ve Cd ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	155
Şekil 4.124.	Cd ²⁺ bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	156
Şekil 4.125.	Zamanla değişen AgGSHCd ²⁺ αLA absorbansları.....	157
Şekil 4.126.	AgGSHCd ²⁺ αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	157
Şekil 4.127.	AgGSHFe ³⁺ αLA, AgGSH, AgGSH ve Fe ³⁺ , AgGSH ve αLA, αLA, αLA ve Fe ³⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	158
Şekil 4.128.	Fe ²⁺ bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	159
Şekil 4.129.	Zamanla değişen AgGSHFe ²⁺ αLA absorbansları.....	160
Şekil 4.130.	AgGSHFe ²⁺ αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	160
Şekil 4.131.	AgGSHCu ²⁺ αLA, AgGSH, AgGSH ve Cu ²⁺ , AgGSH ve αLA, αLA, αLA ve Cu ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	161
Şekil 4.132.	Cu ²⁺ bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	162
Şekil 4.133.	Zamanla değişen AgGSHCu ²⁺ αLA absorbansları.....	163
Şekil 4.134.	AgGSHCu ²⁺ αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	163

Şekil 4.135.	AgGSHZn ²⁺ αLA, AgGSH, AgGSH ve Zn ²⁺ , AgGSH ve αLA, αLA, αLA ve Zn ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	164
Şekil 4.136.	Zn ²⁺ bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	165
Şekil 4.137.	Zamanla değişen AgGSHZn ²⁺ αLA absorbensleri.....	166
Şekil 4.138.	AgGSHZn ²⁺ αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	166
Şekil 4.139.	αLA, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-αLA yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	168
Şekil 4.140.	AgGSHAg ⁺ CK, AgGSH, AgGSH ve Ag ⁺ , AgGSH ve CK, CK, CK ve Ag ⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	170
Şekil 4.141.	Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	171
Şekil 4.142.	Zamanla değişen AgGSHAg ⁺ CK absorbensleri.....	170
Şekil 4.143.	AgGSHAg ⁺ CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	172
Şekil 4.144.	AgGSHCd ²⁺ CK, AgGSH, AgGSH ve Cd ²⁺ , AgGSH ve CK, CK, CK ve Cd ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	173
Şekil 4.145.	Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	173
Şekil 4.146.	Zamanla değişen AgGSHCd ²⁺ CK absorbensleri.....	174
Şekil 4.147.	AgGSHCd ²⁺ CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	175
Şekil 4.148.	AgGSHCo ²⁺ CK, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve CK, CK, CK ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	176
Şekil 4.149.	Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	176
Şekil 4.150.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ CK absorbensleri.....	177
Şekil 4.151.	AgGSHCo ²⁺ CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	178

Şekil 4.152.	AgGSHNi ²⁺ CK, AgGSH, AgGSH ve Ni ²⁺ , AgGSH ve CK, CK, CK ve Ni ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	179
Şekil 4.153.	Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	179
Şekil 4.154.	Zamanla değişen AgGSHNi ²⁺ CK absorbensleri.....	180
Şekil 4.155.	AgGSHNi ²⁺ CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	181
Şekil 4.156.	AgGSHZn ²⁺ CK, AgGSH, AgGSH ve Zn ²⁺ , AgGSH ve CK, CK, CK ve Zn ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	182
Şekil 4.157.	Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	182
Şekil 4.158.	Zamanla değişen AgGSHZn ²⁺ CK absorbensleri.....	183
Şekil 4.159.	AgGSHZn ²⁺ CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	184
Şekil 4.160.	CK, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-CK yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	185
Şekil 4.161.	AgGSHAg ⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Ag ⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ag ⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	187
Şekil 4.162.	Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	188
Şekil 4.163.	Zamanla değişen AgGSHAg ⁺ LZ absorbensleri.....	189
Şekil 4.164.	AgGSHAg ⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	189
Şekil 4.165.	AgGSHCd ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Cd ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Cd ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	190
Şekil 4.166.	Cd ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbens değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	191
Şekil 4.167.	Zamanla değişen AgGSHCd ²⁺ LZ absorbensleri.....	192
Şekil 4.168.	AgGSHCd ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	192
Şekil 4.169.	AgGSHCo ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Co ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Co ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	193

Şekil 4.170.	Co ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	194
Şekil 4.171.	Zamanla değişen AgGSHCo ²⁺ LZ absorbansları.....	195
Şekil 4.172.	AgGSHCo ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	195
Şekil 4.173.	AgGSHCu ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Cu ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Cu ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	196
Şekil 4.174.	Cu ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	197
Şekil 4.175.	Zamanla değişen AgGSHCu ²⁺ LZ absorbansları.....	198
Şekil 4.176.	AgGSHCu ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	198
Şekil 4.177.	AgGSHFe ³⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Fe ³⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Fe ³⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	199
Şekil 4.178.	Fe ³⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	200
Şekil 4.179.	Zamanla değişen AgGSHFe ³⁺ LZ absorbansları.....	201
Şekil 4.180.	AgGSHFe ³⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	201
Şekil 4.181.	AgGSHHg ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Hg ²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	202
Şekil 4.182.	Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	203
Şekil 4.183.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ LZ absorbansları.....	204
Şekil 4.184.	AgGSHHg ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	204
Şekil 4.185.	AgGSHNi ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Ni ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ni ²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	205
Şekil 4.186.	Ni ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	206
Şekil 4.187.	Zamanla değişen AgGSHNi ²⁺ LZ absorbansları.....	207
Şekil 4.188.	AgGSHNi ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	207

Şekil 4.189.	AgGSHZn ²⁺ LZ, AgGSH, AgGSH ve Zn ²⁺ , AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Zn ²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	208
Şekil 4.190.	Zn ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	209
Şekil 4.191.	Zamanla değişen AgGSHZn ²⁺ LZ absorbansları.....	210
Şekil 4.192.	AgGSHZn ²⁺ LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	210
Şekil 4.193.	LZ, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-LZ yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	212
Şekil 4.194.	AgGSHAg ⁺ TRY, AgGSH, AgGSH ve Ag ⁺ , AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Ag ⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	214
Şekil 4.195.	Ag ⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	214
Şekil 4.196.	Zamanla değişen AgGSHAg ⁺ TRY absorbansları.....	215
Şekil 4.197.	AgGSHAg ⁺ TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	216
Şekil 4.198.	AgGSHHg ²⁺ TRY, AgGSH, AgGSH ve Hg ²⁺ , AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Hg ²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	217
Şekil 4.199.	Hg ²⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	217
Şekil 4.200.	Zamanla değişen AgGSHHg ²⁺ TRY absorbansları.....	218
Şekil 4.201.	AgGSHHg ²⁺ TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	219
Şekil 4.202.	AgGSHNi ²⁺ TRY, AgGSH, AgGSH ve Ni ²⁺ , AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Ni ²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	220
Şekil 4.203.	Ni ⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	220
Şekil 4.204.	Zamanla değişen AgGSHNi ²⁺ TRY absorbansları.....	221
Şekil 4.205.	AgGSHNi ²⁺ TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	222

Şekil 4.206.	AgGSHZn ²⁺ TRY, AgGSH, AgGSH ve Zn ²⁺ , AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Zn ²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları.....	223
Şekil 4.207.	Zn ⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b).....	223
Şekil 4.208.	Zamanla değişen AgGSHZn ²⁺ TRY absorpsiyonları.....	224
Şekil 4.209.	AgGSHZn ²⁺ TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm).....	225
Şekil 4.210.	TRY, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-TRY yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları.....	226
Şekil 5.1.	Girişim grafikleri; AgGSHNi ²⁺ Cys (a); AgGSHCo ²⁺ Cys (b); AgGSHCd ²⁺ Cys (c); AgGSHCu ²⁺ Cys (d); AgGSHHg ²⁺ Cys (e); AgGSHCu ²⁺ His (f); AgGSHCo ²⁺ His (g); AgGSHHg ²⁺ His (h); AgGSHCo ²⁺ Arg (i); AgGSHHg ²⁺ Arg (i); AgGSHCo ²⁺ Lys (j); AgGSHHg ²⁺ Lys (k); AgGSHHg ²⁺ Met (l).....	229
Şekil 5.2.	AgGSHNi ²⁺ Cys, AgGSHCo ²⁺ Cys ve AgGSHHg ²⁺ Cys için uygulanan türev spektroskopisinin grafiği.....	236
Şekil 5.3.	AgGSHCo ²⁺ His için uygulanan türev spektroskopisinin grafiği	237

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.	Protein yapılarını oluşturan 20 çeşit amino asit.....	5
Tablo 5.1.	Sonuçların literatür ile karşılaştırılması.....	239

ÖZET

Anahtar kelimeler: Amino asit, nanoparçacık, protein, enzim, UV, FTIR, AFM

Gümüş nanoparçacıklar sahip oldukları üstün optik özelliklerinden dolayı bilim dünyasında sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Çeşitli organik molekülleri ile modifiye edilebilmeleri kullanım alanlarını genişletmiştir. Bir tripeptid olan glutatyon, modifiye araçlarından biridir. Glutatyon ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıklarının UV-Vis spektroskopisi ile tayin edilebilmesi kolay, hızlı ve ucuz tayin metotlarının geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Bu tezde sentezlenen gümüş nanoparçacıkları glutatyon ile modifiye edilerek metal iyonu bulunan ortamda amino asit, protein ve enzim tayinlerinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} metal iyonları kullanılarak 20 temel amino asit, 3 protein ve 3 enzim üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Olumlu sonuç alınan maddelerin UV spektroskopisi ile kantitatif tayin limitleri belirlenerek FTIR spektroskopisi ile etkileşim yapıları incelenmiş, atomik güç mikroskopu ile de modifiye gümüş nanoparçacıkları ve oluşan son yapıların topografik görüntüleri elde edilmiştir.

PRODUCTION OF SILVER NANOMATERIALS AND USE FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF SOME BIOLOGICAL SUBSTANCES

SUMMARY

Key Words: Amino acid, nanoparticle, protein, enzyme, UV, FTIR, AFM

With their unique facile surface chemistry and optical properties, silver nanoparticles have been used frequently in the scientific world. Nanoparticles can be modified with various organic molecules to facilitate their applications in different fields. Glutathione is a molecular tripeptide has been utilized for the surface modification of nanoparticles. Glutathione modified silver nanoparticles can be determined by UV-Vis spectroscopy which could be applied to the development of easy, fast and inexpensive detection techniques.

In this thesis synthesized silver nanoparticles has been modified with glutathione. In the presence of modified nanoparticles and metal ions, amino acid, protein and enzyme determinations were investigated. For this purpose, Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} metal ions used and 20 basic amino acids, 3 enzymes and 3 proteins were carried out. Limits of quantifications identified by UV spectroscopy and interaction structures were predicted by FTIR spectroscopy. Topographic images of the modified silver nanoparticles and resulting structures were obtained by atomic force microscopy.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Nano boyutlu parçacıklar geleceğin teknolojisi olarak görülmekte ve pek çok alanda uygulanabilirliği araştırılmaktadır. Nano boyut kavramı ilk olarak Nobel ödüllü bilim adamı Richard Feynman tarafından kuramsal olarak ortaya atılmıştır. 1959 yılında Amerikan Fizik Topluluğunun toplantısında yaptığı “Aşağıda Daha Çok Yer Var (There’s Plenty of Room at the Bottom)” adlı konuşmasında 24 cilt ansiklopedinin bir toplu iğne başı kadar yere niçin yazılamadığını sorgulayıp, minyatürleştirme ve elektron mikroskoplarının geliştirilmesi gerekliliğinden bahsetmiştir. Bu konuşması 1960 yılında Engineering and Science Magazine dergisinde yayınlanmıştır [1]. Nanoteknoloji terimi ise ilk kez Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Taniguchi 1974 yılında yazdığı makalesinde [2] “nanoteknoloji temel olarak malzemelerin bir tek atom ya da molekül tarafından işlenmesini, ayrıştırılmasını, sağlamaştırılmasını ve deformasyona uğramasını kapsamaktadır” şeklinde nanoteknolojinin tanımını yapmıştır. Kim Eric Drexler’in 1981 yılında moleküler mekanik, protein dizaynı, sentetik kimya, hesaplama, doku karakterizasyonu üzerine yazdığı makale [3] ve 1986 yılında yazdığı “Yaklaşan Nanoteknoloji Çağı (The Coming Era of Nanotechnology)” adlı kitabı [4] ile nanoteknolojik çalışmalar ivme kazanmıştır. 1986 nobel fizik ödülüne layık görülen Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer taramalı tünellemeli mikroskopi tekniğini 1981 yılında geliştirmişlerdir [5]. Bu gelişme nanoteknoloji alanının yapı taşlarından biri olarak kabul edilmektedir. Sumio Iijima tarafından 1991 yılında karbon nanotüplerinin keşfi [6] nanoteknoloji alanındaki son büyük buluş olarak görülmektedir.

Biyosferde var olan tüm organizmalar yaşamın devamı için birçok önemli bileşiğe ihtiyaç duymaktadır. Organizmalar için elzem olan bu bileşikler, bilimsel gelişmelerin ışığında pek çok yapay ürün yapımında da kullanılmaktadır. Amino asitler, proteinler ve enzimler üç önemli biyolojik madde grubudur. Bu üç grup fonksiyonları açısından farklılık gösterse de yapıları açısından büyük benzerlikler

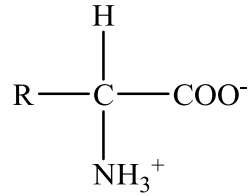
içermektedir. Amino asitler protein sentezinde kullanılmaktayken enzimler ise katalizör proteinler olarak adlandırılabilir. Bu bileşiklerin kalitatif ve kantitatif tayinleri için pek çok araştırma ve uygulama yapılmıştır. Temel enstrümantal tekniklerin dışında yapılan araştırmalar yapılacak analizin hızlılığı, basitliği, ucuzluğu ve seçiciliği üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu tezin konusu bu üç önemli biyolojik madde grubundan seçilmiş bazı bileşenlerin yeni bir yöntem ile tayininin araştırılması üzerinedir. Bu amaçla gelişmekte ve uygulama alanı artmakta olan nanoteknolojik araştırmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan literatür çalışmaları sonunda nanoparçacıklar ile yapılan tayin metotlarına ulaşılmıştır. Bu çalışmalar baz alınarak nanoparçacık modifikasyonu yoluna gidilmiş ve gümüş nanoparçacıklar bir peptid olan glutatyon molekülü ile modifiye edilmiştir. Sentezlenen modifiye gümüş nanoparçacıkları kullanılarak 20 amino asit, 3 protein ve 3 enzimin tayini araştırılmıştır. Tez konusu ve çalışma planlarının yapıldığı zaman diliminde, araştırılması düşünülen kimyasalların uygulanan metot ile analizi konusunda literatürde detaylı bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu eksikliğin giderilmesi amacıyla modifiye gümüş nanoparçacıkları (AgGSH) hazırlanarak analiz yöntemlerine eklenebilecek yeni ve orijinal bir metot geliştirilmeye çalışılmıştır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

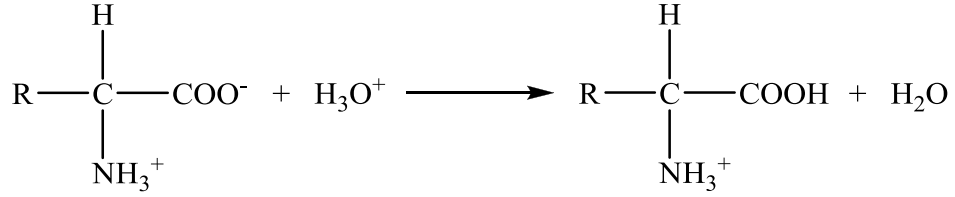
2.1. Amino Asitler

Amino asitler proteinlerin yapı taşları olup protein sentezinde ortak kullanılan toplam 20 çeşit amino asit mevcuttur. Tablo 2.1’de amino asitlerin uluslararası kullanımda kabul gören üç harf ve tek harf gösterimleri ile pK_1 , pK_2 , pK_R ve pI değerleri gösterilmektedir. Bahsedilen amino asitlere ilaveten protein üzerinde sonradan oluşan türev amino asitler de mevcuttur. Amino asitler renksiz ve suda çözünebilir bileşiklerdir. Üzerlerinde hem $-NH_2$ hem de $-COOH$ grubu taşımalarıyla amfoter özellik göstermektedirler. Her ne kadar çoğu yerdeki gösterimi yüksüz şeklinde olsa da amino ve karboksil gruplarının birbirleri ile etkileşmeleri sonucunda katı ve sulu çözeltilerinde yüklü konumda bulunurlar. Zwitter iyon halindeki bu yapı Şekil 2.1’de gösterilmiş olup karboksil grubunun hidrojenini amino grubuna sunmasıyla gerçekleşir. Oluşan iç tuz yapısı amino asitlerin yüksek derecelerde erimesine ve suda iyi çözünebilmelerine olanak sağlamaktadır.



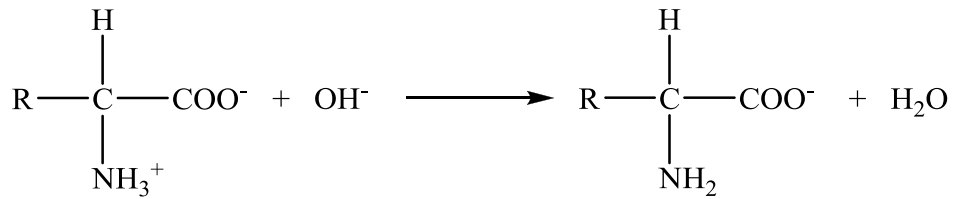
Şekil 2.1. Amino asitlerin genel gösterimi

Ortamin pH’ının değişmesi ile zwitter iyon yapısı bozunmaktadır. Düşük pH değerlerinde karboksilat grubu protonlanarak karboksilli asit haline gelir;



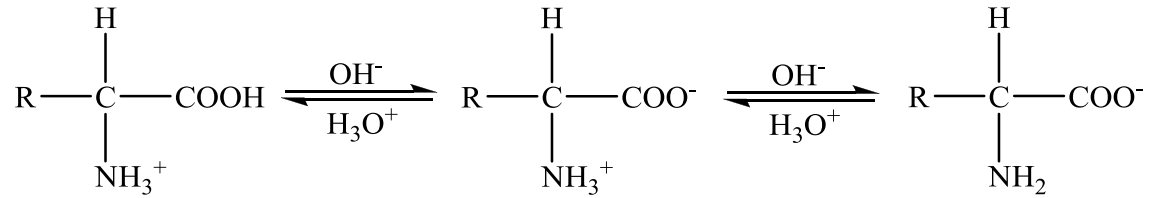
Şekil 2.2. Asidik ortamda amino asitlerin genel yapısı

Yüksek pH'larda ise amonyum katyonu proton kopması sonucu amino haline gelir;



Şekil 2.3. Bazik ortamda amino asitlerin genel yapısı

İki durumda da amino asit suda çözünür durumdadır. Asit ve bazı nötralize etmesi ile de tampon çözelti özelliği taşımaktadırlar; [7]



Şekil 2.4. Amino asitlerin tampon özelliği

Tirozin, triptofan ve fenilalanin dışındaki amino asitler görünür bölge ışığını absorplamazlar. 220 nm'den daha düşük dalga boylarında absorpsiyon vermeleri ve bu bölgede hava absorpsiyonunun olması tayinlerini zorlaştırmaktadır.

Amino asitler kırmızı et [8-14], balık eti [15-22], tavuk [23-26], süt [27-30], peynir [31-36], yumurta [37, 38], yengeç [39, 40], gibi hayvansal ürünlerde bulunabildiği gibi soya [41-46], pirinç [47-50], fındık, kestane [51-53], patates [54-56], tütün [57], mısır, arpa, buğday, çavdar ve bazı tohumlarda [58-64], elma, üzüm, mandalina,

hurma [65-68] gibi meyvelerde, brokoli, sarımsak, yeşil çay, şalgam [69-72] gibi bitkisel ürünlerde ve mantarlarda [73, 74] doğal olarak bulunabilmektedir.

Tablo 2.1. Protein yapılarını oluşturan 20 çeşit amino asit [75-77]

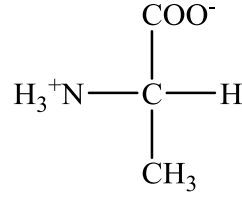
İsim	3 Harf	1 Harf	pK ₁ (-COOH)	pK ₂ (-NH ₃ ⁺)	pK _R (R Grubu)	pI
Alanin	Ala	A	2,34	9,69		6,01
Arginin	Arg	R	2,17	9,04	12,48	10,76
Asparagin	Asn	N	2,02	8,80		5,41
Aspartik asit	Asp	D	1,88	9,60	3,65	2,77
Fenilalanin	Phe	F	1,83	9,13		5,48
Glutamik asit	Glu	E	2,19	9,67	4,25	3,22
Glutamin	Gln	Q	2,17	9,13		5,65
Glisin	Gly	G	2,34	9,60		5,97
Histidin	His	H	1,82	9,17	6,00	7,59
İzölösün	Ile	I	2,36	9,68		6,02
Lösün	Leu	L	2,36	9,60		5,98
Lisin	Lys	K	2,18	8,95	10,53	9,74
Metiyonin	Met	M	2,28	9,21		5,74
Prolin	Pro	P	1,99	10,96		6,48
Serin	Ser	S	2,21	9,15		5,68
Sistein	Cys	C	1,96	10,28	8,18	5,07
Treonin	Thr	T	2,11	9,62		5,87
Triptofan	Trp	W	2,38	9,39		5,88
Tirozin	Tyr	Y	2,20	9,11	10,07	5,66
Valin	Val	V	2,32	9,62		5,97

2.1.1. Çalışmalarda kullanılan amino asitler ve literatür çalışmaları

Bu kısımda çalışmalarda kullanılan amino asitlerin yapıları, görevleri, özellikleri, yer aldıkları ilaç bileşimleri ve literatürde bulunan bazı farklı tayin çalışmaları anlatılacaktır.

2.1.1.1. L-alanin (2-aminopropanoik asit)

L-alanin polar olamayan alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Şekil 2.5’de görüldüğü gibi R grubu yerinde bir adet -CH₃ grubu içerir.



Şekil 2.5. L-alanin amino asidinin yapısı

L-alanin insan vücudu tarafından sentezlenebilen amino asitler içerisinde yer almaktadır. Kas dokuları, merkezi sinir sistemi ve beyin için önemli enerji kaynaklarından biridir. Antikor üretimine katılması ile de bağışıklık sistemini güçlendirme etkisi mevcuttur. Kandaki miktarı hipoglisemi belirteci olarak görülmektedir [78]. Hipogliseminin artması ile de Sheehan sendromuna [79] ve hipopituitarizme [80] neden olmaktadır. Çevresel açıdan çift kabuklu yumuşakçaların hücre içi ozmolaritesini bozmaktadır [81]. Yemek endüstrisinde ise fermantasyon prosesinin izlenmesinde kullanılmaktadır [82]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Alanin powder-NutraBio) [83], kanser tedavisi (Elitek) [84], stres düzenleyiciler (Aminosyn electrolytes) [85] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Zhang ve Sun [86] misel elektrokinetik kromatografi yöntemini ve floresans detektör kullanarak alanin tayini yapmışlardır. Çalışmada amino asit naftalen-2,3-dikarboksialdehit kullanılarak türevlendirilmiştir. Tayin limiti $1,0 \times 10^{-8}$ M olarak belirtilmiştir. Borges ve Reis [87] akış enjeksiyon prosedürü ile kemiluminesans vasıtasıyla tayin gerçekleştirmişlerdir. Amino asit L-amino oksidaz enzimi vasıtasıyla oksidasyona tabi tutulmuştur. Oluşan hidrojen peroksit luminol katalizli hegzasiyanoferrat (III) ile reaksiyona sokularak kemiluminesans ölçümü yapılmıştır. Tayin aralığı 0,5 – 25,0 mmol/L olarak belirtilmiştir. Kwan ve arkadaşları [88] amperometrik biosensör geliştirmişlerdir. L-alanin dehidrojenaz (AlaDH), salisilat hidroksilaz (SHL) ve piruvat oksidaz (PyOD) enzimlerini içeren elektrot dizayn edilmiştir. AlaDH'nin alaninin spesifik dehidrojenasyonunu katalizlemesi sonucu ürün olarak NADH ve piruvat oluşmaktadır. SHL oluşan NADH ve oksijen varlığında, salisilatın geri dönüşümsüz dekarboksilasyon ve hidroksilasyonunu katalizlemektedir. PyOD oksijen ve fosfat varlığında piruvatın

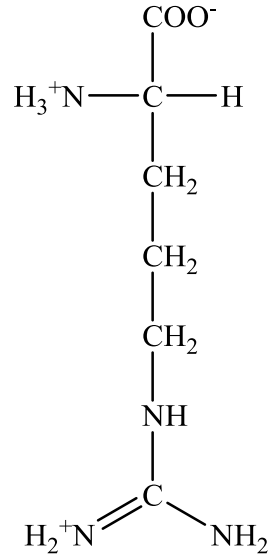
dekarboksilasyonunu katalizlemektedir. Son iki enzimatik reaksiyonda oksijen harcanmasına bağlı olarak ölçüm yapılmaktadır. Tayin aralığı 10 – 800 μM olarak belirtilmiştir. Cavani ve arkadaşları [89] kapiler elektroforez kullanılarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Toprak zenginleştirme için kullanılan hidrolize protein katkılarında alanin analizi yapılmıştır. 77 – 323 μM aralığında serbest L ve D-alanin içeriği saptamışlardır. Janasek ve Spohn [90] enzimatik tayin için akış enjeksiyon analiz prosedürünü kullanmışlardır. L-Alanin AlaDH vasıtasıyla piruvata dönüşmekte ve L-glutamat oluşmaktadır. L-glutamat, glutamat oksidaz ile katalizlenerek hidrojen peroksit üretmektedir. Hidrojen peroksit de luminolü oksitlemekte ve kemiluminesans oluşmaktadır. Son aşama Co(II) iyonları ile katalizlenmektedir. Kemiluminesans ölçümü ile tayin yapılmaktadır. Belirtilen tayin aralığı 2 – 1000 μM arasındadır. Serra ve arkadaşları [91] AlaDH ile ^{14}C işaretli L-alanini piruvik asit 2,4-dinitro-fenilhidrozon türevine çevirmişlerdir. Oluşan ürünün amberlite XAD-7 kolonunda tutulması ve elue edilmesi ile radyoaktif sayım yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.2. L-arginin (2-amino-5-guanidinopentanoik asit)

L-arginin pozitif yüklü ve bazik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.6'da gösterilmiştir. İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-arginin, kreatin sentezinde ve spermin, spermidin, agmatin gibi poliaminlerin sentezinde görev almaktadır. Vücutta biyoregülatör olarak geniş bir kullanım alanına sahip olan azot monoksitin öncüsü olması önemini arttırmaktadır [92]. Ayrıca plasenta büyümesinde, plasentaya kan akışında ve anneden fetusa besin aktarımında önemli görevleri mevcuttur [93]. Doku tamiri, hücre kopyalanması, kollajen sentezi [94], yaraların iyileşmesi, amonyak uzaklaştırılması, hormon salınımı [95] görevleri mevcuttur. Kandaki miktarının artması kanser [96], kardiyovasküler hastalıklar [97], akut hidrosefali [98], septisemi, travma ve hipertansiyon [99] gibi hastalıkların varlığıyla ilişkilendirilmektedir. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Arginine-NutraBio) [100], merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, üriner

bölge enfeksiyonları gibi organizma enfeksiyonları (Ceptaz) [101], doğuştan fibrinojen eksikliği olan insanlara dışarıdan fibrinojen desteği (Riastap) [102], stres düzenleyiciler (Aminosyn RF 5.2% sulfite free) [103] gibi ilaçların bileşiminde ve ayrıca şampuanlarda (Loreal elseve) [104] bulunmaktadır.



Şekil 2.6. L-arginin amino asidinin yapısı

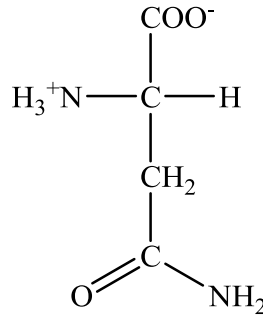
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Shen ve arkadaşları [105] erimiş slika doldurulmuş kapiler kullanarak elektroforez ile tayin yapmışlardır. UV dedektörü kullanılarak 195 nm'de ölçüm yapılmıştır. Tayin limiti 47,9 – 3195,2 µg/mL arası olarak belirtilmiştir. Chen ve arkadaşları [106] erimiş slika doldurulmuş kapiler kullandıkları misel elektrokinetik kromatografi yöntemi ile 240 nm'de tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin limiti 5 – 100 µg/mL olarak belirtilmiştir. Huang ve arkadaşları [107] yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) – kütle spektrometresi sistemini kullanarak insan kanında tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin limiti 1 µmol/L olarak belirtilmiştir. Wang ve arkadaşları [108] arginin nikel kompleksini kullanarak voltametrik olarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada civa elektrot kullanılmış ve tayin limit aralığı $1,0 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-6}$ mol/dm³ olarak belirlenmiştir. Miura ve arkadaşları [109] fluorometrik yöntemle tayin yapmışlardır. İlk aşamada serum örneğini perklorik asit ile deproteinizasyona tabi tutulmuş ikinci aşamada tiyol bileşikleri N-etilmaleimid ile bloke edilmiş son aşamada ise beta-siklodekstrin varlığında 2,3-naftelendikarbeldehit

ile floresans reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Orduna [110] enzimatik reaksiyon vasıtasıyla kantitatif analiz gerçekleştirmiştir. L-arginin, arginaz enzimi vasıtasıyla üreye, üre üreaz enzimi vasıtasıyla amonyuma, amonyum alfa-ketoglutarat ve NADH varlığında glutamat dehidrojenaz enzimi vasıtasıyla L-glutamat'a dönüşmektedir. NADH konsantrasyon azalmasına göre tayin gerçekleştirilmektedir. Geri kazanım oranları % 98,3 - % 104,4 arasındadır. Koncki ve arkadaşlarının [111] yaptığı enzimatik tayinde ise amonyum seçici elektrot kullanılarak potansiyometri kullanılmıştır. Üreaz ve arginaz enzimleri bir önceki çalışmaya benzer şekilde reaksiyona sokulup oluşan amonyum iyonlarını ölçmeye dayalı bir metot uygulamışlardır. Tayin aralığı 0,1 – 30,0 mM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilmiştir.

2.1.1.3. L-asparagin (2-amino-3-karbamoilpropanoik asit)

L-asparagin polar ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. L-asparagin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-asparagin sinir sistemi düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır ve antioksidan özellik göstermektedir [112]. Asparaginaz enzimi, çocuklarda akut lösemi tedavisinde önemli role sahiptir. Enzim, antitümör aktivite göstererek asparagin aspartik asit ve amonyağa dönüşmesinde kullanılmaktadır. Asparagin azalması sonucu lösemili hücrelerde protein sentezinin gerçekleşmemesi, lösemili hücrelerin ölümüne neden olmaktadır [113]. İlaç

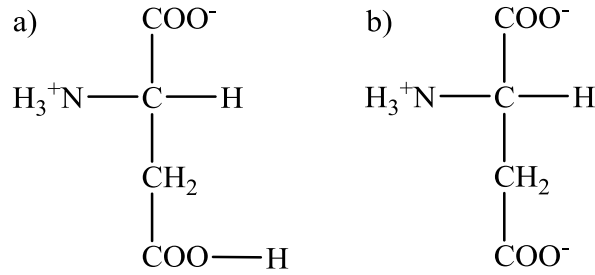
sektöründe kullanım alanları araştırıldığında sadece kalp damar tıkanıklığının tedavisinde kullanılan ilaç (Tnkase) [114] bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Plata-Guerrero ve arkadaşları [115] asparagin amino asidinin glukoz, fruktoz gibi şeker bulunan ortamlarda yüksek sıcaklıklarda akrilamide dönüştüğünü belirterek patates içerisinde glukoz ve fruktoz şekerleri ile asparagin varlığını araştırmışlardır. Asparagin o-fitaldialdehit ile türevlendirilerek floresans dedektörü kullanılan HPLC ile analizi yapılmıştır. Jung ve arkadaşları [116] bir mikrobiyal kültürün gelişmesinde asparaginin etkisi incelemiş ve ESR yöntemi ile asparagin tayini yapmışlardır. Asparaginin bakır (II) ile yaptığı kompleks miktarı ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir. Stein ve arkadaşları [117] akış enjeksiyon sistemi kullanarak spektrometrik ve potansiyometrik olarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Asparaginaz enzimi sisteme tutturulmuş ve asparagin hidrolizi ile oluşan amonyağın asit-baz indikatörü kullanılarak spektrometrik, pH elektrodu kullanılarak da potansiyometrik ölçümleri yapılmıştır. Spektrometrik metodun tayin aralığı 0,2 – 2,3 mmol/L, potansiyometrik metodun tayin aralığı 0,1 – 4,0 mmol/L olduğu belirtilmiştir. Fatibello-Filho ve arkadaşları [118] aspartaz enzimini amonyak gazı duyarlı proba sabitleyerek potansiyometrik tayin yapmışlardır. Tayin aralığı $1,6 \times 10^{-5}$ – $1,5 \times 10^{-5}$ M olarak belirlenmiştir. Brassat ve arkadaşları [119] gaz kromatografisi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Nikolelis [120] asparaginaz enzimi vasıtasıyla asparaginin hidrolizi ve oluşan amonyağın anyonyak gaz sensörü ile ölçülmesine dayalı bir metot geliştirmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.4. L-aspartik asit (aminobutanoik asit)

L-aspartik asit asidik amino asitler içerisinde gösterilse de iyonlaşmış hali olan aspartat negatif yüklü R grubuna sahip amino asitler içerisine girer. Asit yapısı ve iyonlaşmış yapısı Şekil 2.8'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. L-aspartik asit amino asidinin (a) asit ve (b) aspartat yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-aspartik asit beyin, sinir sistemi hücreleri ve karaciğerde bulunmaktadır [121]. Beyincik, testis, plazma ve idrarda varlığı tespit edilmiştir [122]. Vücut içerisinde salınımının artması vücut içi veya dışındaki ağrıların algılanması ile ilişkilendirilmektedir [123]. Potasyum tuzu, kalp rahatsızlıklarının tedavisi, karaciğer hastalıkları ve diyabet tedavisinde kullanılmaktadır [124]. Alzaymırlı hastaların beyinlerinde normal insanlara göre daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir [125]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Aspartic acid-NutraBio) [126], ülser (Famotidine injection) [127], gıda takviyesi (Trophamine) [128] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

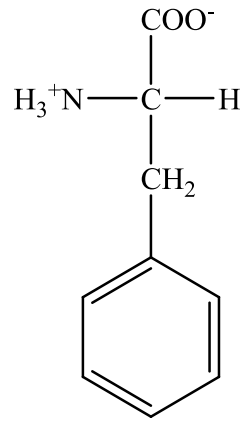
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Das ve arkadaşları [129] floresent prob kullanarak tayin yapmışlardır. 2-(2-piridil) benzimidazol ve Cu(II) kompleksi ile etkileştirildiğinde aspartik asit ligand ile yer değiştirmekte ve güçlü bir floresans sinyali elde edilmektedir. Tayin aralığı 10 – 1000 μM olarak belirtilmiştir. Benesova ve arkadaşları [130] dentin tabakasındaki aspartik asidi HPLC ile tayin etmiş ve sonuçları GC verileri ile karşılaştırmışlardır. Gao ve arkadaşları [131] hidrojen peroksit ve sodyum tiyosiyanatın alkali ortamda Cu(II) katalizi ile oluşan osilasyon reaksiyonuna dayanarak tayin yapmışlardır. Aspartik asit artışı ile osilasyon şiddeti değişmektedir. Tayin aralığı $1,17 \times 10^{-5} - 7,10 \times 10^{-8}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Lee ve arkadaşları [132] tris (2,2'-bipiridil)ruthenyum(II)-Ce(IV) sistemine aspartik asidin ilave edilmesi ile kemiluminesansın artmasına dayanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Aspartik asit, Ce(IV) ile radikal amine dönüşmekte ve $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{3+}$ ile reaksiyonu sonucu $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ oluşarak kemiluminesans oluşmaktadır. Tayin aralığı $2,0 \times 10^{-7} -$

$1,3 \times 10^{-5}$ M olarak belirtilmiştir. Zhao ve arkadaşları [133] kapiler elektroforez ve floresans dedektör kullanarak fare beyinlerinde tayin gerçekleştirmişlerdir. Aspartik asit naftalen-2,3-dialdehit ile türevlendirildikten sonra işlemler uygulanmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.5. L-fenilalanin (2-amino-3-fenilpropionik asit)

L-fenilalanin aromatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. L-fenilalanin amino asidinin yapısı

L-fenilalanin insan vücudu tarafından sentezlenememektedir. Metabolizmada fenilalanin düzensizliğinin olması fenilketonüre [134] ve hiperfenilalanin [135] hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Phenylalanine-NutraBio) [136], karaciğer rahatsızlıklarında besin takviyesi (Aminosyn HBC 7% Sulfite Free) [137], üremi hastalığının tedavisinde besin desteği (Hepatamine) [138], vücutta azot eksikli tedavisi (Travasol) [139] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Zhang ve arkadaşları [140] floresansa dayalı bir metot

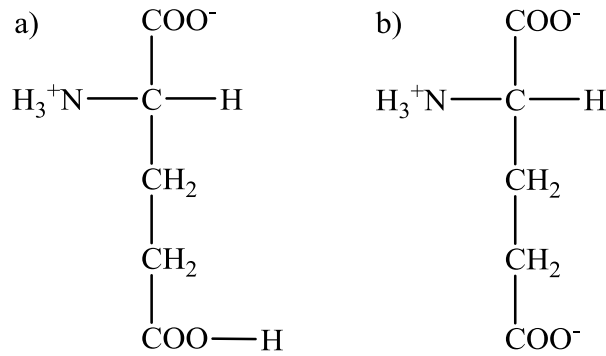
geliştirmişlerdir. Ninhidrin ve Eu^{3+} iyonunu filtre kağıdına tutturup fenilalanin ile reaksiyona sokulması sonucunda artan floresans şiddetlerini ölçmüşlerdir. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-3}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [141] floresansın artmasına göre değil azalmasına göre bir yöntem geliştirmişlerdir. Kukurbit[7]uril varlığında palmatin hidroklorit floresansının fenilalanin ilavesi ile azaldığını keşfetmişlerdir. Tayin aralığı $3,63 \times 10^{-8} - 9,68 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Hu ve arkadaşları [142] β -siklodekstrin ile karbon nanotüp bileşiminden yapılmış polianalin ile modifiye edilmiş elektrot kullanarak elektrokimyasal olarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Fenilalanini jele tutturup ölçüm almışlardır. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-4}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Tarhan ve Ayar-Kayalı [143] dietilaminoetil-selüloz reçinesini 2-amino-4,6-dikloro-s-triazin sonrasında hegzametilendiamin ve glutaraldehit ile modifiye etmişlerdir. Bu yapı üzerine fenilalanin dehidrojenaz enzimini tutturarak akış enjeksiyon sistemi vasıtasıyla HPLC analizi gerçekleştirmişlerdir. Shen ve arkadaşları [144] fenilalanin oksidaz görevi gören “taklitçi” madde sentezleyerek fenilalanin katalizini gerçekleştirmişlerdir. Hidrojen peroksit içerisinde beta-siklodekstrin ve m-karboksil benzen-sülfonil klorit, demir(III) klorit beraberinde reaksiyona sokulmuştur ve taklitçi enzim sentezlenmiştir. Fenilalanin taklitçi enzim ile katalizlenerek fenil-purivik aside bu yapıdan da hidrojen peroksit yardımıyla fenilasetik aside dönüşmektedir ve 292 nm de absorbans ölçümü yapılmaktadır. Tayin aralığı 0 – 0,8233 mmol/L olarak belirtilmiştir. Wibrand [145] fenilalanin amonyak-liyaz enzimi kullanarak fenilalanini sinamat’a çevirmiş ve UV absorbansına dayanarak tayin gerçekleştirmiştir. Tayin aralığı 100 – 1469 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirtilmiştir. Deng ve Deng [146] kan örneklerindeki fenilalanini gaz kromatografisi/kütle spektrometresi ile tayin etmişlerdir. Sasaki ve arkadaşları [147] iyon seçici elektrot geliştirmişlerdir. PVC membran, trifloroasetofenon türevleri kullanılarak hazırlanmıştır. Fenilalanin, amino ve karboksilat grupları ile trifloroasetofenon moleküllerine bağlanmaktadır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-4} - 1,0 \times 10^{-2}$ M olarak belirtilmiştir. Huang ve arkadaşları [148] karbon elektrodu salisilat hidroksilaz, tirozinaz ve fenilalanin dehidrojenaz enzimleri ile modifiye etmişlerdir. Salisilat hidroksilaz, salisilatı oksijen ve NADH varlığında katekole çevirmektedir. Tirozinaz ise katekolü o-kuinona yükseltgemekte ve elektrot yüzeyinde o-quinon tekrar katekole indirgenmektedir. Fenilalanin dehidrojenaz, salisilatın katekole dönüşümü sırasında ortaya çıkan NAD^{+} 'yı NADH

dönüştürürken fenilalanini de fenilpiruvata dönüştürmektedir. Oluşan NADH karbon elektrot ile tayin edilmektedir. Fenilalanin için tayin aralığı 20 – 150 µM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.6. L-glutamik asit (2-aminopentandioik asit)

L-glutamik asit asidik amino asitler içerisinde gösterilse de iyonlaşmış hali olan glutamat negatif yüklü R grubuna sahip amino asitler içerisinde girer. Asit yapısı ve iyonlaşmış yapısı Şekil 2.10'da gösterilmektedir.



Şekil 2.10. L-glutamik asit amino asidinin (a) asit ve (b) glutamat yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilmektedir. Glutamik asit merkezi sinir sisteminde en çok bulunan neurotransmitterlerdendir. Beynin öğrenme ve hatırlama gibi fonksiyonlarda görev aldığına inanılmaktadır [149]. Kandaki miktarının artması akut iskemik inme hastalığına neden olmaktadır [150]. Kanda aşırı miktarda bulunması glokom göz hastalıkları ile ilişkilendirilmektedir [151]. Merkezi sinir sisteminin travmatik veya iskemik hasarı sonrasında glutamik asidin hücre dışı sıvılara salınımı, retina ganglion hücrelerinin bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir [152]. Ayrıca vücut içerisinde salınımının artması vücut içi veya dışındaki ağrıların algılanması ile de ilişkilendirilmektedir [153]. Beyin yaralanmalarında aşırı salınımı gerçekleşir ki bu da sinir hücrelerinin enerji boşalımı

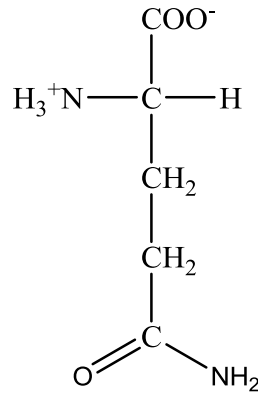
yoluyla ölmesine neden olmaktadır [154]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Glutamic acid-NutraBio) [155], üreme organları iltihabı tedavisi (Dienestrol) [156], multiple skleroz (MS) hastalığı tedavisi (Copaxone) [157], ağrı kesiciler (Darvon compound) [158], azot desteği ve dengelemesi (Aminosyn II in dextrose) [159] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Gao ve arkadaşları [160] hidrojen peroksit ve sodyum tiyosiyanatın alkali ortamda Cu(II) katalizi ile oluşan osilasyon reaksiyonuna dayanarak tayin yapmışlardır. Glutamik asit artışı ile osilasyon şiddeti azalmaktadır. Tayin aralığı $2,5 \times 10^{-6}$ – $3,2 \times 10^{-4}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Qu ve arkadaşları [161] sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi-kütle spektrometresi tandem sistemiyle fermantasyon ortamlarında herhangi bir amino asit türevlendirmesi yapmadan bu amino asidin tayinini gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 1000 µg/mL olarak belirtilmiştir. Beljaars ve arkadaşları [162] yaptıkları HPLC analizinde glutamik asidi N,N-dimetil-2-merkapt-etil-amonyum klorit ve o-fitaldialdehit ile muamele ederek kararlı floresans yapan kompleks elde etmişlerdir. Ballesteros ve arkadaşları [163] akış enjeksiyon sistemi kullanarak türbidimetrik bir tayin metodu geliştirmişlerdir. Glutamik asit, histidin ve 2-propanol ile birleştirilerek sisteme verilmiştir. Glutamik asit miktarına bağlı olarak histidin kristalizasyonunun 550 nm’de absorbansının ölçülmesi ile dolaylı bir tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 1 – 40 mg/L olarak belirtilmiştir. Mulchandani ve Bassi [164] modifiye enzim elektrot kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Glutamat oksidaz enzimi, triton-x ile muamele edilmiş tetratiyafulvalen modifiyeli karbon elektrot üzerine tutturularak tayin gerçekleştirilmiştir. Hattula ve Wallin [165] enzimatik tayin gerçekleştirmişlerdir. Glutamat dehidrojenaz varlığında glutamik asit nikotinamid adenin dinükleotit ile yükseltgenerek deaminasyona uğratılmış ve 2-oksoglutarat’a dönüştürülmüştür. Diaforez katalizinde gerçekleşen reaksiyonda ise oluşan NADH, 2-(p-iyodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorit’i 492 nm de absorbansı ölçülebilen formazan’a dönüştürmektedir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.7. L-glutamin (2,5-diamino-5-oksopentanoik asit)

L-glutamin polar ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.11’de gösterilmiştir.



Şekil 2.11. L-glutamin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-glutamin, entrosit ve aktive edilmiş limosit gibi hızlı üreyen hücrelerin ana enerji kaynağıdır [166]. Bağışıklık sistemine destek olmaktadır. Musin sentezini artırarak bağırsak mukoza yapısının korunmasını sağlamaktadır. Bakteri saldırılarına karşı epitel bariyeri sağlamlaştırarak bağırsaklarda bulunan mikroflora olgunlaşmasına destek olur [167]. Enfeksiyon ve yaralanma gibi enfeksiyonlu durumlarda glutamin desteği önerilmektedir [168]. Antrasiklin tabanlı kemoterapi süresince glutamin desteğinin mukoza iltihabının görülme sıklığını azalttığı gözlenmiştir [169]. Hayvanlarda bakterial translokasyonu düşürdüğü sonucuna varılmıştır [170]. Sarılık ile ilişkili olan endotoksemia'nın glutamin desteğiyle bastırıldığı gözlenmiştir [171]. Glutamin desteğinin tavuklarda büyüme performansını geliştirdiği ve bağırsak fonksiyonlarını düzenlediği gözlenmiştir [172]. Ayrıca bağırsak hastalıklarında da yatıştırıcı özellik gösterdiği belirtilmektedir [173]. Böbrekte bikarbonat üretimini desteklemektedir [174]. İnce bağırsağın ana metabolik yakıtıdır [175]. Oral yolla alındığında büyüme hormonu salınımını artırmaktadır [176]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas

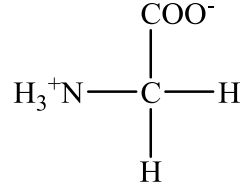
geliştirici (L-Glutamine-NutraBio) [177], mide ve bağırsak iltihabına neden olan rota virüsüne karşı (Rotarix) [178] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Liu ve arkadaşları [179] akış enjeksiyon sistemi kullanılarak kemiluminesans ölçümü yapmışlardır. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ çözeltisi içerisinde luminol- H_2O_2 - CuSO_4 sisteminin kemiluminesans sinyalini glutaminin azalttığı görülmüştür. Bakırın glutamin ile yaptığı kompleks sonucu azalmanın olduğu sonucuna varmışlardır. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-7} - 2,5 \times 10^{-6}$ olarak belirtilmiştir. Khuhawar ve Rajper [180] HPLC ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Glutamin, 2-hidroksinaftaldehit ile türevlendirilmiştir. Kato ve arkadaşları [181] HPLC ve kapiler elektroforezin birleştirilmesi ile oluşturulan kapiler elektrokromatografi metodu ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Kullanılan kolonlardan biri dimetiloktadesilklorosilan ile diğeri dimetiloktadesilklorosilan ve klorotrimetilsilan ile modifiye edilmiştir. Amino asit ise 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol ile türevlendirilmiştir. Dattelbaum ve Lakowicz [182] genetiği düzenlenmiş glutamin bağlama proteini kullanarak floresansa dayalı bir tayin metodu geliştirmişlerdir. Floresans ajanı olan akrilodan ve 2-(4-(iyodoasetamido)anilino)naftalen-6-sulfonik asit, mutant glutamin bağlama proteinine ayrı ayrı tutturulmuşlardır. Glutamin eklenmesiyle floresans sinyalininin azaldığını gözlemlemişlerdir. Tayin aralığı 100 – 300 M olarak belirtilmiştir. Huang ve arkadaşları [183] akış enjeksiyon ve amperometrik yöntemlerin birleştirilmesi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Kolon sistemi glutaminaz/glutamin oksidaz enzimleri ile modifiye edilmiştir. Bu enzimler vasıtasıyla glutamin hidrojen peroksida dönüştürülüp amperometrik olarak tayin gerçekleştirilmiştir. Aynı enzimler kullanılan benzer bir çalışma Villarta ve arkadaşları [184] tarafından yapılmış olup enzimler membran üzerine tutturulmuştur. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-6} - 7,5 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir. Aynı enzimler Cattaneo ve arkadaşları [185] tarafından kullanılmış ve oluşan hidrojen peroksidin luminol ile gerçekleşen reaksiyonuna bağlı olarak değişen kemiluminesans şiddetleri ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-3}$ M olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.8. Glisin (aminosetik asit)

Glisin polar olamayan ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Şekil 2.12’de gösterildiği gibi R grubu yerinde bir adet –H içerir.



Şekil 2.12. Glisin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen glisin’in doku yaralanmalarına karşı koruma görevi vardır [186]. Sinir sisteminde neurotransmitter olarak görev yapmaktadır [187]. Pek çok zararlı fenolik bileşiği zararsız forma dönüştürebilmektedir. Glikoneojenezin kontrolünde görevi mevcuttur. Ayrıca diğer amino asitlerin üretiminde kullanılan önemli bir azot kaynağıdır. DNA, RNA ve hemoglobin üretiminde de kullanılmaktadır. İskelet kası, dokuların geliştirilmesi ve kalitesinin oluşmasında önemli görevleri bulunmaktadır [188]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Glycine powder-NutraBio) [189], bağışıklık sisteminin antikor üretmediği durumlarda dışarıdan antikor desteği (Gamunex) [190], yetersiz büyüme hormonu salgılanan çocukların tedavisi (Genotropin) [191], multivitamin desteği (Cernevit) [192], analjezik (Ultiva) [193], organ nakillerindeki akut organ reddi hastalığının tedavisi (Simulect) [194], kuduz tedavisi (Bayrab) [195], tetanoz sonrası oluşan yaralanmaların engellenmesi (Baytet) [196], akciğer atardamar hipertensiyonu tedavisi (Flolan) [197], turner sendromu tedavisi (Humatrope) [198], azot desteği (Procalamine) [199], kronik sedef hastalığının tedavisi (Amevive) [200], doğuştan antitrombin eksikliği bulunan hastaların trombeembolik hastalığından korunması (Atryn) [201], solunum sistemi enfeksiyonlarının tedavisi (Augmentin chewable tablets) [202], hepatit A (Baygam) [203] ve B (Bayhep B) [204]’den korunma veya tedavisi, kalıtsal anjioödem ataklarından korunma (Berinert) [205], hipertansiyon hastalığının tedavisi (Dyazide) [206], diyabet hastalığı tedavisi (Exuberan) [207], hemofili A hastalığı tedavisi

(Alphanate) [208], bakteri kaynaklı akut ve kronik üriner bölge enfeksiyonlarının tedavisi (Geocillin) [209], gecikmiş alerjen duyarlılığı testi (Mumps skin test antigen) [210], morfin gibi ilaçların oluşturduğu kabızlığın tedavisi (Relistor) [211], şizofreni tedavisi (Risperdal) [212], migren tedavisi (Maxalt) [213], akromegali hastalığının tedavisi (Somavert) [214], Parkinson tedavisi (Zelapar) [215], epilepsi hastalarında meydana gelebilecek anemi ve karaciğer rahatsızlıklarının önlenmesi (Felbatol) [216], alzheimer tedavisi (Namenda) [217] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

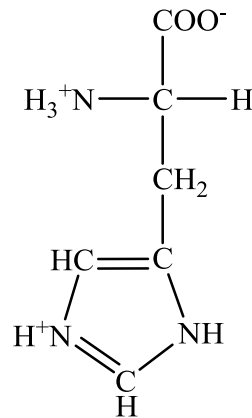
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Wilson ve arkadaşları [218] LC-MS/MS sistemi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Glisin fenilazotiyosiyanat ile türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 50 – 10000 ng/mL olarak verilmiştir. Pakhomova ve arkadaşları [219] hidrofilik çözücü n-butanol-etil asetat-aseton kullanarak glisini sudan ekstrakte edip kapiler elektroforez ile tayinini gerçekleştirmişlerdir. Zyablov ve arkadaşları [220] geliştirdikleri pizosensörde 1,2,4,5-benzoltetrakarbonik asit ve 4,4-diaminodifenikoksit kullanılarak oluşturulan polimer ile glisin etkileşimi sonucu değişen osilasyon frekansını ölçmüşlerdir. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir. Mitic ve arkadaşları [188] 1,2,4-trihidroksiantrakuinon bileşiğinin hidrojen peroksit ile yükseltgenmesine ilişkin reaksiyonda kobaltın katalitik aktivitesinin glisin varlığında azalmasından yararlanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 7,5 – 75,0 ng/mL olarak belirtilmiştir. Peinhardt [221] glisin çözeltisini hipoklorit ile muamele ederek formaldehit ve glioksilik asit ürünlerini elde etmiştir. Asitleştirme ve formaldehitin kaynatılarak uzaklaştırılması sonrasında glioksilik asit resorsinol ile reaksiyona tutularak bir lakton olan bis-2,4-dihidroksifenil asetik asit oluşturulmuştur. Bazik koşullar altında lakton violet oksonol anyonuna dönüşmekte ve ardından oluşan hidroliz reaksiyonu ile floresans yapan karboksilat anyonuna dönüşmektedir. Floresans şiddeti ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir. Mateo ve Calatayud [222] bakır (II) karbonatı fiziksel olarak poliester içerisine hapsetmişlerdir. Oluşan katı reçineyi akış enjeksiyon sisteminde kullanmışlardır. Glisinin oluşan yapı ile reaksiyonu sonucunda bakır (II) iyonları serbest kalmış ve bu iyonların atomik absorpsiyon spektrometresi ile ölçülmesi ile de dolaylı yoldan glisinin tayini gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 1,2 – 35,0 µg/mL olarak

belirtilmiştir. Qu ve arkadaşları [223] o-fitaldehit-tert-butiltiyol ile kolon öncesi türevlendirme yaparak camısı karbon elektrot kullanılan elektrokimyasal detektöre sahip HPLC ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 20 μM arası olarak belirtilmiştir. Zhou ve Chen [224] glisini N-bromosuksinamit ile amonyağa yükseltmişlerdir. Oluşan amonyak da N-bromosuksinamit ile uyarılarak azota yükseltgenmektedir. Azotun floresein ile raksiyona girmesi ile de floresein uyarılmakta ve durulurken de kemiluminesans yapmaktadır. Kemiluminesans şiddetinin ölçülmesi ile de glisin tayini gerçekleştirilmektedir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.9. L-histidin (2-amino-3-(4-imidazolil)propiyonik asit)

L-histidin pozitif yüklü R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.13’de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. L-histidin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-histidin biyolojik sistemlerde metal elementlerin aktarımında görevlidir [225]. Memelilerin merkezi sinir sisteminde nerotransmitter olarak görev yapmaktadır [226]. Beyin ve sinir sisteminin ana nerotransmitteri olan histamine dönüşebilmesi açısından da önemli bir amino asittir. Doku büyümesi ve tamiri için elzemdir, karaciğerde glikoz depolanmasına yardımcı

olur [227]. Kan, idrar ve serebrospinal sıvıdaki artışı histidinemia hastalığının ana belirticidir [228]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Histidine-NutraBio) [229], sedef hastalığının tedavisi (Stelara injection) [230], iltihaplı doku yaralanmalarının tedavisi (Ilaris) [231], astım tedavisi (Xolair) [232], kanda trombosit miktarının azlığı tedavisi (Nplate) [233], göğüs kanseri tedavisine yardımcı (Herceptin) [234], hemofili A (Bioclate) [235] ve B (Benefix) [236] tedavisi, solunum sistemi rahatsızlıklarının tedavisi (Synagis) [237], romatizma rahatsızlıklarının tedavisi (Simponi injection) [238], yumurtalık kanseri tedavisi (Doxil) [239], mukoza iltihabı tedavisi (Kepivance) [240], büyüme hormonu salınımı eksikliği tedavisi (Norditropin) [241] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

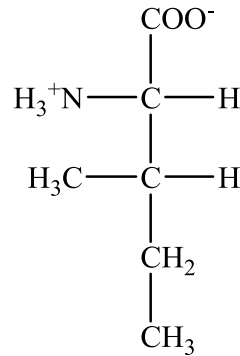
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Zhou ve arkadaşları [242] mikrodalga ile hızlandırılmış türevlendirme reaksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Türevlendirme işlemi floresein izotiyosiyanat floresesans ajanı ile gerçekleştirilmiştir. Türevlendirilen histidin kapiler elektroforez ile tayini gerçekleştirilmiştir. Tayin limiti 0,023 ng/mL olarak belirtilmiştir. Kurzatkowska ve arkadaşları [243] amperometrik tayin gerçekleştirmişlerdir. Altın elektrot bir metaloporfirin olan 5-(4-palmitoiloksifenil)-10,15,20-tris[3,5-di-tert-butil-4 hidroksifenil]porfirinato demir(III) klorit ile modifiye edilmiştir. Histidin porfirinin merkezinde bulunan demir(III) ile etkileşime girmektedir. Tayin aralığı 1 – 100 nM olarak belirtilmiştir. Pam ve arkadaşları [244] gerçekleştirdikleri voltametrik tayinde histidin-bakır kompleksini civa film elektrot üzerine biriktirmişlerdir. Tayin aralığı 0,02 – 0,12 ppm olarak belirtilmiştir. Gao ve Fan [245] ardışık enjeksiyon metodu ile kemiluminesans ölçümünden faydalanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Mangan(II) katalizinde luminol-hidrojen peroksit sisteminin kemiluminesansının histidin konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiğini gözlemlemişlerdir. Histidin mangan(II)'nin katalitik aktivitesini artırmaktadır. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-7}$ – $1,0 \times 10^{-3}$ M olarak belirtilmiştir. Kiba ve arkadaşları [246] tresil klorit ile muamele edilmiş poli(vinil alkol) polimerine histidin oksidaz enzimi tutturmuşlardır. Histidin, imidazol piruvat, amonyak ve hidrojen peroksite dönüşmekte oluşan hidrojen peroksit de luminol ile reaksiyona sokulmaktadır. Oluşturulan akış enjeksiyon sistemi ile kemiluminesans ölçümü yapılarak histidin tayini yapılmaktadır. Tayin aralığı 0,05 – 5,00 mM olarak belirtilmiştir. Yoshida ve arkadaşları [247] yaptıkları HPLC

tayininde histidini piren ile türevlendirerek floresans ölçümüne dayalı bir tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 20 – 20000 nM olarak belirtilmiştir. Elbrashy ve Alghannam [248] histidinin civa(II) ve demir(III) ile yaptıkları komplekslerin çökmesinden yararlanmışlardır. Santrifüj sonrası kalan çözelti atomik absorpsiyon spektrometresi ile ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilmiştir.

2.1.1.10. L-izolösin (2-amino-3-metilpentanoik asit)

L-izolösin polar olamayan ve alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.14’de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. L-izolösin amino asidinin yapısı

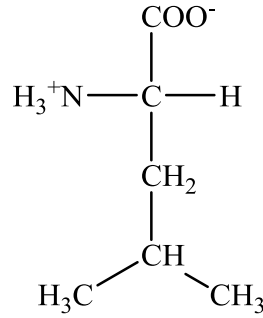
İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-izolösin iskelet kaslarının glukoz kullanımını düzenleyerek kandaki glukoz miktarını azaltır [249]. Karın boşluğunda üretilen sıvıda miktarının değişmesi karaciğer rahatsızlıkları ile ilişkilendirilmektedir [250]. Karaciğer nakillerinde de miktarının değiştiği gözlenmiştir [251]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Isoleucine-NutraBio) [252], karaciğer iltihabının neden olduğu hepatik koma durumunun tedavisi (Aminosyn HF 8%) [253], besin desteği (Nephramine) [254] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Xue ve arkadaşları [255] gaz kromatografisi-kütle spektrometresi sistemini kullanarak kanda tayin gerçekleştirmişlerdir. İzolösin, mikrodalga kullanılarak N-metil-N-trimetilsililtrifloroasetamid ile türevlendirilmiştir. Samy ve arkadaşları [256] orman atmosferinde bulunan izolösin miktarını sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi ile tayin etmişlerdir. Chen ve arkadaşları [257] kolza tohumu ile yapılan yemeklerde yakın-infrared reflektans spektroskopisi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Chang ve arkadaşları [258] kapiler elektroforez ve floresans dedektör kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Naftelen-2,3-dikarboksialdehit ile izolösin türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 50 – 250 μM olarak belirtilmiştir. Rigebello-Masini ve arkadaşları [259] ardışık ekstraksiyon yöntemi kullanmışlardır. Amino asit, floresans ajanı olan o-ftaldialdehit ile türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 0,5 – 10,0 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirtilmiştir. Chino ve arkadaşları [260] izolösin bağlayıcı proteini, akrilodan floresans ajanı ile modifiye ederek tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 4 μM olarak belirtilmiştir. Fang ve Liu [261] amino asitlerin ninhidrin ile belirlenmesinde absorpsiyon spektrumlarının çakışması nedeniyle PLS yöntemini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 0 – $2,48 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Lee ve Huh [262] L-amino asit oksidaz enzimini naylon membran üzerine sabitleyerek izolösin ile olan reaksiyonu sonucu oluşan amonyum iyonunun elektrot yardımı ile ölçülmesine dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 0,05 – 10,00 mM olarak belirtilmiştir. Kiba ve arkadaşları [263] lösin dehidrogenaz, NADH oksidaz ve peroksidaz enzimlerini vinil polimer taneleri üzerine tutturarak tayin gerçekleştirmişlerdir. İzolösin lösin dehidrogenaz enzimi katalizi ile NAD^+ beraberinde NADH ve 2-okso-4-metilvalerat oluşturmaktadır. Oluşan NADH, NADH oksidaz enzimi vasıtasıyla NAD^+ ve H_2O_2 'ye dönüşmektedir. Oluşan hidrojen peroksitin peroksidaz enzimi katalizliğinde luminol ile reaksiyona sokulmasıyla 3-aminoftalat ve emisyon ışığı oluşmaktadır. Emisyon şiddeti ölçülerek tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 30 nM – 5 μM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.11. L-lösin (2-amino-4-metilpentanoik asit)

L-lösin polar olamayan ve alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.15’de gösterilmiştir.



Şekil 2.15. L-lösin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-lösin rapamisin hedefi yolu vasıtasıyla protein sentezinde lider rol üstlenmektedir [264]. Amino asit uyarımlı glikojen sentezi artışı rapamisin tarafından durdurulmaktadır. Lösin glikojen sentaz enzimini rapamisin hedefi yolu vasıtasıyla aktive ederek iskelet kaslarında glukoz alımını etkiler. Bu işlem lösinin glukoz metabolizması ile ilgili enzimlerin fosforilasyonunu düzenlediği izlenimini doğurmaktadır [265]. Lösin bir pentapeptid olan enkephalinin bir parçasıdır ve bu peptid beyinde doğal olarak bulunan bir ağrı kesicidir. Ayrıca hamilelerde doğum sancısını ve süt akışını tetikleyen oksitosin hormonunun da bir parçasıdır [266]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Leucine powder-NutraBio) [267], prolaktin hormonunun kanda fazla bulunması ile ortaya çıkan hiperprolaktinematik hastalığının tedavisi (Dostinex) [268], azot desteği (Aminosyn II 3.5% in 25% dextrose) [269] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Rezaei ve Zare [270] karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot ile voltametrik olarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Karbon nanotüpler, lösin oksidasyonuna doğru elektrokatalitik aktiviteyi arttırmıştır. Tayin aralığı $9,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-3}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Stefan van Staden ve arkadaşları [271] L-amino asit oksidaz enzimi kullanılarak amperometrik tayin

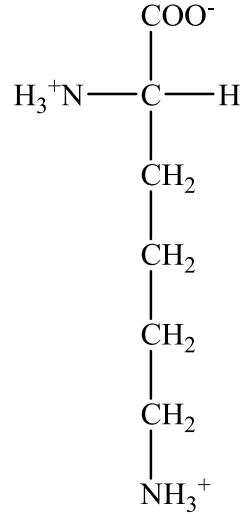
gerçekleştirmişlerdir. Enzim, lösin amino asidini ketoasidine ve hidrojen peroksida dönüştürmektedir. Hidrojen peroksidin ölçülmesiyle dolaylı bir tayin gerçekleştirilmektedir. Tayin aralığı 4,0 – 80,0 nm/L olarak belirtilmiştir. Mitome ve arkadaşları [272] lösin dehidrogenaz enzimi ile modifiye edilmiş kolon ile akış enjeksiyon sistemi vasıtasıyla tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 0,8 – 18,4 mg/dL olarak belirtilmiştir. Schweer ve arkadaşları [273] lösin amino asidini N-heptaflorobutiril izobutil ester ile türevlendirerek kanda GC/MS/MS sistemi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Kiba ve arkadaşları [274] lösin dehidrogenaz ve NADH oksidaz enzimi immobilize edilmiş aminlenmiş poli(vinil alkol) taneleri kullanarak akış enjeksiyon sistemi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Oluşan hidrojen peroksit ve luminol – hegzasiyonaferat(III) reaksiyonu ile oluşan kemiluminesans ölçülerek tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-7}$ – $6,0 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.12. L-lisin (2,6-diamino kaproik asit)

L-lisin pozitif yüklü ve bazik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.16'da gösterilmiştir. İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-lisin çocuk gelişimi açısından önemli bir amino asittir. Yağ asitlerinin enerjiye dönüştürülmesi ve kolesterolün düşürülmesine yardımcı olan karnitin maddesinin üretilmesinde görev almaktadır. Kalsiyumun vücutta absorblanması ve saklanmasına yardımcıdır. Kollajen üretiminde görev almaktadır. Vücut direncini artırmak amacıyla besin takviyesi olarak kullanılır. İlaçlarda kullanımıyla etkin maddelerin absorblanmasını ve biyoalınabilirliğini artırmaktadır [275]. Doğuştan gelen hiperlisinemia hastalığı lisin katabolizmasındaki hatalardan kaynaklanmaktadır [276]. Vücutta lisin eksikliği olması, bitkinlik, baş ağrısı, göz damarlarında bozulma, saç kaybı, kas kütlelerinde azalma, kalsiyum eksikliği, virüs enfeksiyonlarına bağışıklık sisteminin cevabında azalma, anemi ve üreme fonksiyonlarında bozukluğa neden olmaktadır [277]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Lysine-NutraBio) [278], diyabetik ülser (Regranex) [279], sistik fibrosis tedavisi (Cayston) [280],

doğuştan kalp damar hastalığı tedavisi (Neoprofen) [281] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.



Şekil 2.16. L-lisin amino asidinin yapısı

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Matsuda ve Asano [282] L-lisin-ε-oksidadz enzimi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Lisinin enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan hidrojen proksit, yaban turbu peroksidaz enzimi katalizliğinde fenol ve 4-aminoantipirinin oksidatif birleşmesine neden olmaktadır. Oluşan ürün 500 nm’de absorbans vermektedir. Lisin miktarı arttıkça oluşan peroksit ve dolayısıyla nihai ürün miktarının artışına bağlı olarak tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 0 – 0,5 mM olarak belirtilmiştir. Wang ve arkadaşları [283] akış enjeksiyon sistemi kullanmışlardır. Lisin amino asidinin tris(2,2-bipridil)rutenyum(II) ile reaksiyonu sonucu oluşan floresansın ölçümü yapılmıştır. Reaksiyon indiyum kalay oksit camsı yüzeyi üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-8}$ – $1,0 \times 10^{-4}$ g/mL olarak belirtilmiştir. Hasani ve arkadaşları [284] yapay sinir ağları sistemini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Lisin ve glisin amino asitlerinin 1,2-naftaquinon molekülü ile verdikleri reaksiyon sonucu oluşan absorbsiyon spektrumlarının çakışması üzerine yapay sinir ağları sistemi ile simultane tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 19 µg/mL olarak belirtilmiştir. Vega ve Aranda [285] lisin amino asidini 1-floro-2,4,-dinitrobenzen ile türevlendirdikten sonra yüksek basınçlı ince tabaka kromatografisi

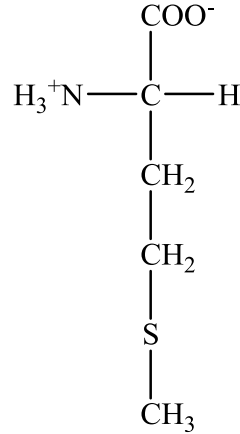
ile ayırımı gerçekleştirmişlerdir. Kantitatif tayin ise densitometri ile 360 nm'deki absorbans ölçülerek yapılmıştır. Tayin aralığı 25 – 125 ng/band olarak verilmiştir. Tabi ve arkadaşları [286] kapiler elektroforez ve lazer uyarımlı floresans dedektörü kullanılarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Lisin amino asidinin lisin dekarboksilaz enzimi ile katalizlenmesi ile oluşan kadeverin bileşiğinin 4-floro-7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol ile türevlendirilmesi sonrası lazer uyarımlı floresanas dedektör ile ölçüm yapılmıştır. Tayin aralığı 1 – 50 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirtilmiştir. Garcia-Villar ve arkadaşları [287] lisinin, lisin oksidaz enzimi ile gerçekleşen reaksiyonu sonucu oluşan amonyum iyonunun amonyum seçici elektrot ile ölçülmesine dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-4}$ – $7,0 \times 10^{-3}$ M olarak belirtilmiştir. Mitic ve arkadaşları [288] kobalt iyonunun katalitik aktivitesi vasıtasıyla 1,2,4-trihidroksiantrakınon bileşiğinin hidrojen peroksit ile oksitlenme reaksiyonunu kullanmışlardır. Ortamda lisin bulunduğu zaman kobalt iyonu ile kompleks oluşturmakta ve oksitleme ürününün verimini dolayısıyla absorbansını düşürmektedir. Tayin aralığı 0,118 – 1,470 $\mu\text{g/cm}^3$ olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilmiştir.

2.1.1.13. L-metiyonin (2-amino-4-(metiltiyo)butanoik asit)

L-metiyonin yüksüz ve alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.17'de gösterilmiştir. İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-metiyonin, protein sentezinin yanında transmetilasyon reaksiyonlarına da katılmaktadır. Sistein ve homosistein sentezinde kullanılmaktadır. Çeşitli damar hastalıklarına neden olan hiperhomosisteinemia hastalığının belirlenmesinde kandaki metiyonin miktarına bakılmaktadır [289]. Sülfür kaynağı olmasıyla saç, deri ve tırnaklardaki bozuklukları önlemektedir. Ayrıca karaciğerde lesitin üretimini artırarak kolesterolün düşürülmesine yardımcı olur [290]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-Methionine-NutraBio) [291], parkinson hastalığının tedavisi (Permax) [292], damarlarda kan pıhtılaşmasını engelleyici veya tedavisi (Argatroban) [293], doğum kontrol hapları (Depo-SubQ Provera) [294], kısırlık tedavisi (Follistim AQ cartridge) [295], akut böbrek hastalıklarının tedavisine

yardımcı besin desteği (Aminosyn RF 5.2% sulfite free) [296] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.



Şekil 2.17. L-metiyonin amino asidinin yapısı

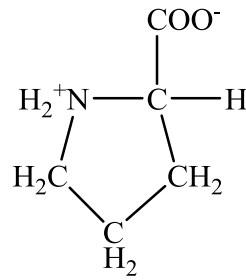
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Ramautar ve arkadaşları [297] kapiler elektroforez-kütle spektrometresi sistemi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Silika bazlı sol-jel kapiler kolon kullanılmıştır. Tayin aralığı 62,5 – 1000,0 ng/mL olarak belirtilmiştir. Pedrero ve arkadaşları [298] yaptıkları amperometrik tayinde rutenyum ve rutenyum dioksit ile modifiye edilmiş grafit-etilen/propilen/dien (GEPD) ve grafit-teflon (GPTFE) komposit elektrotlarını kullanmışlardır. Tayin aralıkları Ru-GPTFE için $2 \times 10^{-3} - 30 \times 10^{-3}$ mol/L, RuO₂-GPTFE için $6 \times 10^{-3} - 30 \times 10^{-3}$ mol/L, Ru-GEPD için $0,20 \times 10^{-3} - 8,00 \times 10^{-3}$ mol/L, RuO₂-GEPD için $0,1 \times 10^{-3} - 10,0 \times 10^{-3}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Blasco ve arkadaşları [299] akış enjeksiyon sistemi dizayn etmişlerdir. Yapılan UV tayininde amino asit o-ftaldehit-N-asetil-L-sistein molekülü ile türevlendirilerek absorbands ölçülmüştür. İlaç içerisinde bulunan diğer bileşenlerin absorpsiyonu ile hedef bileşiğin absorpsiyonu örtüştüğü için kantitatif tayin için PLS kemometrik metodu kullanılmıştır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-4} - 5,0 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir. Henrique ve arkadaşları [300] metiyonin amino asidinin pentasiyanoferrat(II) ile verdiği tersinir redox reaksiyonu vasıtasıyla voltametik tayin gerçekleştirmişlerdir. Khan ve Iqbal [301] elektrokimyasal dedektör ile eşleştirilmiş HPLC tekniği kullanmışlardır. Metiyonin amino asidi cihaza verilmeden önce trifloroasetikasit çözeltisi içerisinde tris(2-karboksietil) fosfin ile muamele

edilmiştir. Tayin aralığı 0,2 – 10000,0 ng/mL olarak belirtilmiştir. Yang ve arkadaşları [302] mayada bulunan metiyonin amino asidini GS-MS kullanarak tayin etmişlerdir. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanmasında izotop seyreltme tekniği kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilmiştir.

2.1.1.14. L-prolin (pirolidin-2-karboksilik asit)

L-prolin polar olamayan alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.18’de gösterilmiştir.



Şekil 2.18. L-prolin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-prolinin sinir hücrelerini tahrip eden bir etki gösterdiği bulunmuştur. Tavuklar ile yapılan deneylerde hafıza kaybına neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca stres uyarımlı dopamin ve serotonin metabolizmasını etkileyerek yatıştırıcı etkisini tetiklediği sonucuna varılmıştır [303]. Biyolojik sıvılarda prolin ölçümü ile kemik rahatsızlıkları, tümörler ve kronik üremi hakkında bilgi edinilebilmektedir [304]. Vücut sıvılarında fazla bulunması böbrek yetersizliğinin belirteçlerindedir [305]. Sinirsel rahatsızlıklar, felç, hafıza geriliği gibi sonuçlara yol açan hiperprolinemia, prolinin metabolizmal döngüsünde meydana gelen bozukluklar sonucu ortaya çıkmaktadır. Merkezi sinir sisteminde kısıtlayıcı nerotransmitter olarak görev yapmaktadır. Beyin korteksinde oksidatif stresi uyarır, antikonvülzan gibi davranır, bitkilerde su ve tuzda kaynaklanan strese karşı dokuları korur, hipertansiyon ve kalp rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan anjitenin çevirici enziminin ana parçasıdır [306]. İlaç sektöründe kullanım alanları

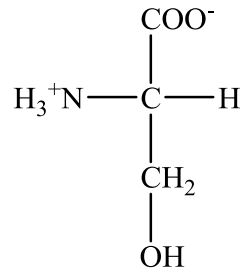
araştırıldığında kas geliştirici [307], bağışıklık sistemi hastalıklarının tedavisi (Privigen) [308], besin desteği (Aminosyn II 3.5% in 5% dextrose) [309] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Zhang ve arkadaşları [310] CdTe kuantum noktaları kullanarak anodik elektrokemiluminesans ölçümüne dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. Kuantum noktaları tiyoglikolik asit ile modifiye edilmiştir. Modifiye CdTe kuantum noktaları ve prolin bulunan hücreye potansiyel uygulandığında meydana gelen floresans prolin miktarı arttıkça artmıştır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-4}$ g/mL olarak belirtilmiştir. Saito ve arkadaşları [311] bal içerisinde bulunan prolini tayin etmek için sıvı kromatografisi tekniği kullanmışlardır. Bal içerisinde bulunan diğer türler o-ftaldehit kullanarak türevlendirilmiş ve prolinde ayırılmıştır. Ayırım sonrası prolin florenilmetil kloroformat ile türevlendirilerek UV dedektörü vasıtasıyla ölçülmüştür. Tayin edilen konsantrasyon aralığı 369 – 1930 $\mu\text{g/g}$ bulunmuştur. Sun ve arkadaşları [312] kapiler elektroforez sisteminde silika kapiler ile ayırım yaparak elektrokemiluminesans ölçümü yapmışlardır. Kemiluminesans ajanı olarak $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ kullanılmıştır. Elektrot yüzeyinde oluşan $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ prolini yükseltgerken kendisi $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$ haline gelmektedir. Oluşan $\text{Ru}(\text{bpy})_3^+$, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ ile reaksiyon vermesi ile de uyarılmış hal $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+*}$ oluşmaktadır. Tayin aralığı 0,1-80 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirtilmiştir. Davydova ve arkadaşları [313] prolinin halkalı yapısının UV absorpsiyonu vermesinden dolayı direkt olarak absorbans ölçümlerine dayanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı $0,3 \times 10^{-3} - 1,5 \times 10^{-5}$ M olarak belirlenmiştir. Evgenev ve Evgeneva [314] amino asidin dinitrobenz-2,1,3-oksadiazol ile reaksiyonu sonucu oluşan türevin absorbans ölçümlerine dayanarak seçici tayin metodu geliştirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 40 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirtilmiştir. Simonian ve arkadaşları [315] geliştirdikleri biyosensörde *Pseudomonas sp.* hücrelerinin oksijen tüketerek prolini seçici olarak yükseltgemesinden faydalanmışlardır. Değişen oksijen konsantrasyonu, oksijen membran elektrodu kullanılarak ölçülmüştür. Bu hücrelerin polivinil alkol jeli içerisine hapsedilmesiyle biyosensör oluşturulmuştur. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$ mol/L olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.15. L-serin (2-amino-3-hidroksipropiyonik asit)

L-serin polar olamayan ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.19'da gösterilmiştir.



Şekil 2.19. L-serin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-serin biyosentez ve fosforilasyon gibi birçok biyolojik prosese katılır. Örneğin serin proteas enziminin enzimatik reaksiyonu serinin hidroksil grubunun nükleofilik atağı ile başlar [316]. Homokiral demet oluşturma eğilimi göstermesi nedeniyle enantiyoselektif yer değiştirme reaksiyonlarına maruz kalması, prebiyotik kimyasal reaksiyonlarının anahtar oyuncusu yapar [317]. Nöronal sağ kalma ve farklılaşmada ana rol oynar. Serin eklenmiş ortamda nöronal sağ kalma, dendritogenesis, sinaptogenesis ve matürasyonun elektrofizyolojik özellikleri nörotrophin bulunan ortama göre daha iyidir [318]. Fosfatidilserin ve seramid gibi yağların oluşumuna katılır. Serin biyosentezinde doğuştan meydana gelen hatalar çeşitli rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Serin eksikliği sendromu bulunan hastalarda mikrosefali, felç, psikomotor tepkilerde yavaşlama, kanda serin ve glisin miktarında düşüklük, serebrospinal sıvının çok düşük olması gibi nörolojik rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır [319]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında sadece azot desteği veya azot dengelenmesinde kullanılan ilaç (Aminosyn II 4.25% in 25% dextrose) [320] bileşiminde bulunmaktadır.

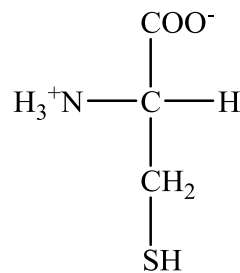
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Yaqoob ve Nabi [321] hazırladıkları akış enjeksiyon sisteminde cam küreler üzerine serin dehidrataz enzimi tutturarak bir kolon hazırlamışlardır. Enzimin amino asit ile gerçekleşen reaksiyonu sonucu oluşan amonyum, hipoklorit varlığında fenol ile reaksiyona sokulmaktadır. Oluşan ürünün mavi rengi kullanılarak absorban ölçümleri yapılmıştır. Tayin aralığı 0,2 – 1,0 mM olarak belirtilmiştir. Kato ve arkadaşları [322] kapiler elektrokromatografi yönteminde kullandıkları silika kolonu dimetiloktadesilklorosilan ile modifiye etmişlerdir. Floresans ölçümleri için ise amino asit 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol ile türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 0,025 – 2,000 µM olarak belirtilmiştir. Hasegawa ve arkadaşları [323] gaz kromatografisi-kütle spektrometresi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Serin uçucu olmaması nedeniyle N,O-di-(+)- α -metoksi- α -triflorometilfenilasetil metil esterini ile türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 1,1 – 22,0 nmol/mL olarak belirtilmiştir. Fukushima ve arkadaşları [324] floresans ölçümüne dayalı HPLC tekniğini kullanmışlardır. Amino asit oktadesilsilika kolona verilmeden önce 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol ile türevlendirilmiştir. Tayin aralığı 0 – 7,5 µM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.16. L-sistein (2-amino-3-merkaptopropiyonik asit)

L-sistein polar ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.20’de gösterilmiştir. İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-sistein sülfür içeren amino asitlerdendir. Heprain, biotin, lipoid asit, koenzim A gibi pek çok biyokimyasalın metabolizmasına katılmaktadır. Yemek ve ilaç sektöründe antioksidan ve biyolojik işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Vücutta düşük miktarlarda bulunması çocuk gelişiminde yavaşlama, saçta depigmentasyon, ödem, uyuşukluk, karaciğer rahatsızlıkları, kilo ve kas kaybı, deri lezyonları ve zayıflık gibi hastalıklara neden olabilmektedir [325]. Kandaki miktarının fazla olması durumunda ise kalp ve kardiyovasküler rahatsızlıklar, parkinson, alzaymır gibi hastalıklar için risk faktörü oluşturduğu belirtilmektedir [326]. İlaç sektöründe kullanım alanları

araştırıldığında pankreasa ait salgı uyarımı ile pankreatik ekzokrin fonksiyon bozukluğunun belirlenmesi (Chirhostim) [327], sigarayı bıraktırma (Zyban) [328], koroner arter rahatsızlıklarının belirlenmesinde miyokardiyel perfüzyon ajanı (Cardiolite) [329], cushing sendromu hastalarında hipofiz ve ektopik adrenakortikotropik hormonunun üretimini ayırt etme (Acthrel) [330], mamografi ile birlikte hastalarda doku bozulmasının değerlendirilmesi (Miraluma) [331], depresif hastalıkların tedavisi (Wellbutrin SR) [332] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.



Şekil 2.20. L-sistein amino asidinin yapısı

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Jia ve arkadaşları [333] Ni(OH)₂ nanoparçacıkları ile hazırlanan Ni(OH)₂ ultra ince film ile modifiye edilmiş elektrot kullanarak seçici tayin yapmışlardır. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen redoks reaksiyonu sonucu oluşan NiOOH sistein ile reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyon sonucu Ni(OH)₂ oluşmakta ve yükseltgenme akımı Ni(OH)₂ miktar arttıkça artmaktadır. Tayin aralığı 10 µM – 1 mM olarak belirtilmiştir. Yoshitake ve arkadaşları [334] floresans ölçümüne dayalı sıvı kromatografisi yöntemi kullanmışlardır. 7-dietilamino-3-[[4'-(iyodoasetil)amino}fenil]-4-metilkumarin ile yapılan ilk türevlendirmeyle amino asidin sülfhidril grubu, 4-floro-7-nitrobenz-2-okso-1,3-diazol kullanılarak yapılan ikinci türevlendirmeyle amino asidin amino grubu reaksiyona sokulmuştur. Bu iki grubun enerji transferi ile oluşan floresans ölçülmüştür. Tayin aralığı 0,8 – 80,0 µM olarak verilmiştir. Lu ve arkadaşları [335] boron diprometen diflorit bazlı floresans yapan prob geliştirmişlerdir. Fenol ile türevlendirilmiş boron diprometen diflorit molekülünün 2,4-dinitrobenzensülfonil ile yaptığı reaksiyon sonucu düşük floresans sinyali oluşmaktadır. Ortama sistein eklenmesiyle gerçekleşen nükleofilik aromatik

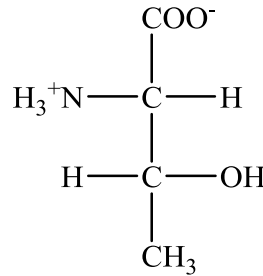
yer değiştirme reaksiyonu sonucu floresans sinyalinin arttığı gözlenmiştir. Tayin aralığı 2 – 12 μM olarak belirtilmiştir. Wei ve arkadaşları [336] karboksimetil selüloz ile modifiye edilmiş altın nanoparçacıkları ile sistein etkileşiminden yararlanarak tayin gerçekteşirmişlerdir. Modifiye nanoparçacıklar üzerine NaCl bulunan ortamda sistein eklendiğinde agregasyon meydana gelmektedir. Bunun sonucu olarak da çözeltilerin rengi ve dolayısıyla absorbansı değişmektedir. Tayin aralığı 10 – 100 μM olarak belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [337] floresans yapabilen 5-(3-(2-(naftalen-3-iloksi)asetil)tiyoüreido)-1,3,4-tiyadiazol-2-kaboksilik asit organik molekül nanoparçacıklarını sentezleyerek sistein etkileşimi vasıtasıyla tayin gerçekteşirmişlerdir. Sisteinin bağlanması ile nanoparçacık agregasyonunun oluşması sonucu floresans sinyali kırmızıya kayma göstermiştir. Tayin aralığı 0 – 100 μM olarak belirtilmiştir. Yang ve arkadaşları [338] altın katalizi ile gerçekteşen luminol – hidrojen peroksit kemiluminesans sinyalinin ortama sistein eklenmesi ile azalmasından yararlanılarak tayin gerçekteşirmişlerdir. Sisteinin altın koloitlerine bağlanması ile altının kataliz etkisinin azalması sonucu kemiluminesans sinyali azalmıştır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-9}$ – $7,0 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Naik ve arkadaşları [339] hekzasiyanoferrat(II) bileşiği içerisindeki siyanür grubunun nitroso-R-tuzu vasıtası ve civa(II) katalizi ile yer değiştirme reaksiyonunun sistein eklenmesi ile inhibe edilmesinden faydalanmışlardır. Sistein civa(II) ile etkileşerek katalizör konsantrasyonunu ve dolayısıyla gerçekteşen reaksiyon miktarını düşürmektedir. Reaksiyon sonucu oluşan yeşil renkli ürünün absorbansı ölçülerek dolaylı sistein tayini yapılmıştır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-7}$ M olarak belirtilmiştir. Kargosha ve arkadaşları [340] sistein çözeltilisi içerisine potasyum iyodat çözeltilisi ekleyerek sisteini okside etmiş ve ortaya çıkan karbon monoksit gazını azot gazı vasıtasıyla infrared gaz hücresine göndermişlerdir. Toplanan karbon monoksit gazının 2170 cm^{-1} deki absorpsiyonu kullanılarak tayin gerçekteşirilmiştir. Tayin aralığı 6 – 300 mg/L olarak belirtilmiştir. Ruiz-Diaz ve arkadaşları [341] yaban turbu peroksidaz enzimi ile hidrojen peroksit katalizörlüğünde katekol molekülünü yükseltgeyerek elektrokimyasal indirgenme akımının camsı karbon elektrot ile ölçmesine dayalı bir metot geliştirmişlerdir. Ortama eklenen sistein katekol ile reaksiyon vermekte ve oluşan elektrokimyasal akım sinyalini düşürmektedir. Tayin aralığı 0,05 – 90,00 μM olarak belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [342] altın nanoparçacıkları ile sistein etkileşiminin rezonans ışık saçılma şiddetinin değiştirmesinden faydalanmışlardır.

Etkileşim sonucu oluşan ağ sinyal şiddetini arttırmaktadır. Tayin aralığı 0,01 - 0,25 µg/mL olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilmiştir.

2.1.1.17. L-treonin (2-amino-3-hidroksibutirik asit)

L-treonin polar ve yüksüz R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.21’de gösterilmiştir.



Şekil 2.21. L-treonin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-treonin, yara bandajlarında deri onarımı ve yaranın iyileşmesini hızlandırıcı etkisi nedeniyle kullanılmaktadır [343]. Vücuttaki azot dengesini düzenlemeye yardımcı olur. Kardiyovasküler, karaciğer, merkezi sinir sistemi, bağırsak ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarını destekler. Kanda fazla bulunması sitrullinemi (üre döğüsünde bozukluk), sepsis, azot dengesizliği gibi hastalıkların belirteçidir [344]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-threonine-NutraBio) [345], anjiyoödem tedavisi (Cinryze) [346], beyin tümörü tedavisinde radyoterapiye ilave olarak (Temodar) [347], azot desteği (Aminosyn II 8,5%) [348] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

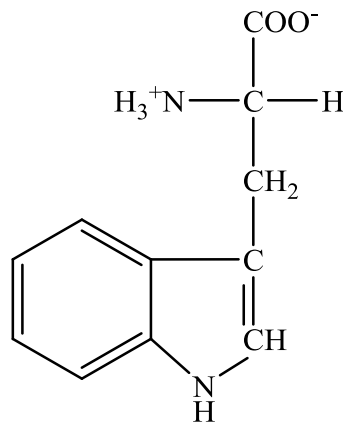
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Marrubini ve arkadaşları [343] fenilizotiyosiyanat ile kolon öncesi türevlendirme yapılıp UV detektörü ile HPLC analizi yapmışlardır. Ueatronghit ve Asano [344] enzimatik tayin gerçekleştirmişlerdir. Threonin, NAD⁺ bulunan ortamda L-treonin 3-dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla 2-amino-3-oksobutirat molekülüne

yükseltgenmektedir ve kendiliğinden dekarboksilasyona uğrayarak aminoaseton ve karbondioksit oluşmaktadır. Oluşan ürünün absorpsiyonunun ölçülmesi ile tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 10 – 3000 μM olarak belirtilmiştir. Oka ve arkadaşları [349] gaz kromatografisi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Threonin periyodik asit ile asetaldehite yükseltgenmekte ve 2,4-dinitrofenilhidrazin ile hidrazona çevrilmektedir. Hidrazon n-heptan ile ekstrakte edilmekte ve gaz kromatografisi ile analiz edilmektedir. Zhao ve arkadaşları [350] uyguladıkları HPLC metodunda threonini kolona vermeden önce 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol ile floresans yapan türevine dönüştürmüşlerdir. Tayin aralığı 0,05 – 50,00 pmol olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.18. L-triptofan (2-amino-3-(3-indolil)propiyonik asit)

L-triptofan aromatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.22’de gösterilmiştir.



Şekil 2.22. L-triptofan amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-triptofan bir nerotransmitter olan serotoninin öncüsüdür ve miktarının artması ile serotonin üretimi arttığından antidepresan etki göstermektedir [351]. Günümüzde psikolojik rahatsızlıklar,

uykusuzluk, bağımlılık, obezite gibi pek çok rahatsızlıkta reçeteye yazılan bir ilaç olarak kullanılmaktadır [352]. Metabolizmasında meydana gelen bozukluklar sonucu beyinde, halüsinasyon, şizofreni gibi durumların muhtemel nedeni olan toksik maddeler üretilir. Şizofreni, hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. İnsan saçındaki miktarının saç pigmentine etki ettiği saptanmıştır [353]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-tryptophan-NutraBio) [354], azot desteği (Aminosyn II 5% in 25% dextrose) [355] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

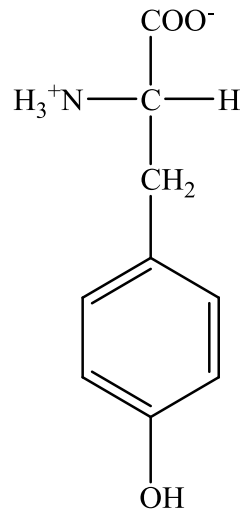
Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Ensafi ve arkadaşları [356] N-(3,4-Dihidroksifeniletıl)-3,5-dinitrobenzamid ile modifiye edilmiş karbon nanotüp pasta elektrodu kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Hazırlanan bu elektrot ile triptofanın elektrokatalitik oksidasyonu gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 0,7 – 270,0 µmol/L olarak belirtilmiştir. Lizuka ve arkadaşları [357] triptofanı R(-)-4-(3-isotiyosiyano-pirolidin-1-il)-7-(N,N-dimetilaminosulfonyl)-2,1,3-benzoksadiazol ile kolon öncesi türevlendirdikten sonra floresans dedektörü kullanılan sıvı kromatografi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Huang ve arkadaşları [358] infrared ölçümüne dayalı optik sensör geliştirmişlerdir. Poli(vinilbenzil klorit) polimeri L-prolin ile modifiye edildikten sonra ortama nikel iyonu ilave edilerek kompleks bir yapı elde edilmiştir. Daha sonra eklenen triptofan nikel ile etkileşerek altı kordinasyonlu kompleks yapıya dönüşmektedir ve yapının FTIR spektrumu değişmektedir. Tayin aralığı 10 – 600 µM olarak belirtilmiştir. Wu ve arkadaşları [359] 3,4-difenilsinnolin, iridyum ve N,N'-bivinilester-¹H, ¹H-[2,2'] bibenzimidazol kompleks yapısının Ce(IV) ile verdiği reaksiyonun kemiluminesans yaptığını keşfetmişlerdir. Bu sisteme eklenen triptofanın Ce(IV) ile etkileşerek yükseltgenmesi meydana gelen floresans sinyalinin azalmasına neden olmaktadır. Tayin aralığı $5,0 \times 10^{-7}$ – $2,0 \times 10^{-5}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Gao ve arkadaşları [360] Belousov-Zhabotinskii osilasyon kimyasal sistemini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. KBrO₃, CH₂(COOH)₂, H₂SO₄ ve Ce(SO₄)₂ den oluşan sisteme triptofan eklendiğinde osilasyon düzeninin, triptofanın sistem reaksiyonları sonucu oluşan Br₂ ile reaksiyon vermesi neticesinde değiştiği gözlenmiştir. Periyot ve genişlik değişimleri analitik sinyal olarak kabul edilmiştir. Tayin aralığı $6,44 \times 10^{-7}$ – $2,55 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir. Chuang ve Chen [361]

gümüş nanoparçacıkları üzerine adsorbe olan triptofan amino asitlerinin yüzey artırılmış raman saçılma sinyalini değiştirmesinden faydalanarak kalitatif tayin gerçekleştirmişlerdir. Triptofanın karboksilat ve amino gruplarının şiddetlerinde meydana gelen değişimler baz alınmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.19. L-tirozin (2-amino-3-(4-hidroksifenil)propionik asit)

L-tirozin aromatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.23'de gösterilmiştir.



Şekil 2.23. L-tirozin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenebilen L-tirozin, memelilerin merkezi sinir sisteminde bulunan dopamin, tiroksin gibi neurotransmitter maddelerin öncüsüdür. Azot dengesinin kurulmasında ve devam ettirilmesinde gereklidir. Tirozin eksikliği albinizm ve alkaptonuria hastalıklarına neden olabilmektedir. Miktarının artması ise kardeş kromatid değişiminin nedeni olarak kabul edilebilmektedir [362]. Parkinson hastalığı, depresyon ve diğer ruhsal bozukluklara sahip hastalarda tirozin miktarının fazla olduğu bulunmuştur [363]. Memeli merkezi sisteminde bulunan noradrenalin ve adrenalin hormonlarının öncüsüdür [364, 365]. İlaç sektöründe kullanım alanları

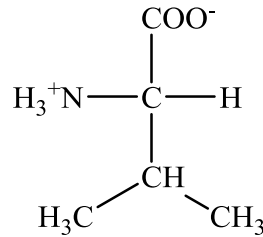
araştırıldığında kas geliştirici (L-tyrosine-NutraBio) [366], mide ve bağırsak iltihabına neden olan rota virüsüne karşı (Rotarix) [178], çocuklar için azot desteği (Aminosyn PF 7% Sulfite Free) [367] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Fan ve arkadaşları [368] nafyon ve TiO₂-Grefen nano komposit madde ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanılarak tayin gerçekleştirmişlerdir. TiO₂-Grefen modifiye elektrot, modifiye olmayan elektroda göre tirozinin yükseltgenmesinde elektrokatalitik aktiviteyi arttırmıştır. Tayin aralığı 10 – 160 µM olarak belirtilmiştir. Ma ve arkadaşları [369] Mn doplanmış CdSe kuantum noktalarının oluşturduğu fotoluminesansın ölçümüne dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. Manganın yaban turbu peroksidaz enzimi ile konjuge edilmesiyle tirozin ve hidrojen peroksit arasındaki reaksiyon katalizlenmiştir. Oluşan son sistemde Mn doplanmış CdSe kuantum noktaları ile enzim arasında elektron transferi gerçekleşmiş bunun sonucu olarak da floresans sinyalinde azalma gerçekleşmiştir. Tayin aralığı 0,05 – 0,55 µg/mL olarak belirtilmiştir. Li [370] tirozinaz enzimi sabitlenmiş yumurta kabuğu membranı kullanarak absorpsiyon ölçümüne dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. Tirozinin enzimatik yükseltgenmesi sonucu oluşan dopaquinon molekülü ile 3-metil-2-benzo-tiyazolinon hidrazon bileşiği arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu mavi renk oluşmaktadır. Tayin limiti 5 – 200 µM olarak belirtilmiştir. Zhu ve Xu [371] β-siklodekstrin ile Mo(VI)-fenil-floron floresans bileşiğini türevlendirmişlerdir. Bu yapıya tirozin eklenmesi ile floresans sinyalinin azaldığı görülmüştür. Tirozin ve β-siklodekstrin molekülünün oluşturduğu kompleksin geniş yapısı kalkan gibi davranarak floresans sinyalinin azalmasına neden olmuştur. Tayin aralığı 0,3 – 20,0 µg/mL olarak belirtilmiştir. Lin ve arkadaşları [372] asitlendirilmiş tris(2-aminoetil)amin, Ni²⁺ ve tirozinin oluşturduğu kompleks yapının infrared spektrumunu alarak tayin gerçekleştirmişlerdir. C=C çift bağından oluşan ve 1515 cm⁻¹'e kaymış olan pik şiddetinin tirozin eklenmesi ile arttığı görülmüştür. Tayin aralığı 600 – 1000 µM olarak belirtilmiştir. Zhang ve arkadaşları [373] floresans dedektörü kullandıkları HPLC analizinde kolon öncesi 4-floro-7-nitrobenzofuran ile tirozini türevlendirmişlerdir. Tayin aralığı 1 – 320 µM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.1.1.20. L-valin (2-amino-3-metilbutanoik asit)

L-valin polar olamayan alifatik R grubuna sahip amino asitler içindedir. Yapısı Şekil 2.24'de gösterilmiştir.



Şekil 2.24. L-valin amino asidinin yapısı

İnsan vücudu tarafından sentezlenemeyen L-valinin kanda bulunma miktarının siroz hastalarında azaldığı görülmüştür. Hipoalbuminemia tedavisinde kullanılmaktadır [374]. Ana olarak kas gibi dokularda enerji kaynağı olarak metabolizlendiğine inanılmaktadır [375]. İnsülin salınımını düzenlenmesinde, merkezi sinir sisteminde besin alınımı ve enerji dengelenmesinde görev alır [376]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (L-valine-NutraBio) [377], anjiyoödem tedavisi (Cinryze) [346], çocuklar için azot desteği (Aminosyn PF 7% Sulfite Free) [378] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

Literatürde bu amino asidin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Gao ve arkadaşları [379] hidrojen peroksit ve sodyum tiyosiyanat arasında gerçekleşen bakır(II) katalizli osilasyon reaksiyonunu kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Valin bir seri reaksiyon sonucu oluşan peroksihipotiyosiyanat iyonu ile yükseltgenmektedir. Osilasyon düzeninin bozulması ile sistemde oluşan ürün kompleksinin yaşam süresi uzamakta ve osilasyon periyodu valin eklenmesi ile artmaktadır. Tayin aralığı $2,77 \times 10^{-5} - 5,52 \times 10^{-4}$ M olarak belirtilmiştir. Liang ve arkadaşları [380] bakır elektrot kullanarak elektrokimyasal olarak tayin

gerçekleştirmişlerdir. Bakır elektrot hafif bazik ortamda yükseltgenerek kendini izole eden bakır(II) filmi oluşturmaktadır. Ortama eklenen valinin oluşan bakır(II) ile kompleks yapması elektrodun anodik çözünmesini artırmakta dolayısıyla anodik akım sinyali amino asit miktarı arttıkça artmaktadır. Tayin aralığı 25 – 500 μM olarak belirtilmiştir. Kabelova ve arkadaşları [381] floresans dedektör kullandıkları HPLC metodunda valini kolon öncesi 6-aminokuinolin-N-hidroksi-suksinimidil karbamat ile türevlendirmişlerdir. Shen ve arkadaşları [382] kapiler elektroforez kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Kapiler içerisinde slika dolgu kullanılmıştır. Valin 2,4-dinitroflorobenzen ile türevlendirilerek diğer bileşenlerden ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ayrım sonrası UV absorban ölçümü yapılmıştır. Tayin aralığı 10 – 700 μM olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu amino asit tayin edilememiştir.

2.2. Proteinler

Proteinler hücrelerde en fazla bulunan makromoleküller olup hücrelerin kuru ağırlığının yaklaşık % 50'sini teşkil ederler. Fonksiyonu ve biyolojik aktivitesi ne olursa olsun, bütün proteinler 20 standart amino asitten meydana gelmiştir. Amino asitlerin gerçek bir biyolojik aktivitesi yoktur. Buna rağmen polipeptit zincirlerine yapı taşı olarak girdikten sonra oluşturdukları proteinlerin bir kısmı enzim aktivitesine, bir kısmı hormon aktivitesine, bir kısmı antikor aktivitesine sahip olup bir diğer kısmı ise yapısal fonksiyon görmek üzere özelleşmiştir [383]. Çok sayıda değişik proteinin genel kabul gören sabit bir sınıflandırması yoktur. Araştırmacılar genellikle organizmadaki görevlerine göre sınıflandırmayı tercih etmektedir. Bu sınıflandırma aşağıdaki gibi yapılabilir:

- Fibriller yapıda olup organizmaya destek veren ve dayanıklılık sağlayan yapısal proteinler.
- Bazı hücre ve organizmada yer alan, şekil değiştirmeye ve hareket etmeye yardımcı olan hareket sistemi proteinleri.
- Katalitik aktiviteye sahip protein molekülleri olan enzimler.

- Kan plazmasında bulunan bazı spesifik molekül ve iyonlara bağlanarak bunları bir organdan diğerine taşıyan taşıyıcı proteinler.
- Karaciğerden aldığı lipitleri diğer organlara taşıyan lipoproteinler.
- Bitki tohumlarında embiryonun büyümesi için depo edilen besin proteinleri.
- Organizmayı, diğer canlılara ve yaralanmalara karşı koruyan savunma proteinleri.
- Hücrel ve fizyolojik aktiviteleri düzenleyen, regülasyon sağlayan proteinler veya hormonlar [383,384].

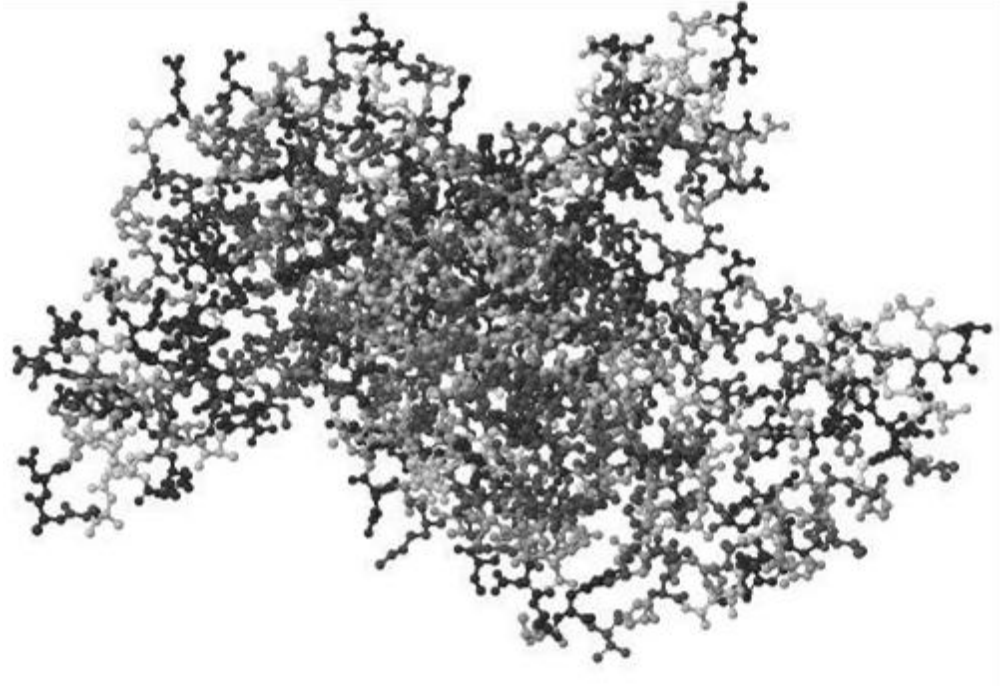
Proteinler molekül yapılarına göre ise birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Peptid bağlarıyla birbirine bağlanmış amino asitlerin doğrusal dizisi proteinin birincil yapısı olarak adlandırılır. Sistein amino asitleri arasındaki kovalent disülfid bağlarının konumları da birincil yapıya dahildir. Bir proteindeki ikincil yapı polipeptid zinciri bölgelerinin düzenli katlanmasıyla ilgilidir. İkincil yapının en yaygın iki tipi α -sarmal ve β -kıvrımlı tabakadır. α -sarmal, polipeptid zincirindeki amino asitlerin silindirik ve çubuksu sarmal düzenlenmesidir. Polipeptid zinciri, sarmal eksene paralel olan hidrojen bağlarınınca sürdürülür. Bir β -kıvrımlı tabakada ise polipeptidlerin bitişik bölümleri arasında hidrojen bağları oluşur. Polipeptidler aynı yönde veya zıt yönde uzanabilirler. β -dönüşler, polipeptid zincirinin yönünü ters çevirir. Bir proteindeki üçüncül yapı, polipeptid zincirindeki bütün amino asitlerin üç boyutlu düzenlenmesi ile ilgilidir. Biyolojik olarak aktif olan doğal konformasyon, çoklu kovalent olmayan bağlarla sürdürülür. Eğer bir protein, birden fazla polipeptid zincirinden oluşmuşsa dördüncül yapıya sahiptir denir. Bu durum polipeptid alt birimlerinin uzaysal düzenlenmesiyle ve bunlar arasındaki etkileşimlerin doğasıyla ilgilidir [385].

2.2.1. Çalışmalarda kullanılan proteinler ve literatür çalışmaları

Bu kısımda çalışmalarda kullanılan proteinlerin yapıları, görevleri, özellikleri, yer aldıkları ilaç bileşimleri ve literatürde bulunan bazı farklı tayin çalışmaları anlatılacaktır.

2.2.1.1. Sığır serum albumini (BSA)

BSA'nın yapısında iki polipeptid zinciri bulunmaktadır. A zincirinin kristal yapısı Şekil 2.25'de [386] gösterilmiştir. Yapısında 583 amino asit bulundurmaktadır.



Şekil 2.25. Sığır serum albumininin A zincirinin ikincil yapısı

BSA organizmanın kan dolaşım sisteminde en çok bulunan ve suda çözünebilen proteindir. Yağ asitleri, hormonlar, ilaç alımı sonrası oluşan moleküller gibi pek çok endojen ve eksojen maddenin taşınmasında ve biriktirilmesinde görevler almaktadır [387, 388]. Ayrıca osmotik basıncın ve kanın pH'ının korunmasında görev alır [388, 389]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kızamık aşısı (Attenuvax) [390], kızamıkçık aşısı (Meruvax) [391], kabakulak aşısı (Mumpsvax) [392], suçiçeği aşısı (Proquad) [393], japon ensefalit aşısı (Ixiaro) [394], difteri, tetanos, boğmaca, çocuk felci aşısı (Pentacel) [395] gibi ilaçların bileşiminde bulunmaktadır.

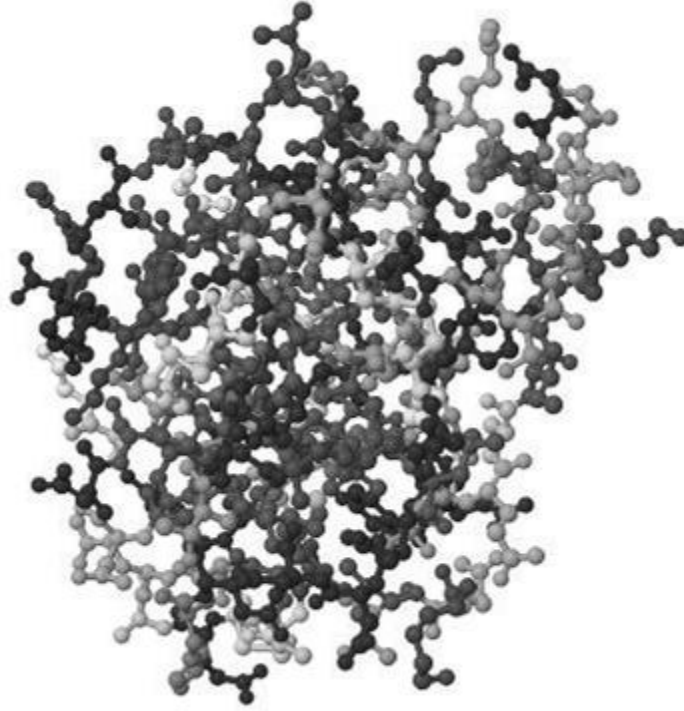
Literatürde BSA'nın tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Yu ve arkadaşları [396] rezonans rayleigh saçılma metodu kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Sodyum dodesil sülfat bulunan ortamda 3-(4'-metilfenil)-

5-(4'-metil-2'-sülfofenilazo) rodanin ve BSA arasında kompleks oluşması neticesinde saçılma sinyalinin arttığı gözlenmiştir. Tayin aralığı 0,01 – 2,00 µg/mL olarak belirtilmiştir. Peng ve arkadaşları [397] rezonans ışık saçılımı metodu kullandıkları çalışmalarında rutenyum nanoparçacıkları ile BSA arasındaki etkileşimin agregasyona yol açtığı ve saçılma sinyalinin arttığını göstermişlerdir. Tayin aralığı 0,1 – 4,0 µg/mL olarak belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [398] merkptoasetik asit ile modifiye edilmiş ZnSe nanoparçacıklarının floresansının, BSA ile etkileşim sonrasında arttığını gözlemlemişlerdir. Tayin aralığı 9,6 – 124,8 µg/mL olarak belirtilmiştir. Suznjevic ve arkadaşları [399] Cu(II) ve Hg(II) iyonu bulunan ortamda camı karbon elektrot kullanarak elektrokimyasal tayin gerçekleştirmişlerdir. Cu(II) veya Hg(II) bulunan ortama BSA eklendiğinde akım şiddetinde düşme gerçekleştiği görülmüştür. Ortama eklenen protein ile metal iyonlarının kompleksi çözünme akımlarını değiştirmiştir. Tayin aralığı $3,0 \times 10^{-7}$ – $5,0 \times 10^{-7}$ M olarak belirtilmiştir. Yu ve arkadaşları [400] akış enjeksiyon kemiluminesans sensörü geliştirmişlerdir. Metakrilik asit (monomer) ve etilen glikol dimetakrilat (çapraz bağlayıcı) kullanılarak oluşturulan polimer yapıya BSA adsorbe olmaktadır. Bu sistem hidroklorik asit berberinde potasyum permanganat ile etkileşime sokulduğunda floresans sinyali oluşmaktadır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-8}$ – $5,0 \times 10^{-6}$ g/mL olarak belirtilmiştir. Luo ve arkadaşları [401] guanidin molekülü ile modifiye edilmiş BSA molekülünün Co(II) ile oluşturduğu komplekse, potansiyel uygulanmasıyla oluşan indirgenme pikinin ölçümüne dayalı tayin gerçekleştirmişlerdir. BSA'nın guanidin ile modifiye edilmesi ile proteinin uzay konfigürasyonu ve yüklü bölgeleri değişmektedir. BSA ie Co(II) kompleksinin indirgenme potansiyel piki çok küçük iken modifiye BSA ile elde edilen pikin çok belirgin ve keskin olduğu görülmüştür. Tayin aralığı 0,05 – 20,00 mg/L olarak belirtilmiştir. Lee ve arkadaşları [402] bir floresans ajanı olan nile mavisi katyonik boyasının, BSA ile etkileşimi sonrasında floresans sinyalinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Tayin aralığı 0,5 – 12,0 µg/mL olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu protein tayin edilmiştir.

2.2.1.2. Alfa laktalbumin (α -LA)

Alfa laktalbuminin yapısında bir polipeptid zinciri bulunmaktadır. Zincirin kristal yapısı Şekil 2.26'da [403] gösterilmiştir. Yapısında 123 amino asit bulundurmaktadır.



Şekil 2.26. Alfa laktalbumin zincirinin ikincil yapısı

α -LA, metabolizmada aktif olarak laktoz sentezine katılır. Lipid gibi organik bileşiklerle etkileşim kurabilmektedir. Bu özelliği sayesinde, tümör hücrelerinin çekirdeklerinde protein biriktirilmesi, laktogenesis miktarının düzenlenmesi gibi biyolojik proseslerde görev alır. Katlanma ve metal bağlama özellikleri sayesinde pek çok çalışmaya konu olmuştur [404]. Peynir altı suyunda ikinci en çok bulunan proteindir. Sütte 1,2 g/L konsantrasyonunda bulunmaktadır [405]. Emülsiyon yapıcı, köpürücü ve jelleştirici özellikleri nedeniyle pek çok gıda maddesinde bulunmaktadır [406]. İlaç sektöründe kullanım alanları araştırıldığında kas geliştirici (Whey protein concentrate-NutraBio) [407] ilaçlar haricinde herhangi bir ilaç bileşiminde varlığı tespit edilmemiştir.

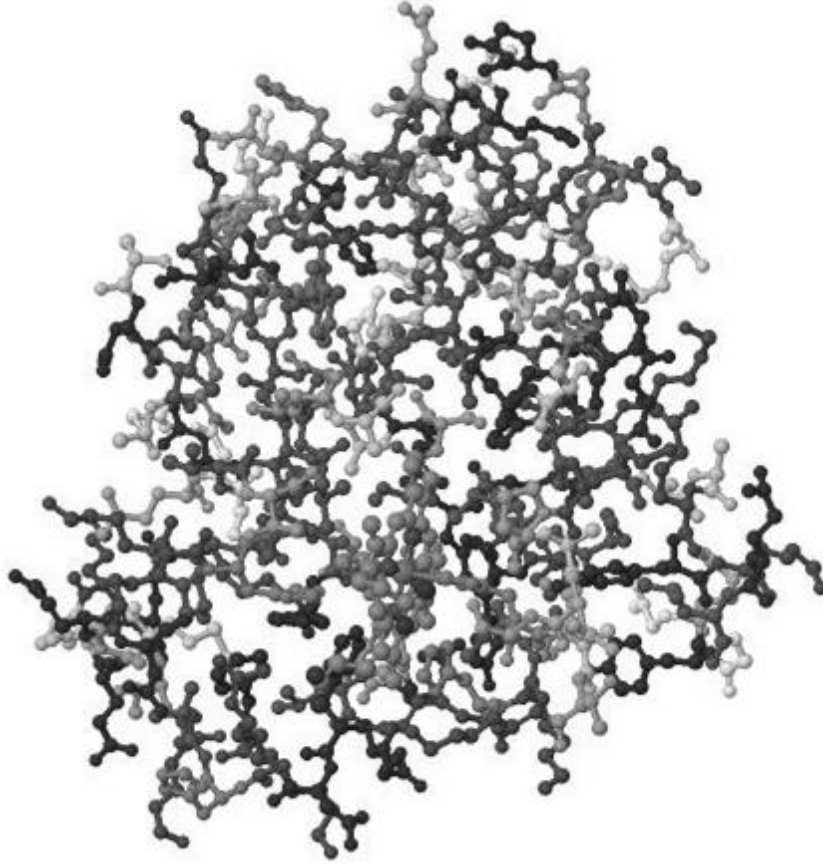
Literatürde α -LA'nın tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Ren ve arkadaşları [408] ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi – kütle spektrometresi tekniğini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Tayin aralığı 0,4 – 60,0 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirtilmiştir. Bütikofer ve arkadaşları [409] UV dedektörü kullanılan silikajel ile doldurulmuş kapiler elektroforez kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Billakanti ve arkadaşları [410] moleküller arası kırılma indislerinin ölçümlerine dayalı bir optik sistem olan yüzey plazmon rezonans tekniğini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Biyolojik sensör çipi üzerine kaplanan karboksi alginat monomoleküler tabakasına keçi-anti-sığır α -laktalbumin tutturularak α -laktalbumin adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 0 – 10000 ng/mL olarak belirtilmiştir. Marchal ve arkadaşları [411] α -laktalbumin kaplı mikroküreler ve anti- α -laktalbumin antiserumu arasında gerçekleşen reaksiyon sonrasında mikrokürelerin kabuklarında meydana gelecek saçılma değişimlerinin nefelometrik olarak ölçerek tayin gerçekleştirmişlerdir. Ding ve arkadaşları [412] fotodiyot dedektör kullanılan sıvı kromatografisi ve UV dedektör kullanılan kapiler elektroforez metotları ile tayin gerçekleştirmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu protein tayin edilmiştir.

2.2.1.3. Miyoglobin (Mb)

Miyoglobinin yapısında bir polipeptid zinciri bulunmaktadır. Zincirin kristal yapısı Şekil 2.27'de [413] gösterilmiştir. Yapısında 154 amino asit bulundurmaktadır. Hem grubu içeren proteinlerden olan miyoglobinin, azot monoksit türleriyle reaksiyon vermesi memeli metabolizmasındaki pek çok fizyolojik olayda önemli roller almasına neden olmaktadır. Hipoksi ortamında (düşük oksijenli ortam), nitriti azot monoksite indirgemesi buna bir örnektir [414]. Merkeze uzak olan histidin kısımlarının, N_3^- gibi anyonik ligandların bağlanmasında etkili olduğu düşünülmektedir [415]. Solunum proteini olarak bilinen ve oksijen deposu olan miyoglobin, iskelet sisteminde, kalpte ve düz kaslarda bulunmaktadır. Birincil görevi, içerdiği Fe(II) yükseltgenme noktası sayesinde oksijen depolamaktır [416]. Oksijen ve azot monoksit dışında karbon monoksit ve siyanür ile de tersinir bağlanma yeteneğine sahiptir [417]. Koroner hastalıkların önceden belirlenmesinde

duyarlı bir belirteç görevi görmektedir [418]. Herhangi bir ilaç bileşiminde varlığı tespit edilmemiştir.



Şekil 2.27. Miyoglobin zincirinin ikincil yapısı

Literatürde miyoglobinin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Zheng ve arkadaşları [419] miyoglobinin katalitik aktivitesini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Hidrojen peroksit eşliğinde o-fenilendiamin molekülü, miyoglobin vasıtasıyla 2,3-diamimofenazin molekülüne yükseltgenmektedir. Miyoglobin miktarı arttıkça UV absorpsiyonu yapabilen ürün miktarıda artmaktadır. Tayin aralığı $1,0 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-9}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Liang ve arkadaşları [420] yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. 150 armstrong por çapına sahip silika bazlı kolon ve UV dedektörü kullanılmıştır. Tayin aralığı $0,0156 - 0,5000$ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olarak belirtilmiştir. Yan ve arkadaşları [421] oksijen ve hegzadesiltrimetilamonyum bromit bulunan ortamda camsı karbon elektrot kullanarak elektrokimyasal indirgeme

yöntemi ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Miyoglobinin oksijen bağlama yeteneği kullanılmıştır. Meydana gelen pikin hem grubundaki Fe(III)/Fe(II) rodoks çiftinden değil oksomiyoglobindeki oksijenin indirgenmesiyle meydana geldiği belirtilmiştir. Miyoglobin miktarı arttıkça pik şiddeti de artmıştır. Tayin aralığı $2,5 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Long ve arkadaşları [422] Fe(III)/Fe(II) rodoks çiftini kullanarak 6-merkaptopurin ile modifiye edilmiş gümüş elektrot vasıtasıyla tayin gerçekleştirmişlerdir. Hem grubundaki demir ile 6-merkaptopurin molekülü arasında gerçekleşen kompleks demirin indirgenmesiyle bozulmaktadır. Tayin aralığı 0,2 – 4,0 µg/mL olarak belirtilmiştir. Oellingrath ve arkadaşları [423] iyon değiştirici kolon kullandıkları HPLC tayini gerçekleştirmişlerdir. Kitao ve arkadaşları [424] enzim immunotest yöntemi kullanmışlardır. Anti-miyoglobin anikoru polistiren immunetabakalara tuturulmuştur. Anitkor ile miyoglobin arasında gerçekleşen reaksiyon sonrası UV ölçümü yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu protein tayin edilememiştir.

2.3. Enzimler

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısına sahip maddelere enzim denmektedir. Enzimler büyük protein molekülleridir. Bu büyük moleküllerin aktif merkez adı verilen küçük ve özel bir kısmı katalizde görev alır [384]. Çok sayıda enzimin amino asit dizisi ve üç boyutlu yapısı aydınlatılmıştır. Denatürasyon halinde konformasyonları bozular, bu nedenle amino asit dizisi aynen kalmasına rağmen katalitik etkinlik kaybolmaktadır. Birçok enzim bir protein kısmı ve ona bağlı prostetik gruptan oluşmuştur. Diğer enzimler, bu grupları aktif formlarında tersinir biçimde bağlarlar [425]. Enzimler yüksek dercede spesifiktir ve aktiviteleri kontrol edilir. Aktif bölge bir enzim-substrat kompleksi oluşturan ve substratı ürüne dönüştürmek üzere substrata bağlanan enzim bölgesidir. Aktif bölge protein yüzeyinde çoğu zaman bir çatlak veya oyuk şeklinde olan üç boyutlu bir oluşumdur ve substrat buraya çoklu zayıf etkileşimlerle bağlanır. Bir enzimin sustrat özgülüğü aktif bölgeyi oluşturan amino asitlerin özellikleri ve uzaysal dağılımları ile belirlenir. Enzimler katalizledikleri tepkimenin tipine göre altı ana grupta sınıflandırılır:

oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar veya sentetazlar [385].

2.3.1. Çalışmalarda kullanılan enzimler ve literatür çalışmaları

Bu kısımda çalışmalarda kullanılan enzimlerin yapıları, görevleri, özellikleri, yer aldıkları ilaç bileşimleri ve literatürde bulunan bazı farklı tayin çalışmaları anlatılacaktır.

2.3.1.1. Kreatin kinaz (CK)

Kreatin kinazın yapısında bir polipeptid zinciri bulunmaktadır. Zincirin kristal yapısı Şekil 2.28'de [426] gösterilmiştir. Yapısında 381 amino asit bulundurmaktadır.



Şekil 2.28. Kreatin kinaz zincirinin ikincil yapısı

Bir katalitik enzim olan kreatin kinaz, fosfokreatin, kreatin ve adenozin difosfatın adenozin trifosfata tersinir çevrimlerinden sorumludur. Ruhsal bozukluklar için serum belirteci olarak kullanılabilir [427]. Ayrıca serum içerisindeki miktarı, miyokard enfarktüsü ve kas miyopatisi gibi doku yaralanmaları durumunda arttığından teşhis için kullanılmaktadır. Nedeni bilinmeyen bir şekilde siyahi insanların kanında beyazlara göre daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir [428]. Üç farklı izoenzim halinde bulunabilmektedir; CK-MM iskelet kaslarında bulunan, CK-MB kalpte bulunan ve CK-BB beyinde bulunan izoenzimleri ifade etmektedir [429]. Herhangi bir ilaç bileşiminde varlığı tespit edilmemiştir.

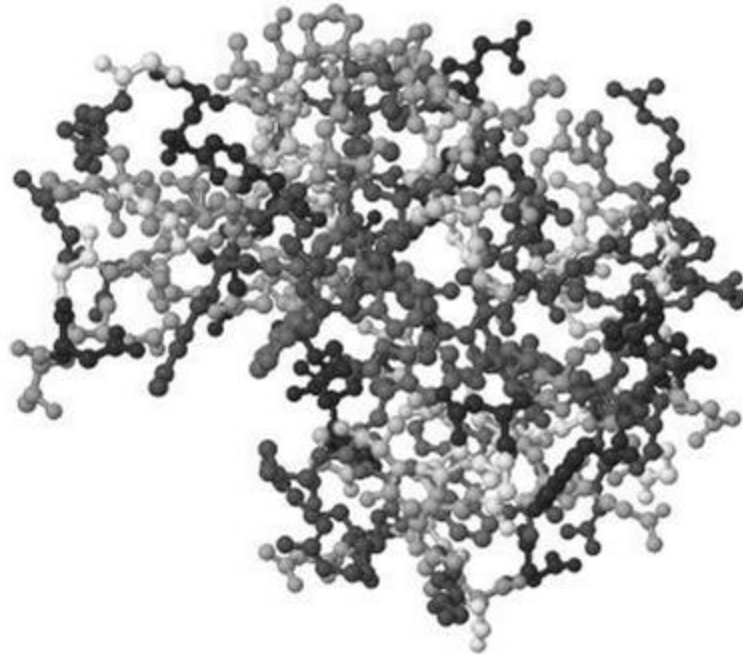
Literatürde kreatin kinazın tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Liu ve arkadaşları [430] geliştirdikleri amperometrik biyosensör ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Polikarbonat üzerine altın kaplanmış elektrot yüzeyine platinyum nanoparçacıkları biriktirildikten sonra oluşan elektrot, Os(II/III) içeren yüksek aktiviteye sahip redox polimeri ile modifiye edilmiştir. Modifiye elektrot üzerine ise yabanturbu peroksidaz, gliserofosfat oksidaz ve gliserol kinaz enzimleri tutturulmuştur. Kreatin kinaz aktivitesi sonrası oluşan ATP, ADP'ye dönüşürken gliserol de gliserol kinaz vasıtasıyla gliserol-3-fosfata dönüşmektedir. Gliserol-3-fosfat gliserofosfat oksidaz vasıtasıyla dihidroksiasetona dönüşürken oksijen de hidrojen peroksida dönüşmektedir. Hidrojen peroksit yabanturbu peroksidaz enzimi vasıtasıyla suya dönüşürken osmiyum yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonu vererek bir akım oluşturmaktadır. Tayin aralığı 10,01 – 2748,05 U/L olarak belirtilmiştir. Fujima ve Danielson [431] kapiler elektroforez sistemini kullanmışlardır. Kreatin kinazın substratı olan fosfokreatin ile ADP varlığında reaksiyonu sonucu oluşan ATP'nin UV dedektör ile ölçümüne dayanmaktadır. Tayin aralığı 1 – 100 U/L olarak belirtilmiştir. Romero ve Castro [432] gözenekli cam üzerine tutturdukları heksokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleri vasıtasıyla akış enjeksiyon sistemi kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Kreatin fosfat ADP varlığında ve kreatin kinaz vasıtasıyla kreatine dönüşürken ATP oluşmaktadır. Oluşan ATP, D-glukoz varlığında heksokinaz enzimi vasıtasıyla ADP'ye ve D-glukoz da D-glukoz-6-fosfat'a dönüşmektedir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi ise D-Glukoz-6-fosfat'ı D-glukono- δ -lakton-6-fosfat'a dönüştürürken NADP⁺'yi NADPH'a dönüştürmektedir. NADPH'nın floresans ve

absorbansı ölçülerek kreatin kinaz ile bağlantı kurulmuştur. Tayin aralığı absorbans için 0,1 – 2,0 U/L, floresans için 0,01 – 1,00 U/L olarak belirtilmiştir. Aminlari ve Rezaian [433] kreatin fosfat ve ADP arasında kreatin kinaz katalizliğinde gerçekleşen reaksiyon sonucu, kreatin oluşmasından faydalanmışlardır. Kreatin ve rho-nitrofenilglioksal arasında hafif bazik şartlar altında gerçekleşen reaksiyon sonucu oluşan renkli kompleksin absorbansının ölçülmesine dayalı yöntem geliştirilmiştir. Girotti ve Ghini [434] de kreatin oluşumuna dayalı yöntem geliştirmişlerdir. Oluşan kreatin ve naylon sarmal üzerine tutturulmuş ateş böceği lusiferaz enziminin reaksiyonu sonucu oluşan floresans ölçümüne dayalı tayin gerçekleştirilmiştir. Tayin aralığı 0,1 – 100,0 U/L olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu enzim tayin edilmiştir.

2.3.1.2. Lizozim (LZ)

Lizozimin yapısında bir polipeptid zinciri bulunmaktadır. Zincirin kristal yapısı Şekil 2.29'da [435] gösterilmiştir. Yapısında 129 amino asit bulundurmaktadır.



Şekil 2.29. Lizozim zincirinin ikincil yapısı

Lizozim, yaşayan organizmalarda bulunan ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi elemanıdır. Altı farklı çeşidi tanımlanmıştır; bakteriyel ve bitki tipi yanında c-tipi tavuk, g-tipi kaz, i-tipi omurgasız, T4 bakteriyofaj tipleri mevcuttur. C-tipi lizozim en çok bulunanıdır ve balıktan birçok memeliye kadar geniş bir çeşitlilikte bulunmaktadır [436]. Yumurta akında bulunan, en iyi karakterize edilebilen antimikrobiyal proteinlerden biridir ve yumurta akında bulunan proteinlerin % 3,5'ünü oluşturur. Antibakteriyel özelliklerini gram pozitif bakterilere gösterebildiği gibi gram negatif bakterilerin bazılarında da etki gösterebilmektedir. Bu özelliği sayesinde gıda, kosmetik ve ilaç sektörlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir [437]. Son zamanlarda lizozim bulunan ürünlere karşı alerjik reaksiyonların gerçekleştiğine dair çalışmalar yayınlanmakta ve bu çalışmalara ışığında gıda kanunlarında lizozim kullanımına ilişkin sınırlamalar getirilmeye başlanmıştır [438]. İnsanlarda bulunan lizozim ise gözyaşı, tükürük ve sütte bulunabilmektedir. İnsan sütünde bulunması ile bakteri, virüs ve mantarlara karşı koruma sağlamaktadır [439]. Herhangi bir ilaç bileşiminde varlığı tespit edilmemiştir.

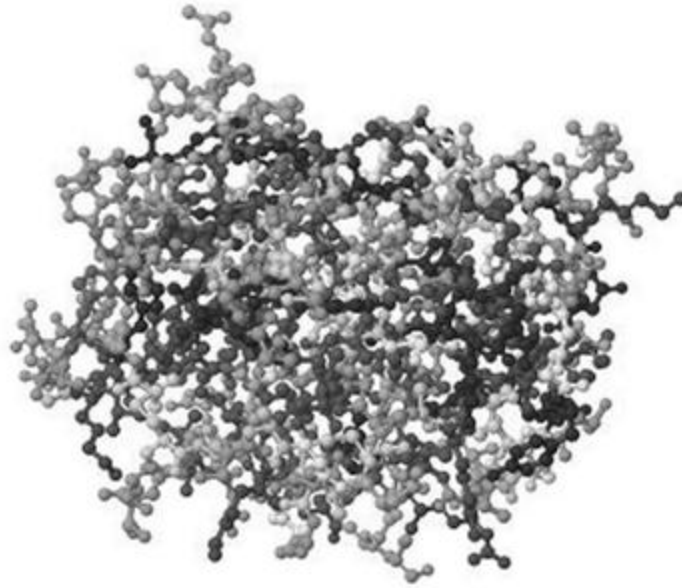
Literatürde lizozimin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Cai ve arkadaşları [440] Cd dop edilmiş ZnSe kuantum noktaları kullanarak rezonans rayleigh saçılması metodu ile tayin gerçekleştirmişlerdir. Hazırlanan kuantum noktaları glutatyon ile modifiye edilmiştir. Modifiye kuantum noktalarının lizozim ile kurdukları kompleks GSH üzerinden gerçekleşmektedir. Lizozimde bulunan NH_3^+ grupları GSH de bulunan COO^- grupları ile elektrostatik etkileşime girerek kompleks oluşturmaktadır. Bu sayede agregasyon artmakta ve kompleks boyutu büyümekte dolayısıyla da ışık saçılması artmaktadır. Tayin aralığı 0,08 - 2,00 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirtilmiştir. Qian ve arkadaşları [441] BSA ile modifiye edilen floresans yapabilen altın nanoparçıklarını kullanarak bir floresans metodu geliştirmişlerdir. Lizozim bağlanması arttıkça floresans sinyalinde de artma gözlenmiştir. Tayin aralığı $2,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirtilmiştir. Li ve arkadaşları [442] elektro oluşumlu kemiluminesans aptasensörü geliştirmişlerdir. Lizozim bağlayıcı aptamer altın elektroda tutturulmuştur. Elektro oluşumlu kemiluminesans ajanı olarak $\text{Ru}(\text{bby})_3^{2+}$ kullanılmıştır. Sistem lizozim ve kemiluminesans ajanının, aptamerin bağlayıcı bölgelerine yarışmalı olarak bağlanmasıyla çalışmaktadır. Aptamer ve $\text{Ru}(\text{bby})_3^{2+}$ bulunan ortama lizozim

eklendiğinde, lizozim seçimli kompleks oluşmakta ve dolayısıyla floresans sinyalinde düşme gerçekleşmektedir. Tian ve arkadaşları [443] La^{3+} - TiO_2 -zeolit mikro kolonu vasıtasıyla adsorpsiyon yöntemi kullanarak lizozim zenginleştirilmesi yaptıktan sonra absorbans ölçümü yapmışlardır. Tayin aralığı 10 – 100 mg/L olarak belirtilmiştir. Wang ve arkadaşları [444] AFM kantileverinin eğilmesi sonucu oluşan rezonans değişikliklerini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Altın kantilever, dodekantiyol ile modifiye edildikten sonra lizozim ile etkileştirildiğinde lizozimin adsorbe olduğu görülmüştür. Adsorpsiyon sonrası kantileverin rezonans frekansı değişmektedir. Tayin aralığı 10,0 ng/L – 0,1 mg/L olarak belirtilmiştir. Sun ve arkadaşları [445] voltametri tekniği kullanmışlardır. Alizerin kırmısı S molekülünün voltametrik indirgeme pik şiddetinin lizozim ilavesi ile azaldığı belirtilmiştir. Bu azalmanın alizerin kırmısı S ile lizozim etkileşimi sonrası oluşan büyük molekülden kaynaklandığı belirtilmiştir. Tayin aralığı 0,8 – 35,0 mg/L olarak belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında uygulanan tayin yöntemiyle bu enzim tayin edilmiştir.

2.3.1.3. Tripsin (TRY)

Tripsinin yapısında bir polipeptid zinciri bulunmaktadır. Zincirin kristal yapısı Şekil 2.30'da [446] gösterilmiştir. Yapısında 223 amino asit bulundurmaktadır. Pankreatik serin proteaz enzimi olan tripsinin substrat seçiciliği, pozitif yüklü lisin ve arginin yan dallarından kaynaklanmaktadır. Ester, amit ve peptid bağlarını hidroliz edebilmektedir [447]. Pankreastan ince bağırsağa salgılanarak proteinlerin parçalanmasında görev almaktadır [448]. Süt kazeininin hidrolizi, bebek gıdalarının ön özütleme işlemi, insan insülininin kısmi sentezi, proteomik çalışmaları için proteinlerin peptitlere parçalanması gibi pek çok uygulaması mevcuttur [447]. Protein parçalanması konusundaki üstün özelliği sayesinde pek çok çalışmada yer almaktadır [449]. Herhangi bir ilaç bileşiminde varlığı tespit edilmemiştir.



Şekil 2.30. Tripsin zincirinin ikincil yapısı

Literatürde tripsinin tayin edilmesinde kullanılmış bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Hu ve arkadaşları [450] BSA ile modifiye edilmiş altın nanoparçacıklarının floresans özelliklerini kullanarak tayin gerçekleştirmişlerdir. Ortama katılan tripsinin, nanoparçacık çevresinde bulunan BSA proteinini parçalaması sonucu floresans sinyalinde azalma gözlenmiştir. Tayin aralığı 0,01 – 100,00 µg/mL olarak belirtilmiştir. Neff ve arkadaşları [451] silikon bazlı tabakanın direncini ölçmeye dayalı yöntem geliştirmişlerdir. Negatif yüklü silikon oksit yüzey üzerine pozitif yüklü poli-L-lisin adsorbe edilmiştir. Ortama eklenen tripsin ise adsorbe poli-L-lisini parçalayarak desorpsiyon gerçekleştirmektedir. Bu nedenle yüzey yükü değişmekte, yüzey potansiyeli düşmekte ve ölçülen tabaka direnci ise artmaktadır. Tayin aralığı $0,5 \times 10^{-4}$ – 1,0 mg/mL olarak belirtilmiştir. Braca ve arkadaşları [452] hidrofobik etkileşim kromatografisi ve kapiler elektroforez tekniklerini kullanmışlardır. Hidrofobik etkileşim kromatografisi tekniğinde CNBr-aktifli sefaroz kolon basit pankreatik tripsin inhibitörü ile modifiye edilmiştir. İnhibitör ile tripsinin oluşturduğu kompleksin absorpsiyonun ölçülmesi ile tayin gerçekleştirilmektedir. Kapiler elektroforez tekniğinde ise silika bazlı kapiler ve UV dedektör kullanılmıştır. Tayin aralığı 5 – 14 µg/mL olarak belirtilmiştir. Seegopaul ve Rechnitz [453] α -benzoil arginin amit molekülünün tripsin katalizliğinde amonyak oluşturmasından faydalanmışlardır. Oluşan amonyak prob ile ölçülerek

tain gerçekleştirilmiştir. Tain aralığı 0,5 – 20,0 µg/mL olarak belirtilmiştir. Suzuki ve arkadaşları [454] sentezledikleri tosil-L-arginil-L-fenil alanin molekülünü substrat olarak kullanarak tain gerçekleştirmişlerdir. Tripsin ile reaksiyon sonrası fenilalanin serbest kalmakta ve floreskamin ile reaksiyona sokularak floresans sinyali ölçülmektedir. Mayoral ve arkadaşları [455] spesifik substrat olarak (CBZ-L-alanil-L-arginin)₂-rodamin-110 kullanarak floresansa dayalı ölçüm gerçekleştirmişlerdir. Tripsinin substrat ile reaksiyonu sonucu ortaya çıkan rodamin-110 floresansı llmştir. Tain aralığı 1 – 10 ng/mL olarak belirtilmiştir.

Tez alışması kapsamında uygulanan tain yöntemiyle bu enzim tain edilmiştir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

L-alanin, Fluka; L-arginin, L-aspartik asit, L-glutamin, glisin, L-histidin, L-izolösin, L-lösin, L-metiyonin, L-fenilalanin, L-prolin, L-serin, L-tirozin, L-valin, Merck; L-asparagin, L-sistein, L-glutamik asit, L-lisin, L-treonin, L-triptofan, Sigma firmasından temin edilmiştir. Sığır serum albumin, alfa laktalbumin (sığır sütünden), miyoglobin (at kalbinden), keratin kinaz (tavşan kasından), lizozim (tavuk yumurtası beyazından) ve tripsin (sığır pankreasından) Sigma firmasından temin edilmiştir. GSH, Fluka; AgNO₃, NaBH₄, NaOH, HCl, CH₃OH, CH₃CH₂OH, HNO₃, Hg(NO₃)₂, Pb(NO₃)₂, Cd(CH₃COO)₂.2H₂O, Ni(NO₃)₂, CoCl₂.6H₂O, CuSO₄.5H₂O, Zn(CH₃COO)₂.2H₂O, FeCl₃ Merck firmasından temin edilmiştir.

UV-Vis spektrofotometre (UV-2401, Shimadzu), FTIR (IR Prestige-21, Shimadzu), AFM (NTMDT, Integra Instrument), vakumlu etüv (EV 018, Nüve), terazi (Precisa), ısıtıcılı karıştırıcı (Isolab), Vortex (Genie 2, Scientific Industries), pH metre (WTW), ultrasaf su cihazı (Milli-Q, Millipore), buzdolabı (Liebherr) cihazları kullanılmıştır.

3.2. Modifiye Gümüş Nanoparçıklarının Sentezi

Bütün tez deneylerinde yıkama ve çözelti hazırlama işlemleri için ultra saf su kullanılmıştır. Kullanılan tüm çözeltiler kullanılacağı gün hazırlanmış olup bekleme anlarında +4 derecede buzdolabında saklanmıştır. Hiçbir çözelti bir günden daha fazla saklanmamıştır. Kullanılan cam malzemeler kullanım öncesi metalik kirlilikleri uzaklaştırmak için seyreltik HNO₃, organik kirlilikleri uzaklaştırmak için etil alkol ile yıkanmıştır.

Glutasyon molekülü ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıklar literatürdeki yöntemle göre hazırlanmıştır [456-458]. 100 mL $1,0 \times 10^{-4}$ M AgNO_3 çözeltisi 250 mL'lik bir balon içerisine konularak magnetik karıştırıcı yardımıyla yüksek hızda karıştırılmıştır. Hızlı bir şekilde karışmakta olan çözelti üzerine 0,01g NaBH_4 katı olarak ilave edilmiştir. 5 dk indirgeme işlemi sonrası 2 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M glutasyon damla damla çözeltiye ilave edilmiştir. Çözeltinin sarıya döndüğü gözlenmiştir. Reaksiyon absorbans ölçümleri ile takip edilerek izlenmiş ve 3 saat sonunda reaksiyonun bittiği gözlenmiştir. 3 saat karıştırma sonrası sarı çözelti, kahverengi ve ağzı kapanabilen bir şişeye alınarak karanlıkta saklanmıştır. Bu işlem vasıtasıyla glutasyon molekülü ile modifiye edilmiş gümüş nanoparçacıkları (AgGSH) elde edilmiştir.

AgGSH çözeltisine zamanın etkisinin incelenebilmesi için çözelti karanlıkta muhafaza edilmiş ve 1., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 60. günlerde absorbans ölçümü yapılmıştır. pH etkisinin incelenebilmesi için ise çözelti pH'ı NaOH ve HCl ile 2, 4, 6, 8, 10, 12 değerlerine ayarlanarak ölçüm alınmıştır.

3.3. Amino asit/Protein/Enzim Tayinleri

Polipropilenden yapılmış santrifüj tüpü içerisine 2 mL sentezlenen AgGSH konulduktan sonra üzerine 1 mL amino asit/protein/enzim çözeltisi ve 1 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M metal çözeltisi eklenmiştir. Hafif karıştırma sonrası 5 dk reaksiyon süresi beklenerek kuvarz küvet ile 200 – 800 nm aralığında absorpsiyon ölçümleri alınmıştır. Zamanın etkisinin belirlenebilmesi için karışım absorbansları 1., 5., 10., 15., 20., 25., 30. dakikalarda alınmıştır. Kalibrasyon doğruları için çözeltiler amino asitler için 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 μM , protein ve enzimler için 1, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında hazırlanmıştır.

3.4. Karakterizasyon

AgGSH ve AgGSH-metal iyonu-amino asit/protein/enzim yapılarının etkileşim ve bağlanma şekillerinin incelenebilmesi amacıyla IR spektrumları alınmıştır.

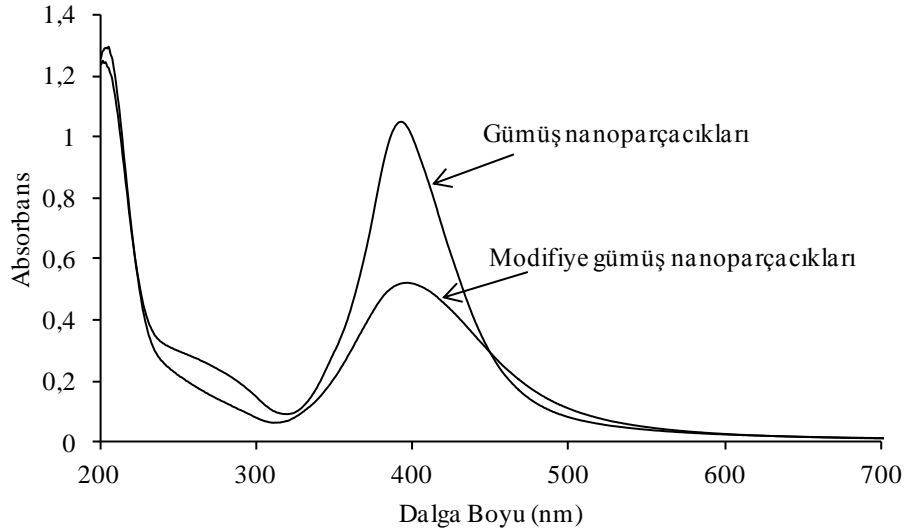
Hazırlanan çözeltiler herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan saat camları üzerinde oda sıcaklığında vakumlu etüvde 24 saat kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrasında elde edilen, saat camı üzerine yapışık katı yapı spatül ile kazınarak ATR yöntemi ile $600 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ aralığında ölçüm alınmıştır.

Bahsi geçen yapıların görüntüleri ise AFM ile alınmıştır. Elde edilen topografik görüntüler ile bağlanma öncesi ve sonrasında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Homojen bir dispersiyon elde edebilmek amacıyla çözeltiler 1:2 oranında metil alkol ile seyreltilerek 15 dk karıştırılmıştır. Sonrasında uygun büyüklükte kesilmiş mikroskop lamları üzerine damlatılarak oda sıcaklığında vakum altında 30 dk kurutulmuştur.

BÖLÜM 4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. Modifiye Gümüş Nanoparçıklarının Özellikleri ve Karakterizasyonu

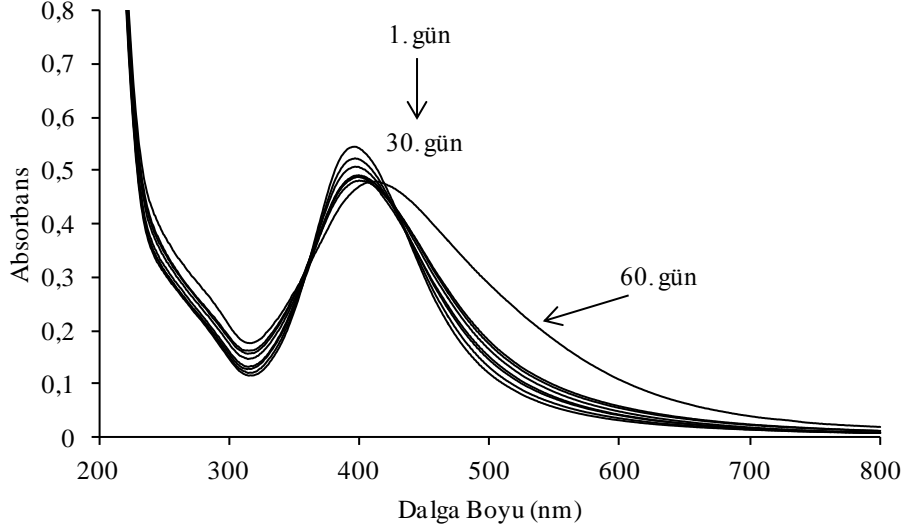
Modifiye gümüş nanoparçıkları ve modifiye edilmemiş gümüş nanoparçıklarının absorpsiyon farkı Şekil 4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Modifiye gümüş nanoparçıkları ile modifiye edilmemiş gümüş nanoparçıklarının absorpsiyon spektrumları

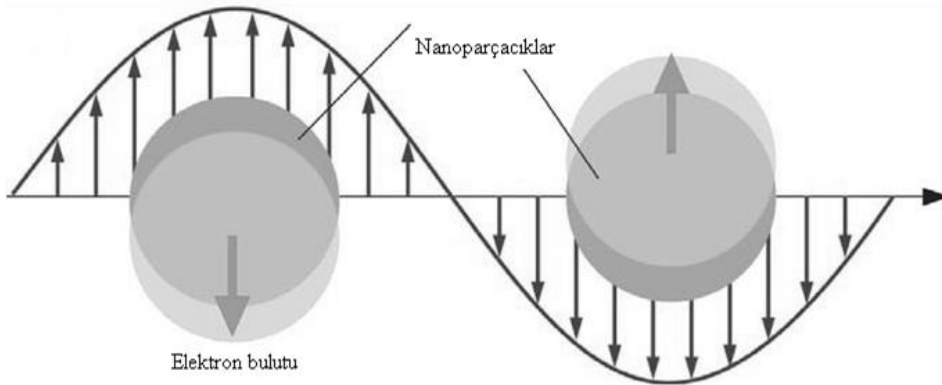
Nanometre boyutlarındaki parçacıklarda parçacık yüzeyinde salınım halinde bulunan elektron bulutları bulunmaktadır. Elektronların bu salınım hareketi yüzey plazma rezonansı (SPR) olarak isimlendirilmekte olup nanoparçacıkların absorpsiyon yapılarına ve UV-Vis spektroskopisi ile incelenmelerine olanak sağlamaktadır [459]. Şekilden de görülebileceği gibi 393 nm dalga boyunda absorbans veren gümüş nanoparçacıklarının absorbansı şiddeti modifiye nanoparçacıklarda hem düşmüş hem de 395 nm’ye kaymıştır. Bunun nedeni nanoparçacık çevresinde gerçekleşen salınım hareketinin GSH molekülünün yüzeye bağlanması ile sınırlanmasıdır.

Modifiye nanoparçacıkların absorbans şiddetinde zamanla meydana gelen değişim Şekil 4.2’de gösterilmiştir.



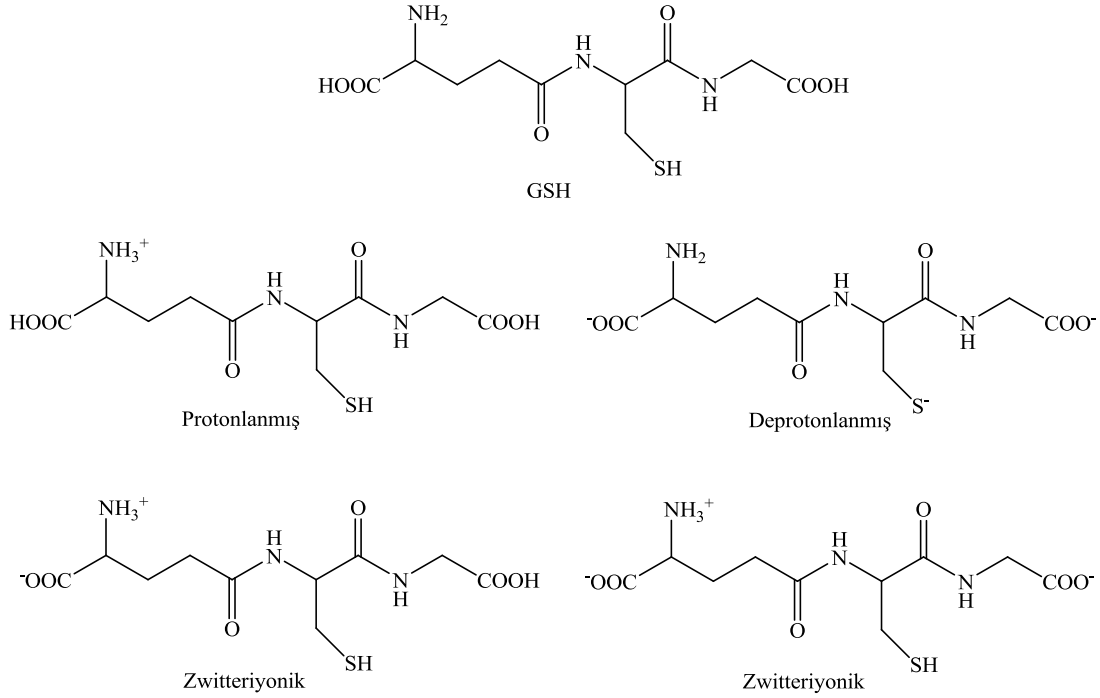
Şekil 4.2. AgGSH çözeltisinin zamanla meydana gelen absorbans değişimleri

İlk günden başlayarak otuzuncu güne kadar absorbans şiddetinde azalma, altmışıncı günde ise absorpsiyon maksimumunda (412,5 nm) değişme gerçekleşmiştir. Bu azalma ve kayma parçacık agregasyonundan kaynaklanmaktadır. Parçacıklar birbirine yaklaştıkça salınım hareketinin frekansı değişmektedir (Şekil 4.3 [459]). AgGSH çözeltisinin ilk otuz gün kararlılığını koruduğu bu zaman zarfından sonra ise aşırı agregasyona uğradığı sonucuna varılmıştır.



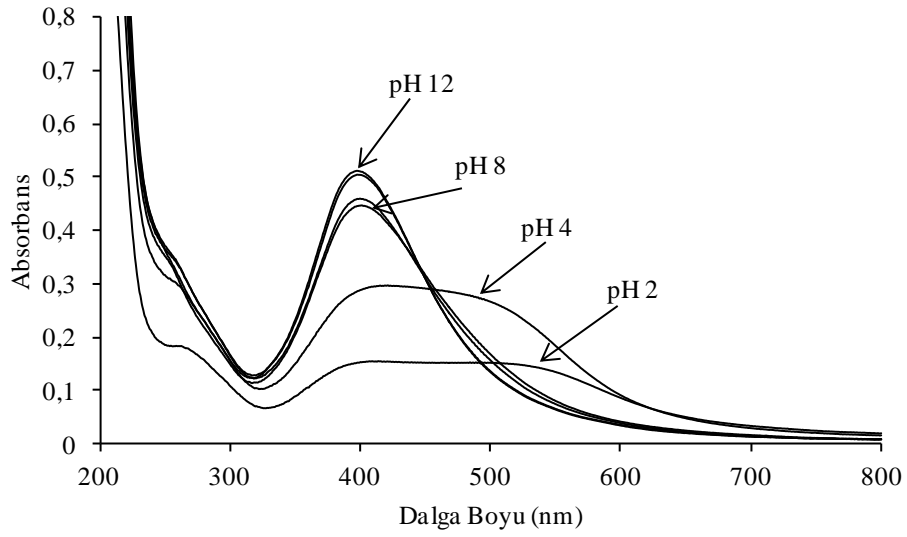
Şekil 4.3. Nanoparçacıkların ışık ile etkileşimleri

pH'in AgGSH çözeltisinin kararlılığına etkisi gümüş nanoparçacıklarına bağlı GSH moleküllerinin sahip olduğu grupların asidik ve bazik ortamlardaki protonlanma veya deprotonlanma durumlarına bağlıdır. Şekil 4.4 [460] serbest GSH molekülünü, protonlanmış, deprotonlanmış ve zwitteriyonik hallerini göstermektedir.



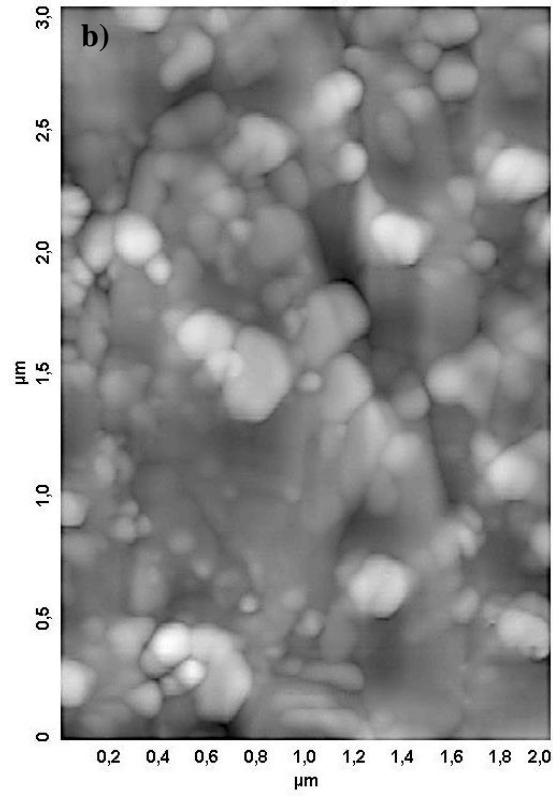
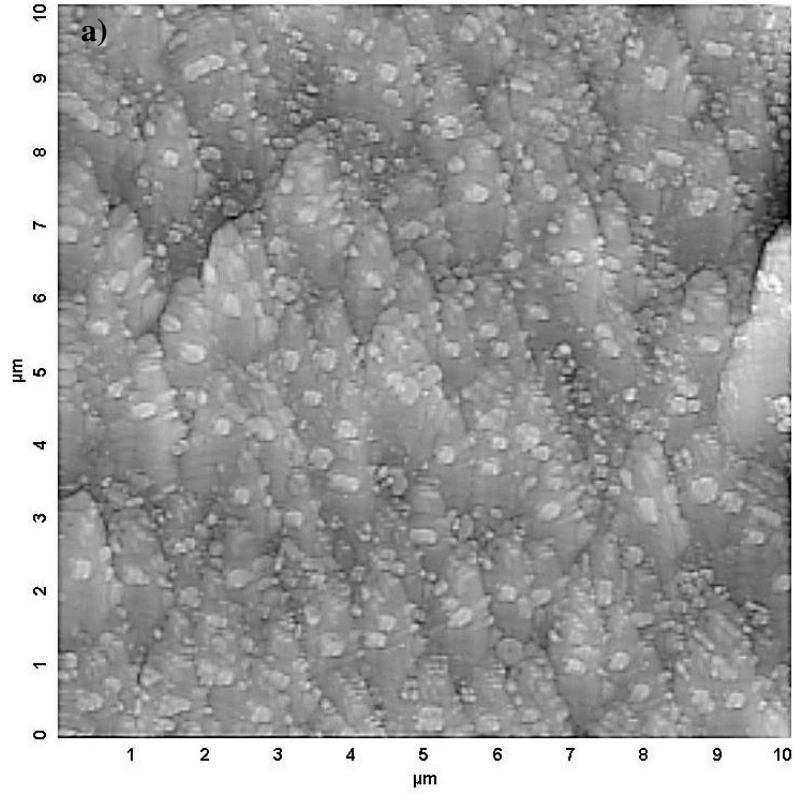
Şekil 4.4. GSH molekülünün değişik formları

Nötral pH'larda gümüş nanoparçacıklarına bağlı GSH'ler -COO^- ve -NH_3^+ grupları nedeniyle zwitter iyonik formda bulunmaktadır. Farklı GSH moleküllerindeki gruplar arasında elektrostatik çekim olabileceği gibi itme de olabilmektedir. Bu durum nötral pH'larda çözeltinin kararlı olmasını sağlamaktadır. Daha bazik ortamlarda ise deprotonlanma nedeniyle -COOH grupları -COO^- haline dönüşmektedir. Bu durumda -COO^- grupları arasında elektrostatik itme olacağından çözelti kararlı kalabilmektedir. pH 6'nın altına düştüğünde ise protonlanma meydana gelmesi nedeniyle hidrojen bağları oluşmaktadır. Nanoparçacıklar birbirlerine yaklaşarak agregasyona neden olmakta ve bunun sonucu olarak genişlemiş absorpsiyon pikleri elde edilmektedir (Şekil 4.5).

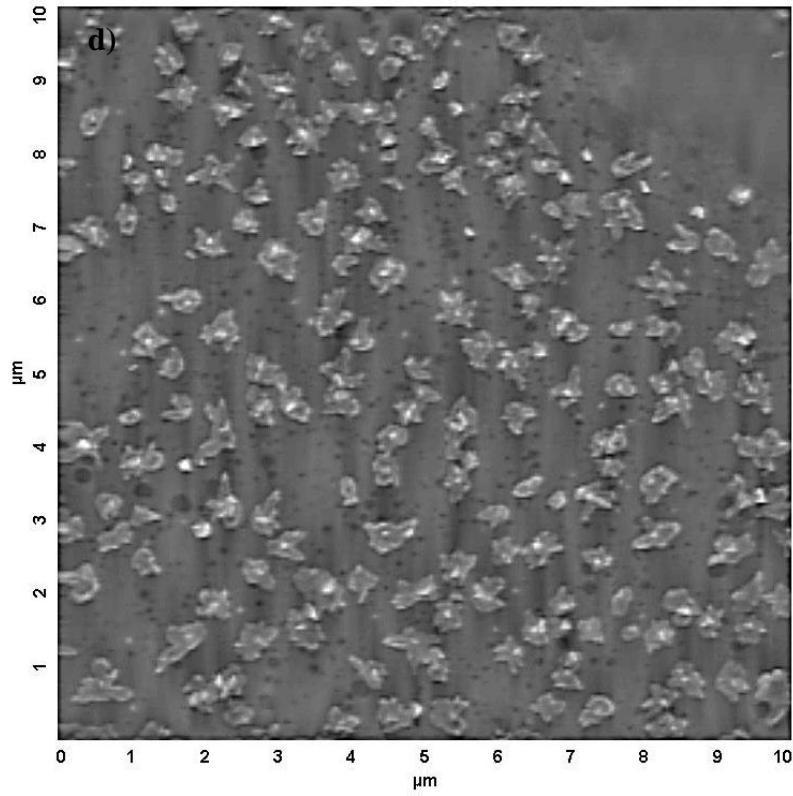
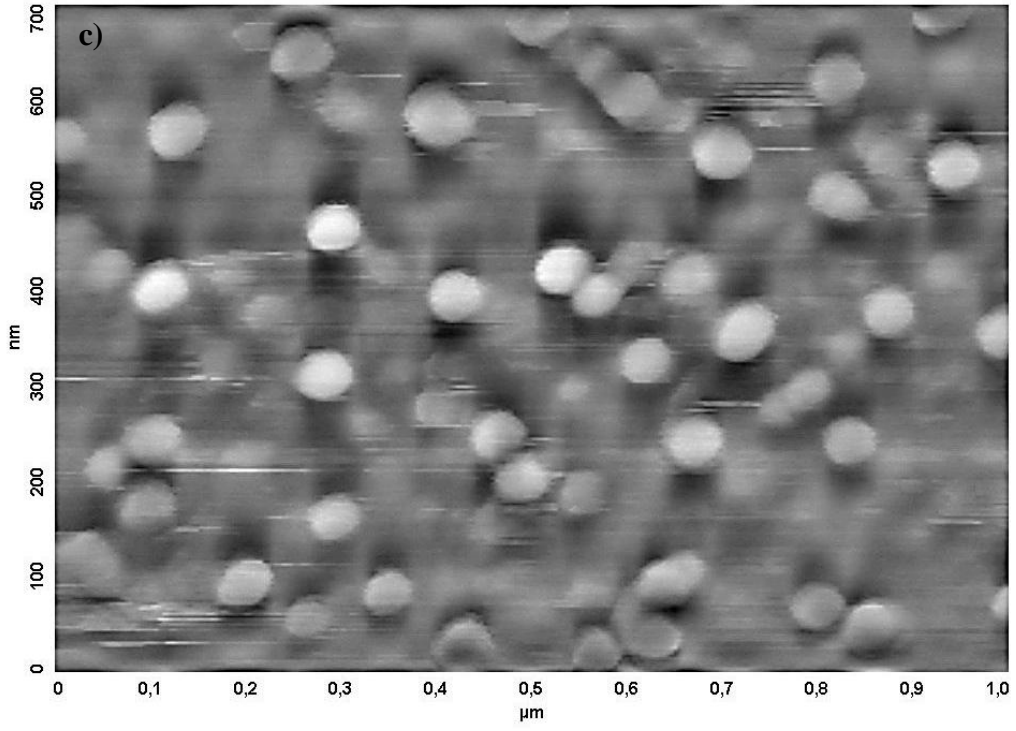


Şekil 4.5. AgGSH çözeltisinin değişik pH'larda absorpsiyon spektrumları

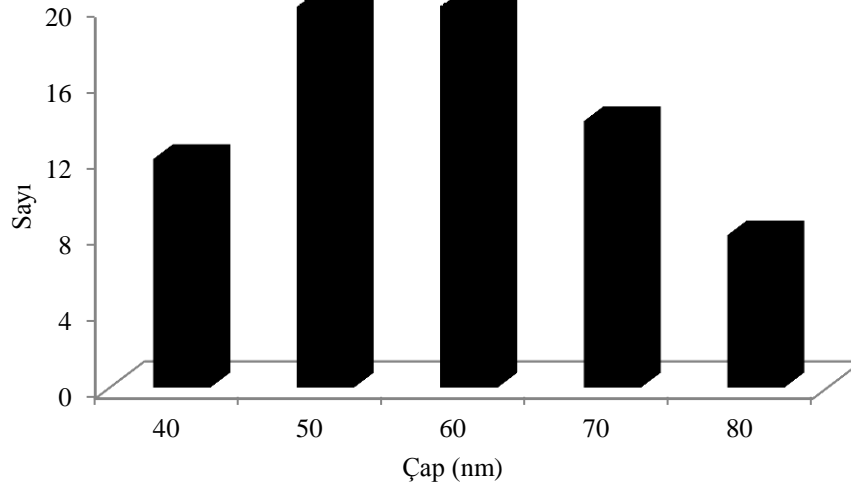
Sentezlenen yapıların görüntülenmesi ve boyut tahmini için atomik güç mikroskobu kullanılmıştır. Şekil 4.6'da agregasyona uğramış ve uğramamış parçacıkların elde edilebilen görüntüleri gösterilmektedir. Ayrıca glutatyon ile gümüş nanoparçacıklarının oluşturdukları, çekirdek (gümüş nanoparçacıkları) – kabuk (glutatyon) yapısının görüntüsü de elde edilmiştir. AFM'nin bilgisayar programı olan Nova_P9'un hesapladığı çaplara göre sentezlenen parçacıkların boyutları 40 – 80 nm arasında değişmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. AgGSH nanoparçacıklarının AFM görüntüleri; agregre ($10 \times 10 \mu\text{m}$) (a); agregre ($3 \times 2 \mu\text{m}$) (b); dispers ($700 \times 1000 \text{nm}$) (c); çekirdek-kabuk ($10 \times 10 \mu\text{m}$) (d)

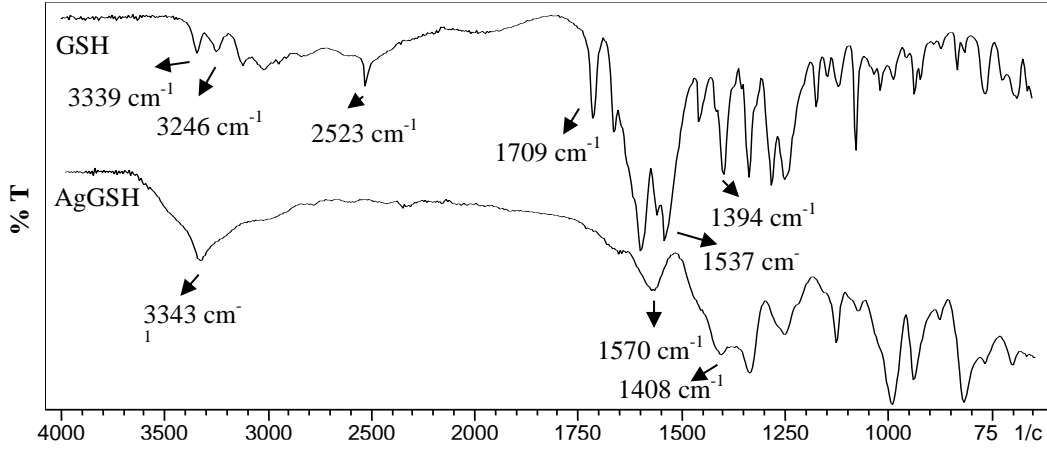


Şekil 4.6(Devam). AgGSH nanoparçacıklarının AFM görüntüleri; agreve ($10 \times 10 \mu\text{m}$) (a); agreve ($3 \times 2 \mu\text{m}$) (b); dispers ($700 \times 1000 \text{nm}$) (c); çekirdek-kabuk ($10 \times 10 \mu\text{m}$) (d)



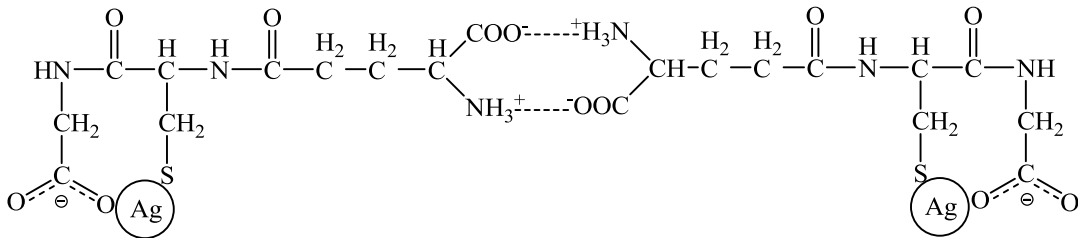
Şekil 4.7. AgGSH nanoparçacıklarının Nova_P9 programı ile hesaplanmış çap dağılımları

GSH'in gümüş nanoparçacıklarına bağlanma yapısını tahmin edebilmek için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmektedir. GSH yapısında gözlenen 2523 cm^{-1} 'deki sistein grubundan kaynaklanan $-\text{SH}$ pikinin AgGSH yapısında yok olduğu görülmektedir. Bu sonuç $-\text{SH}$ 'ın deprotonlanarak gümüş nanoparçacığına bağlandığını göstermektedir [461]. $-\text{SH}$ gruplarının gümüşe olan ilgisi literatürce bilinmektedir [462]. GSH'de $-\text{NH}_2$ grupları nedeniyle oluşan 3246 ve 3339 cm^{-1} 'deki pikler, AgGSH'de oluşan $-\text{NH}_3^+$ grubundan dolayı birleşerek 3343 cm^{-1} 'de ortaya çıkmıştır ve gümüş nanoparçacıkları ile etkileşime girmemiştir [463].



Şekil 4.8. GSH ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

GSH spektrumunda 1709 cm^{-1} 'deki $-\text{COOH}$ pikinin de AgGSH spektrumunda gözükmemesi grubun deprotonlanarak nanoparçacık ile etkileşime girdiğini göstermektedir. 1394 ve 1537 cm^{-1} 'de görülen $-\text{COO}^-$ grubunun simetrik ve asimetric gerilmesinin AgGSH spektrumunda 1408 ve 1570 cm^{-1} 'e kayması bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu bilgiler ışığında glutatyonun gümüş nanoparçacıklarına bağlanması Şekil 4.9'da gösterilemektedir. Bu bağlanma şekli literatür tarafından desteklenmektedir [460, 464, 465]. GSH'in glutamat kısmında bulunan ve gümüş nanoparçacıkları ile etkileşime katılmayan $-\text{NH}_3^+$ ve $-\text{COO}^-$ grupları birbirleri ile elektrostatik etkileşime girebilmektedir [466]. Nanoparçacıkların zaman içerisinde birbirlerine yaklaşması ile bu etkileşim artmakta ve parçacık agregasyonu hızlanmaktadır.



Şekil 4.9. GSH ve gümüş nanoparçacığın muhtemel bağlanma yapısı

4.2. Amino Asit Tayinleri

Bu bölümde değişik metal iyonları bulunan ortamlarda tayinleri gerçekleştirilen L-sistein, L-histidin, L-arginin, L-lisin ve L-metiyonin amino asitlerinin tayin sınırları, kompleks yapıları ve AFM görüntüleri tartışılacaktır.

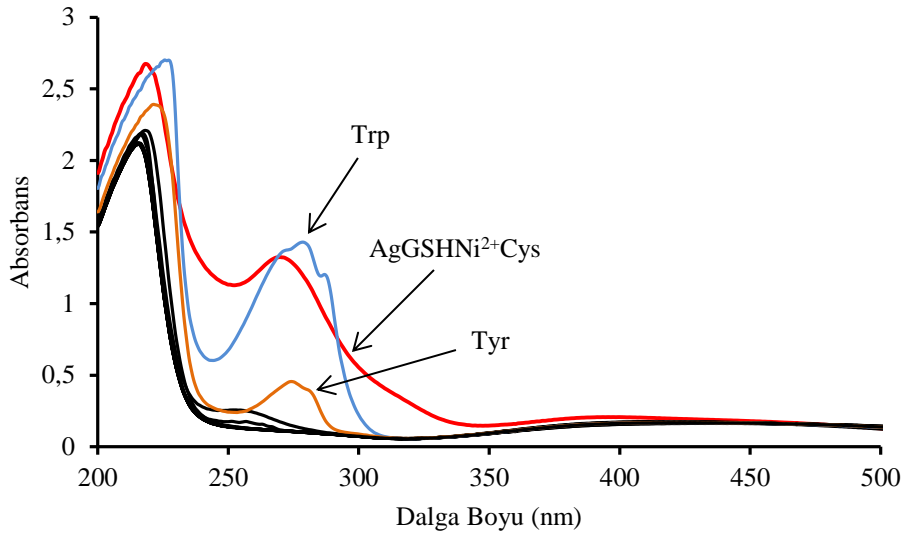
4.2.1. L-sistein tayini

L-sistein tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} ve Hg^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumlarının yorumlanmasında ve yapı tahmininde literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [467-472].

4.2.1.1. Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini

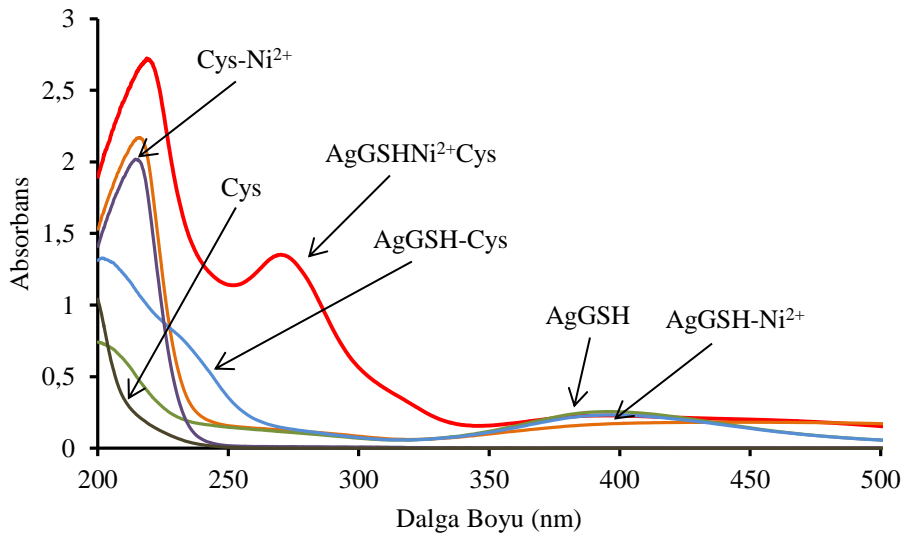
Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda hangi amino asitlerin etkileşim verdiğini görebilmek amacıyla yirmi amino asitle ayrı ayrı denemeler yapılmıştır (Şekil 4.10). Absorpsiyon spektrumlarından anlaşılacağı gibi sadece sistein bulunan ortamda bir etkileşim görülmüştür. Triptofan (278,5 nm) ve tirozin (274 nm) bulunan ortamda gözlenen absorpsiyon pikleri ise yapılarında bulunan halkalı gruplar nedeniyle ortaya çıkan piklerdir. Herhangi bir etkileşim nedeniyle ortaya çıkmadığı sadece bu amino asitlerin absorpsiyon spektrumları alındığında, aynı piklerin elde edilmesi sonucunda anlaşılmıştır. Triptofan ve tirozinden kaynaklanan pikler diğer tüm metal denemeleri ve amino asit tayinlerinde de var olacağından diğer bölümlerde bahsedilmeyecektir.

Gözlenen pikin $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH , AgGSH ve Ni^{2+} , AgGSH ve Cys , Cys , Cys ve Ni^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11). AgGSH çözeltisine Ni^{2+} çözeltisi ilave edildiğinde absorpsiyon spektrumunun 393 ile 503 nm dalga boyları arasında genişlediği görülmüştür. Ni^{2+} iyonu ile gerçekleşen kompleks sonucu parçacık agregasyonu gerçekleşmiştir. AgGSH ve Cys çözeltileri bir arada olduğu zaman ise 395 nm dalga boyundaki modifiye nanoparçacıkların absorpsiyonunda düşme meydana gelmiştir.



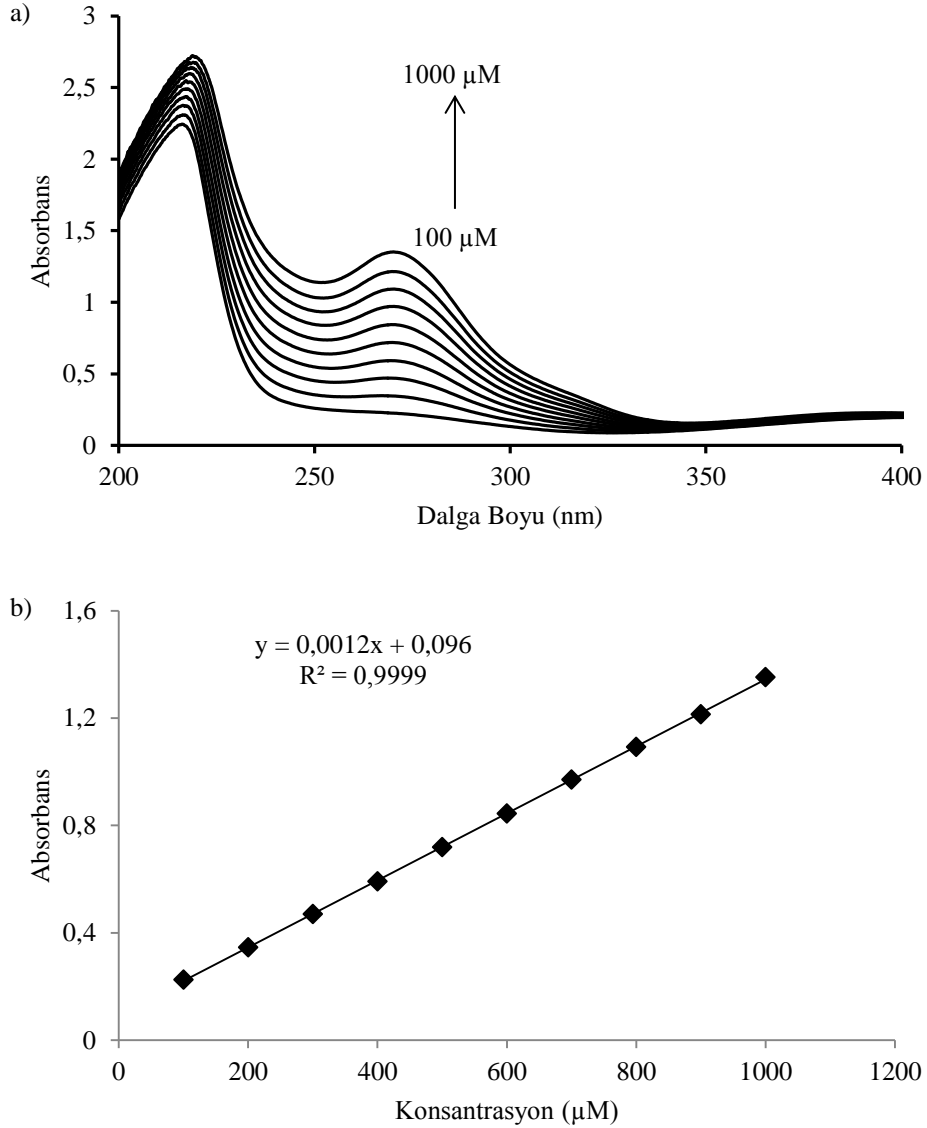
Şekil 4.10. Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

Cys'nin gümüş nanoparçacığına $-\text{SH}$ grubu ile bağlanması SPR'nin düşmesine ve absorbansın azalmasına neden olmuştur. Cys'nin tek başına ve Ni^{2+} iyon çözeltisi ile beraberken elde edilen absorpsiyon spektrumlarından yapı hakkında bilgi elde edilememiştir. Bu sonuçlar, AgGSH, Ni^{2+} iyonu ve Cys çözeltilerinin birarada bulunduğu elde edilen pikin bu üç bileşenin etkileşimi sonucu ortaya çıktığının kanıtı olarak gösterilebilir. AgGSHNi²⁺Cys çözeltisinin ölçülen pH'ı 6,60'tır.



Şekil 4.11. AgGSHNi²⁺Cys, AgGSH, AgGSH ve Ni^{2+} , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Ni^{2+} çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

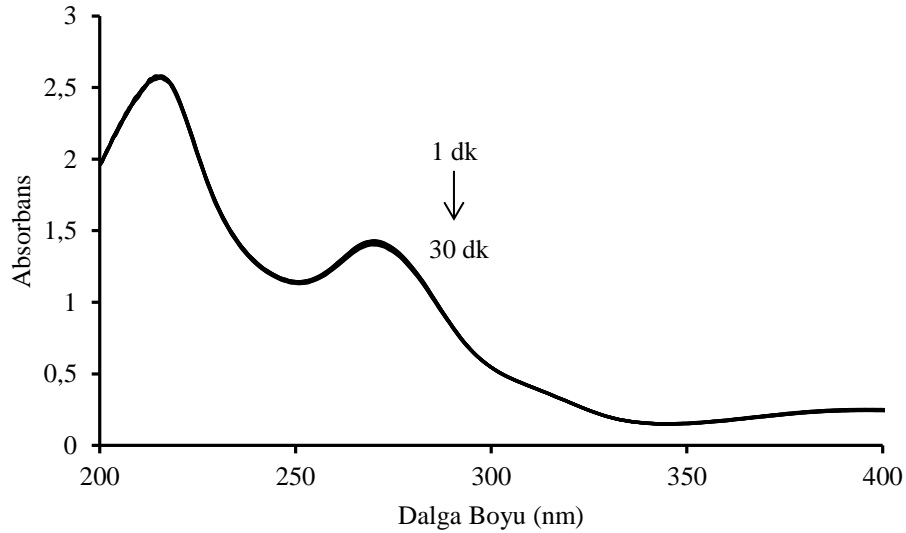
Şekil 4.12'deki kalibrasyon doğrusu, 270,1 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 1000 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir.



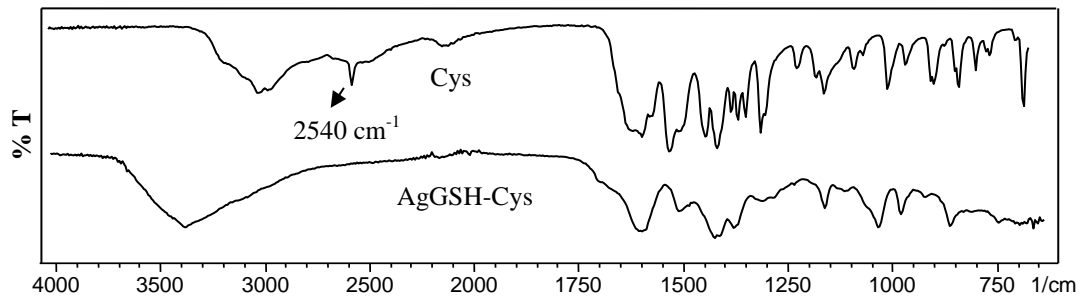
Şekil 4.12. Ni^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)

Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Zamanla absorbansta az da olsa azalma gözlenmiştir. Bu azalma ortamda serbest halde bulunan Cys moleküllerinin gümüş nanoparçacığına bağlanmasından kaynaklanmaktadır. AgGSH ve Cys karışımının çözücüsünün buharlaştırılması

sonrasında alınan FTIR spektrumunda Cys'nin 2540 cm^{-1} 'de ortaya çıkan $-\text{SH}$ pikinin olmaması bu görüşü desteklemektedir (Şekil 4.14). Diğer sistein tayinlerinde de aynı durum söz konusu olup sonraki bölümlerde bu durumun nedeninden bahsedilmeyecektir.



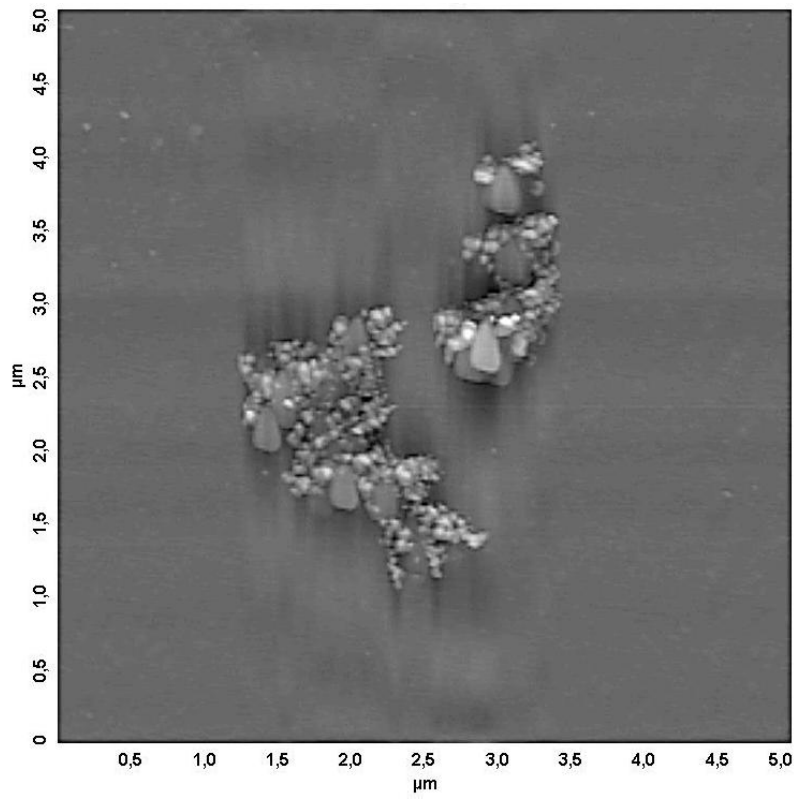
Şekil 4.13. Zamanla değişen $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ absorbansları



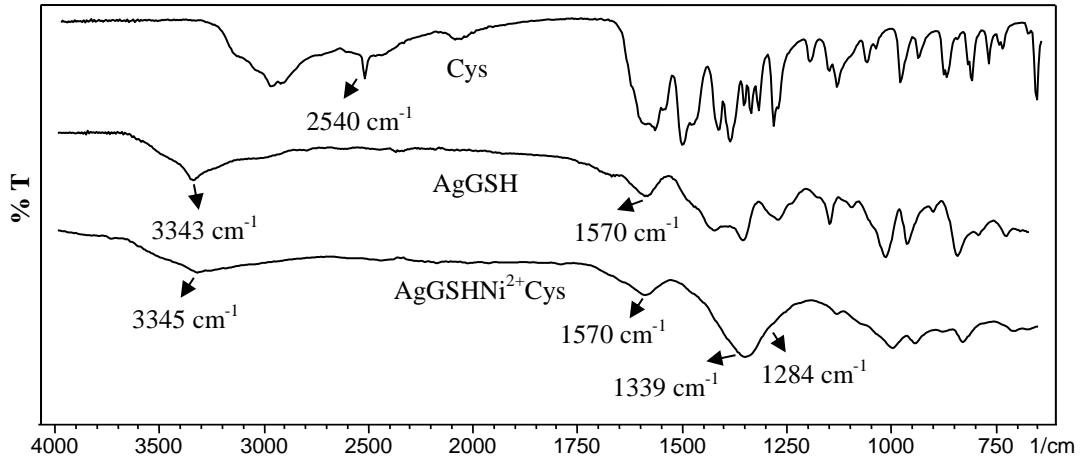
Şekil 4.14. Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

Şekil 4.15'de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir. Şekil 4.16 ise $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ kompleksinin yapı analizinin yapılabilmesi için alınan FTIR spektrumlarını göstermektedir. Cys spektrumunda görülen 2540 cm^{-1} 'deki $-\text{SH}$ grubuna ait pikin $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ spektrumunda görülmemesi bu grubun gümüş nanoparçacığına bağlandığını göstermektedir. AgGSH spektrumunda görülen $-\text{NH}_3^+$ grubuna ait 3343 cm^{-1} 'deki ve $-\text{COO}^-$

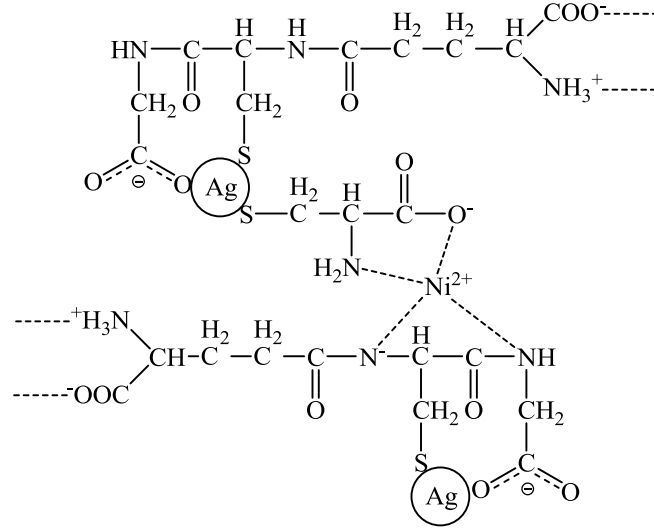
grubuna ait 1570 cm^{-1} 'deki titreşim absorpsiyon piklerinin $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ spektrumunda 3345 cm^{-1} ve 1570 cm^{-1} 'de görülmektedir. Buradan $-\text{NH}_3^+$ ve $-\text{COO}^-$ gruplarını etkileşime girmediği sonucu çıkmaktadır. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ spektrumunda karboksilat gruplarının simetrik ve asimetrik titreşim pikleri, 1284 ve 1339 cm^{-1} 'de görülen $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 'den kaynaklanan nitrat gruplarının güçlü titreşim absorpsiyonu pikleri ile örtüşmüştür. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.17'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.15. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{Cys}$ yapısının AFM görüntüsü ($5 \times 5\ \mu\text{m}$)



Şekil 4.16. AgGSHNi²⁺Cys, Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

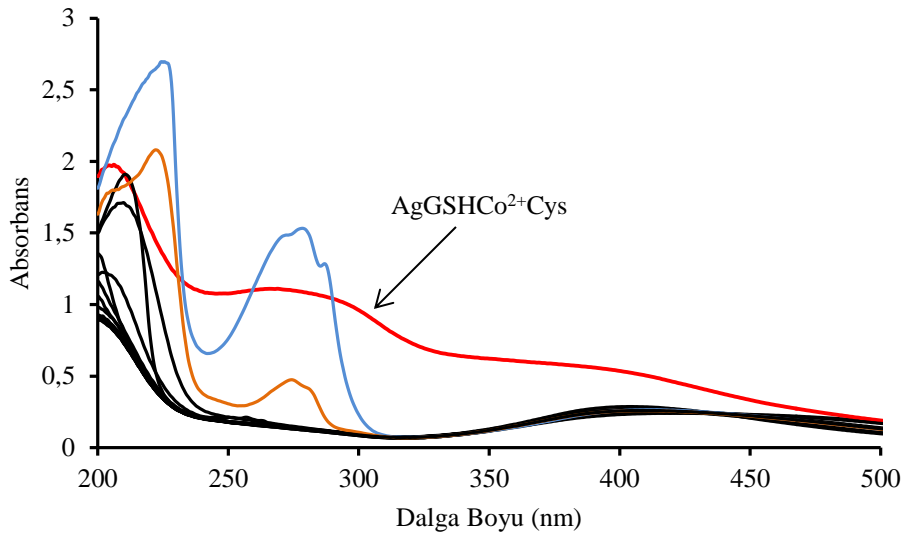


Şekil 4.17. AgGSHNi²⁺Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.1.2. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini

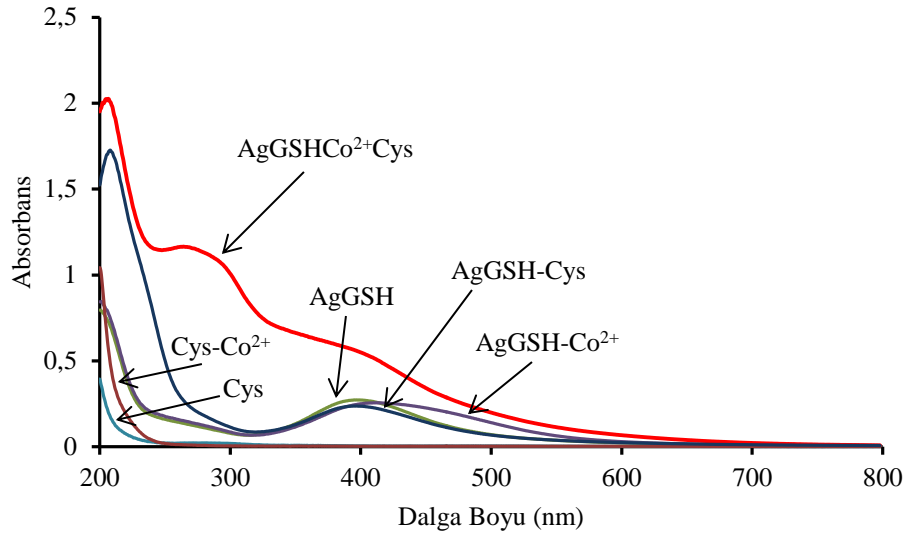
Co²⁺ iyonu bulunan ortamda amino asit etkileşimlerini görebilmek amacıyla yirmi amino asitle denemeler yapılmıştır (Şekil 4.18). Absorpsiyon spektrumlarından anlaşılacağı gibi sistein bulunan ortamda iki omuza sahip çok güçlü absorpsiyon piki elde edilmiştir. Sisteinin yanında histidin, arginin ve lizin amino asitlerinin de sistein kadar güçlü olmasa da modifiye gümüş nanoparçacıkları ile etkileşime girdiğine karar verilmiştir. Bu etkileşimler daha sonraki bölümlerde incelenecektir.

Gözlenen pikin $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve Cys , Cys , Cys ve Co^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.19). AgGSH ve Co^{2+} iyonunu çözeltilerinin karışımına ait spektrumda 414 ile 529 nm'ler arasında, Co^{2+} iyonunun agregasyona neden olmasından dolayı geniş bir pik elde edilmiştir. Cys ve Co^{2+} iyonu çözeltilerinin karışımından alınan absorpsiyon spektrumundan yapı hakkında bilgi elde edilememiştir. Bu sonuçlar AgGSH , Co^{2+} iyonu ve Cys arasında bir etkileşimin varlığını göstermektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 6,40'tır.

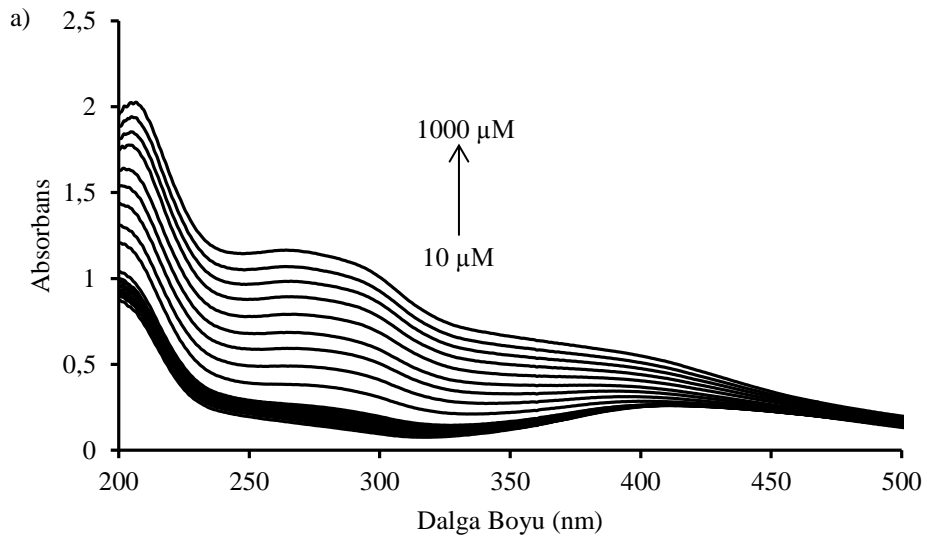


Şekil 4.18. Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Co^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

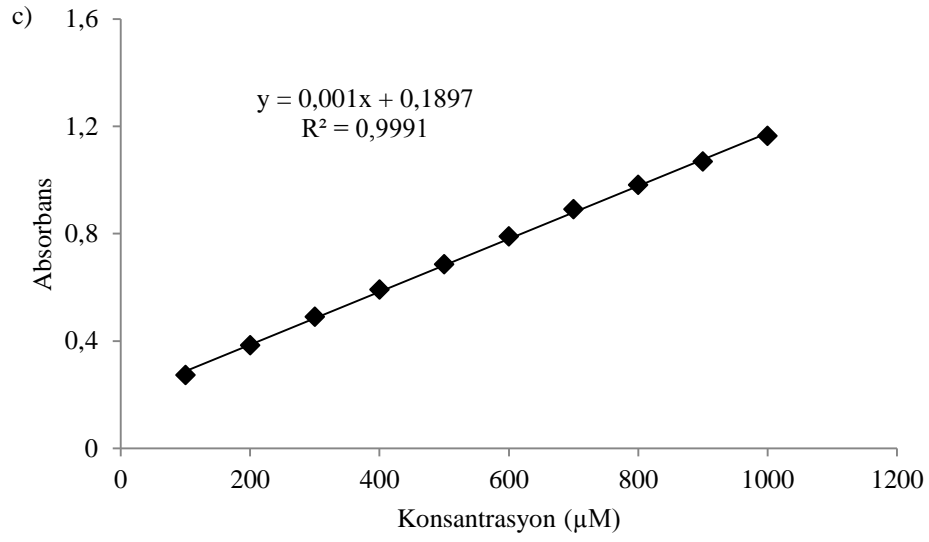
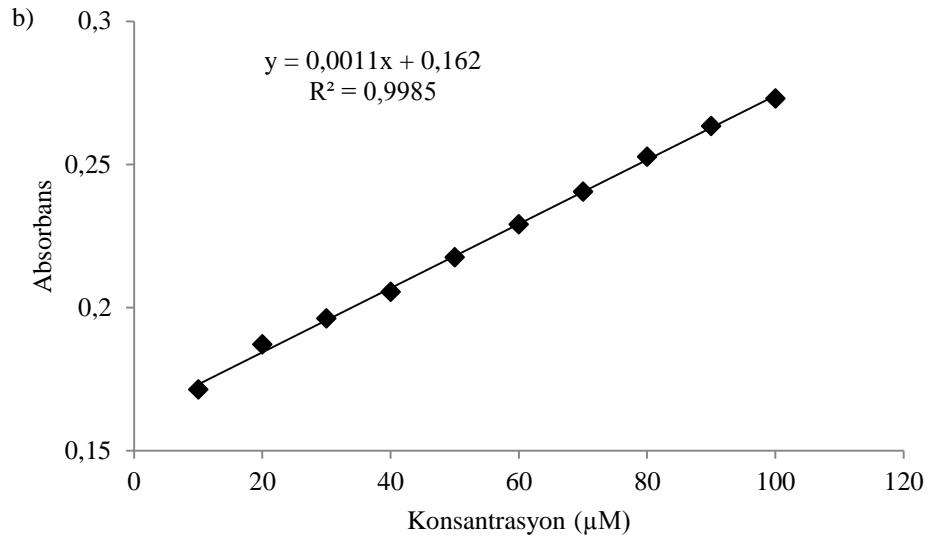
$\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ yapısı için kalibrasyon doğruları 261,5 ve 397 nm'deki absorbans değişimleri ile hazırlanmıştır. 261,5 nm'de 10 – 100 μM ve 100 – 1000 μM olmak üzere iki ayrı doğrusallık elde edilmiştir. Ayrıca 397 nm'de 100 – 1000 μM konsantrasyonları arasında doğrusallık gözlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının denklemleri ve korelasyon katsayıları grafikler üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.20).



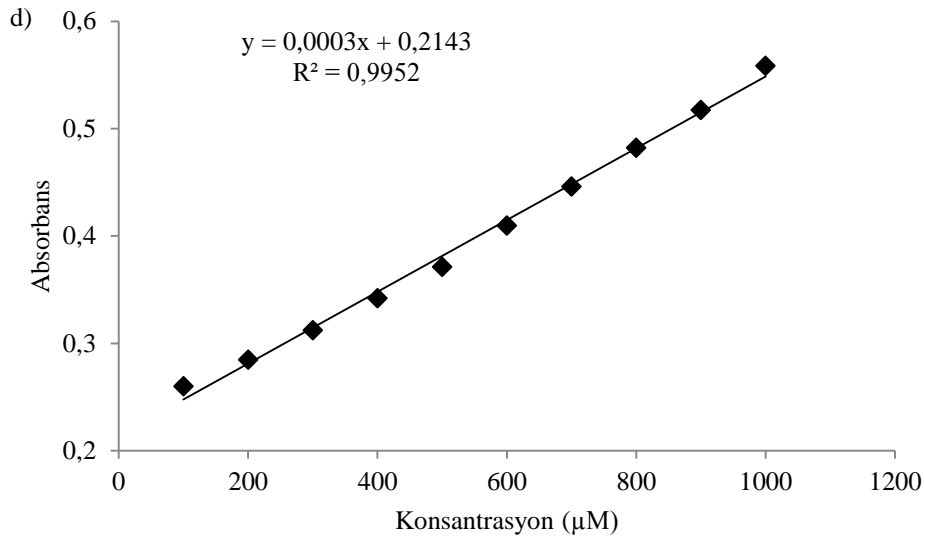
Şekil 4.19. AgGSHCo²⁺Cys, AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Co²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.20. Co²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a) ve 261,5 nm 10 – 100 µM (b), 261,5 nm 100 – 1000 µM (c), 397 nm 100 – 1000 µM (d) kalibrasyon doğruları

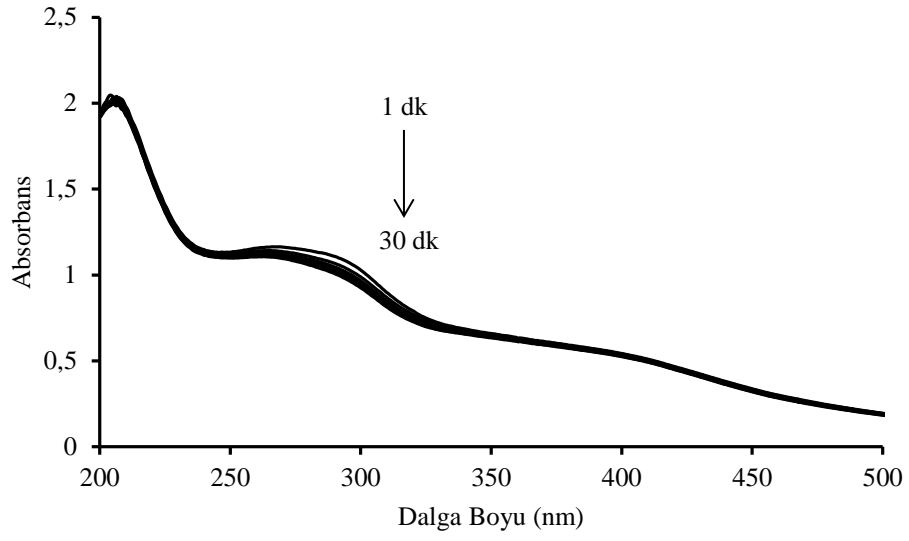


Şekil 4.20(Devam). Co^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 261,5 nm 10 – 100 μM (b), 261,5 nm 100 – 1000 μM (c), 397 nm 100 – 1000 μM (d) kalibrasyon doğruları

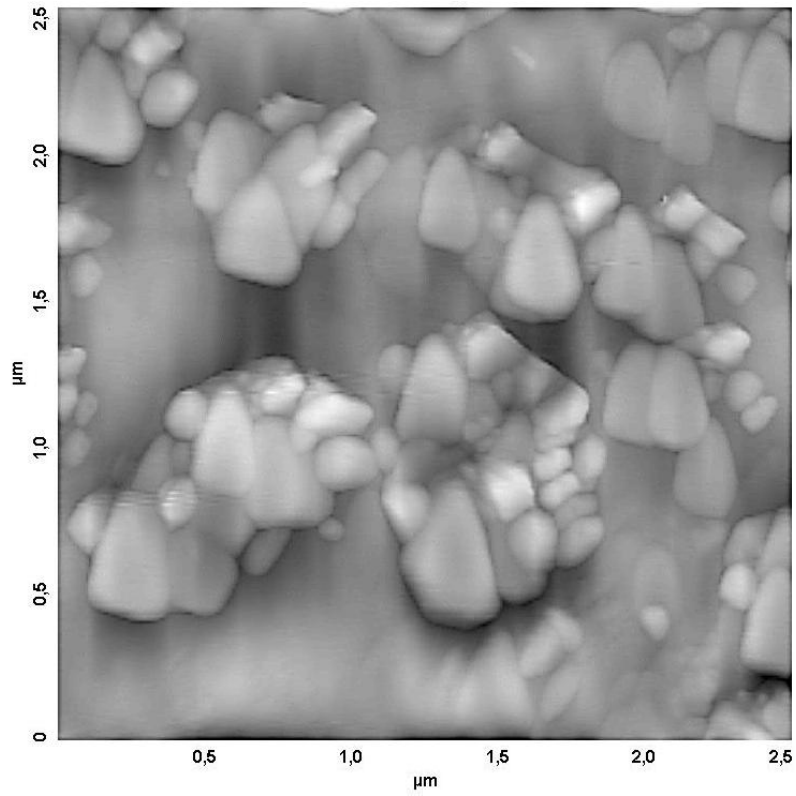


Şekil 4.20(Devam). Co^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 261,5 nm 10 – 100 μM (b), 261,5 nm 100 – 1000 μM (c), 397 nm 100 – 1000 μM (d) kalibrasyon doğruları

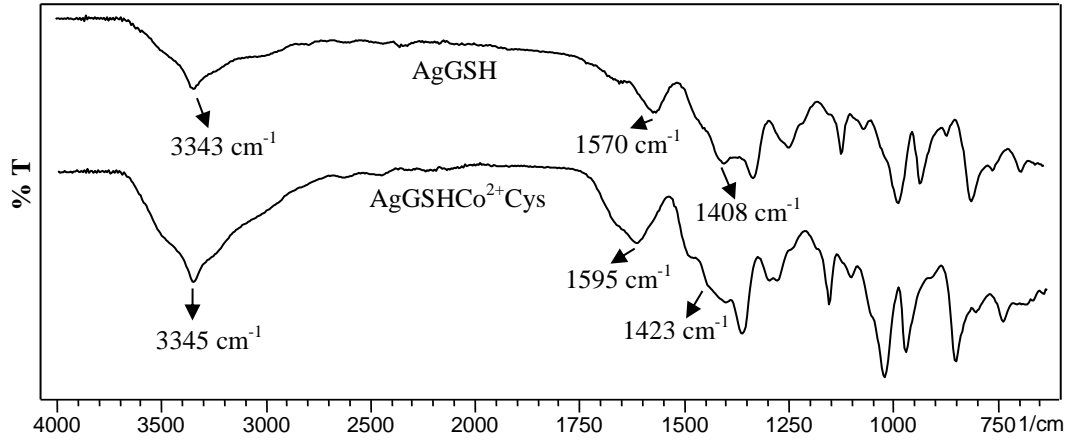
Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.21’de gösterilmiştir. Şekil 4.22’de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ kompleksinin yapı analizi için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.23’de görülmektedir. AgGSH ’de görülen 1408 ve 1570 cm^{-1} ’deki karboksilat grubunun simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanan pikler, $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ yapısının FTIR spektrumunda 1423 ve 1595 cm^{-1} ’de görülmektedir. Bu sonuç karboksilat grubunun komplekse katıldığını göstermektedir. AgGSH ’in FTIR spektrumunda 3343 cm^{-1} ’de görülen pik $-\text{NH}_3^+$ grubuna aittir. Bu gruba ait pik $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ ’nin FTIR spektrumunda 3345 cm^{-1} görülmektedir. Pikin yer değiştirmemesi $-\text{NH}_3^+$ grubunun etkileşime girmediğini göstermektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Cys}$ kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.24’de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



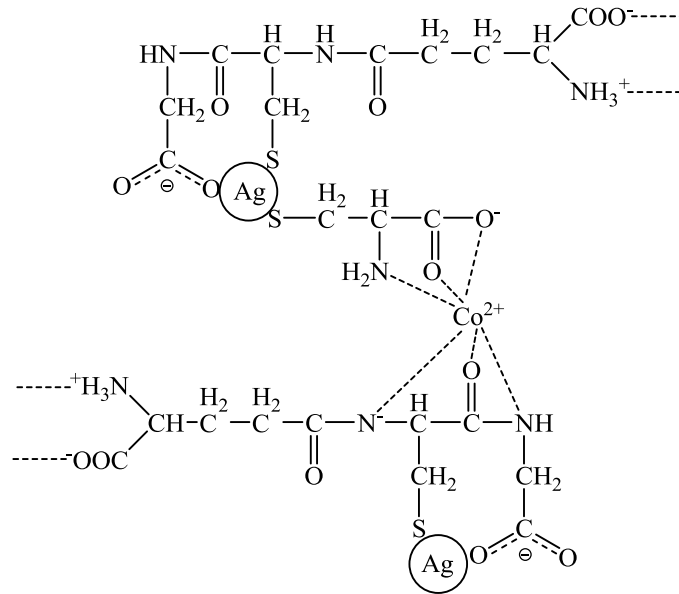
Şekil 4.21. Zamanla değişen AgGSHCo²⁺Cys absorbansları



Şekil 4.22. AgGSHCo²⁺Cys yapısının AFM görüntüsü (2,5x2,5 µm)



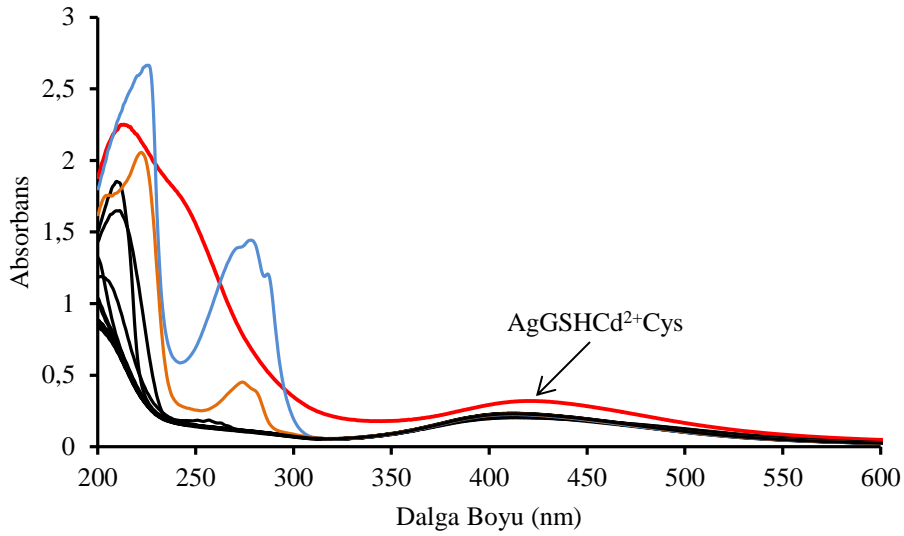
Şekil 4.23. AgGSHCo²⁺Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.24. AgGSHCo²⁺Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.1.3. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini

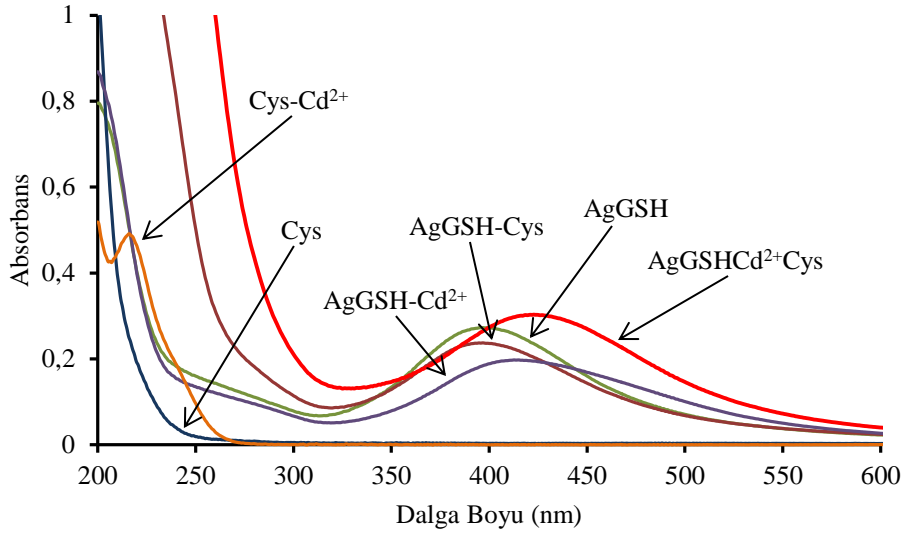
Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda yirmi amino asit ile yapılan etkileşim denemeleri Şekil 4.25'de gösterilmektedir. Cys bulunan ortamda belirgin bir absorbans değişimi söz konusudur. Diğer amino asitlerle kayda değer bir etkileşim gözlenmemiştir.



Şekil 4.25. Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Cd^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

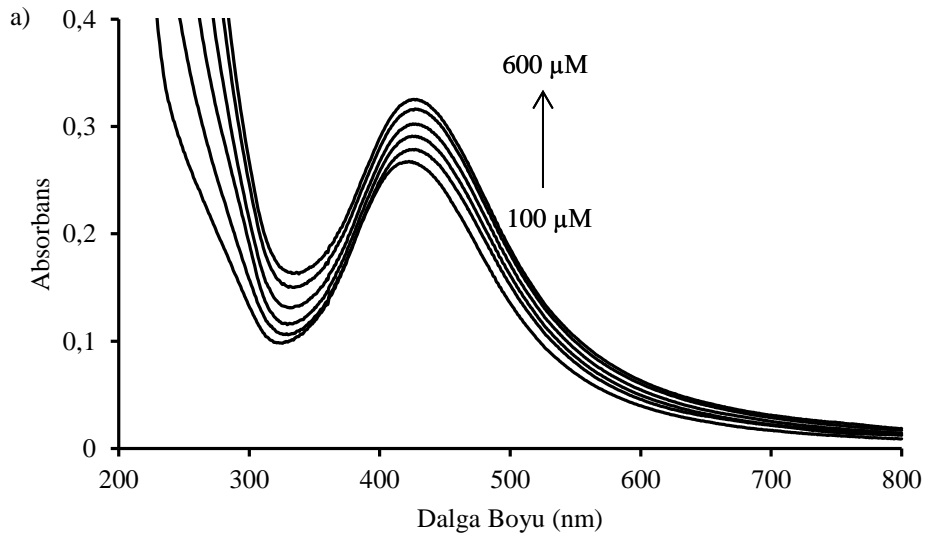
Gözlenen pikin $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{Cys}$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH , AgGSH ve Cd^{2+} , AgGSH ve Cys , Cys , Cys ve Cd^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.26). AgGSH ve Cd^{2+} iyonu bulunan ortamda, Ni^{2+} ve Co^{2+} iyonları bulunan ortama göre daha az pik genişlemesi görülmüştür. Cys ve Cd^{2+} iyonu bulunan çözelti absorbansında ise 216 nm de $\text{Cys} - \text{Cd}^{2+}$ etkileşiminden dolayı bir pik gözlenmiştir. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{Cys}$ çözeltisinin absorbansı diğer karışımlardan farklı olup pikin kırmızıya kayma gözlenmiştir. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{Cys}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,01'dir.

Şekil 4.27'deki kalibrasyon doğrusu, 423 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 600 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.28'de gösterilmiştir. Şekil 4.29'da gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir.

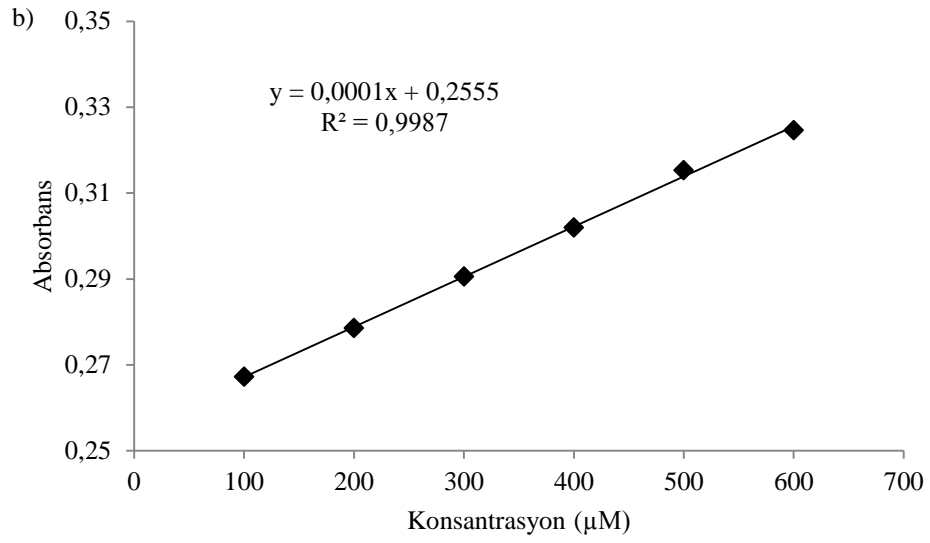


Şekil 4.26. AgGSHCd²⁺Cys, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Cd²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

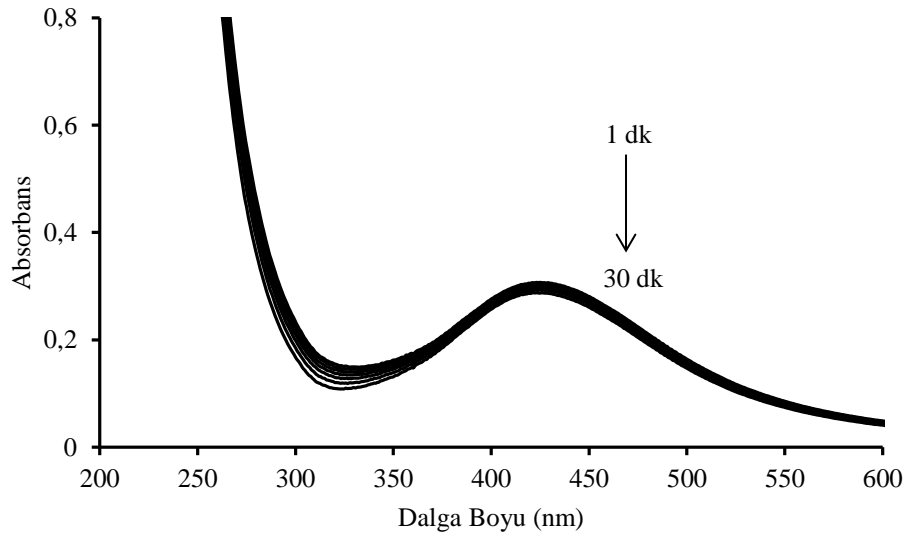
AgGSH ve AgGSHCd²⁺Cys'nin FTIR spektrumları Şekil 4.30'da gösterilmiştir. AgGSH'deki 3343 cm⁻¹ deki -NH₃⁺ piki AgGSHCd²⁺Cys'de 3342 cm⁻¹'de çıkması bu grubun etkileşime katılmadığını göstermektedir. Karboksilat titreşimleri ise Cd(CH₃COO)₂'tan kaynaklanan asetat grubu ile örtüşmektedir ve AgGSHCd²⁺Cys spektrumunda 1556 ve 1404 cm⁻¹'de çıkmıştır.



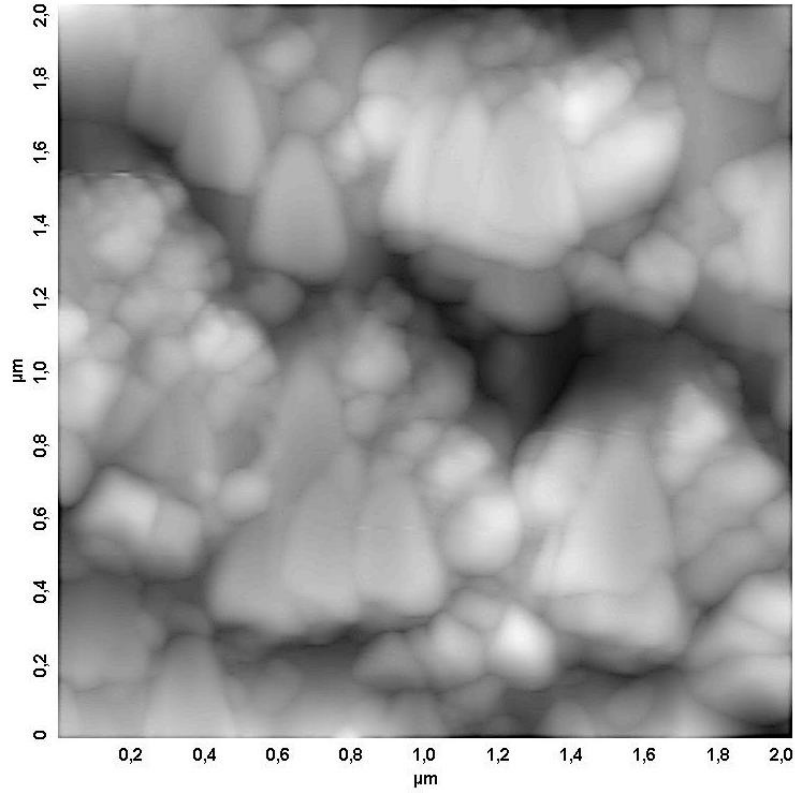
Şekil 4.27. Cd²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



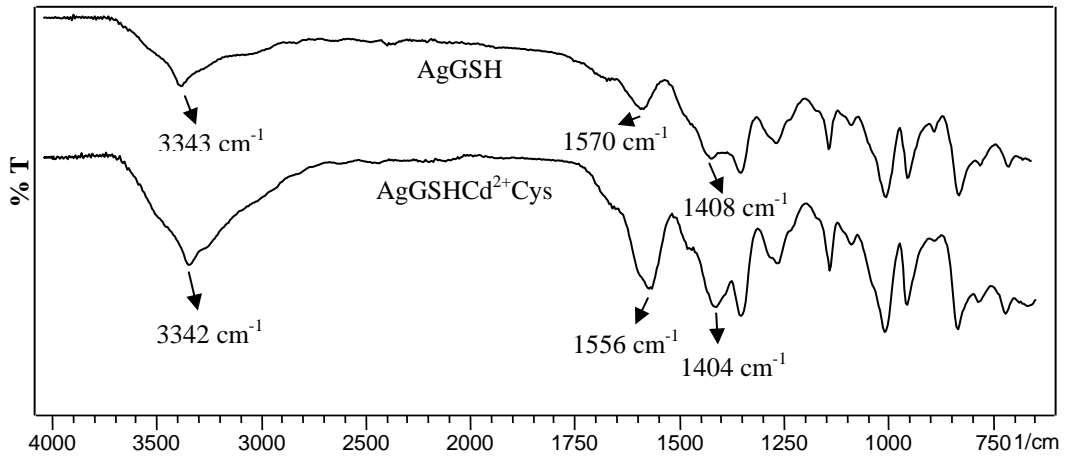
Şekil 4.27(Devam). Cd^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.28. Zamanla değişen AgGSHCd^{2+} Cys absorbansları

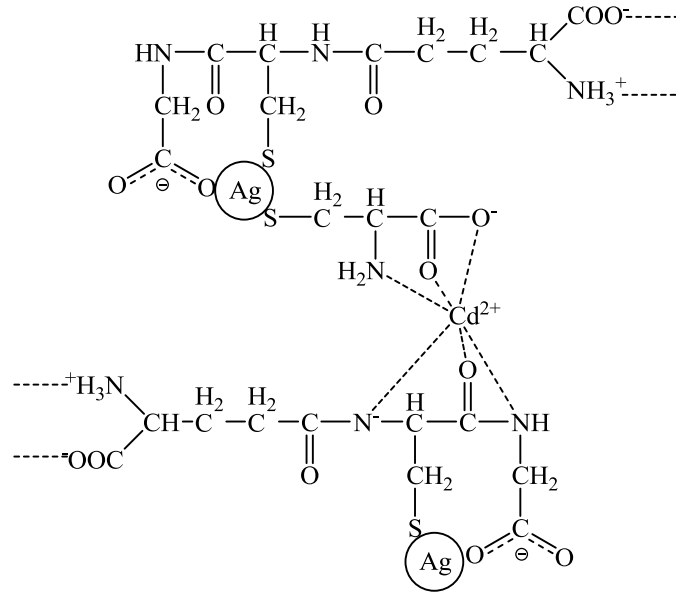


Şekil 4.29. AgGSHCd²⁺Cys yapısının AFM görüntüsü (2x2 μm)



Şekil 4.30. AgGSHCd²⁺Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

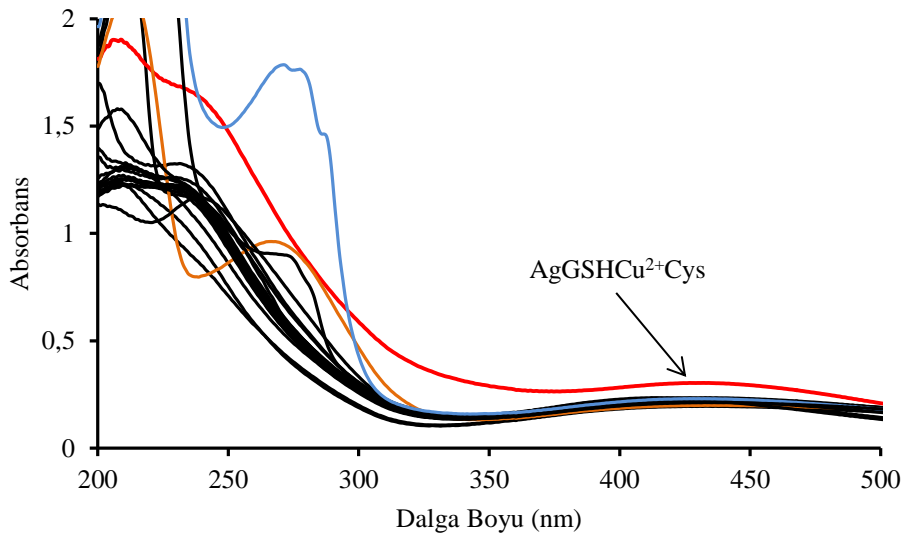
AgGSHCd²⁺Cys kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.31'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.31. AgGSHCd²⁺Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli

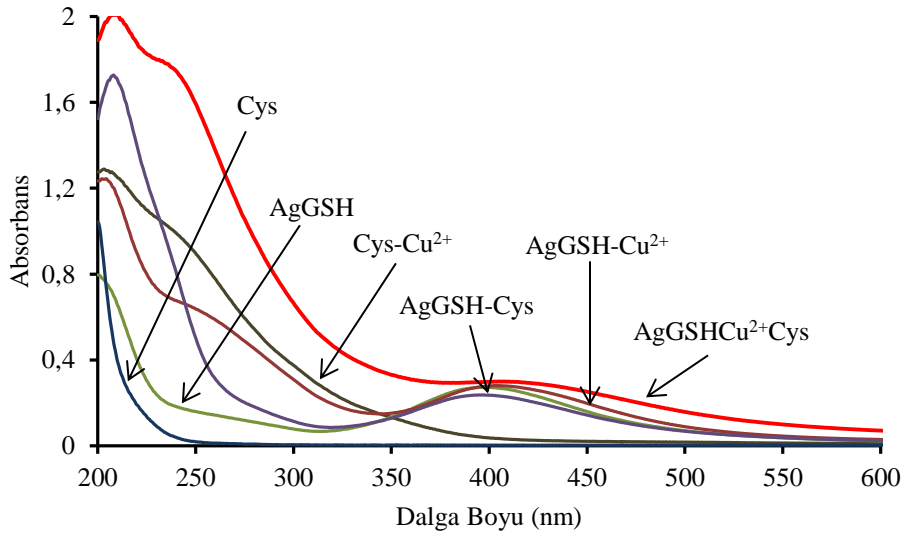
4.2.1.4. Cu²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini

Cu²⁺ iyonu bulunan ortamda etkileşim veren amino asitleri bulmak amacıyla yirmi amino asit ile yapılan denemelerin absorpsiyon spektrumları Şekil 4.32'de gösterilmektedir.



Şekil 4.32. Sistein ve diğır amin asit çözeltilerinin Cu²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

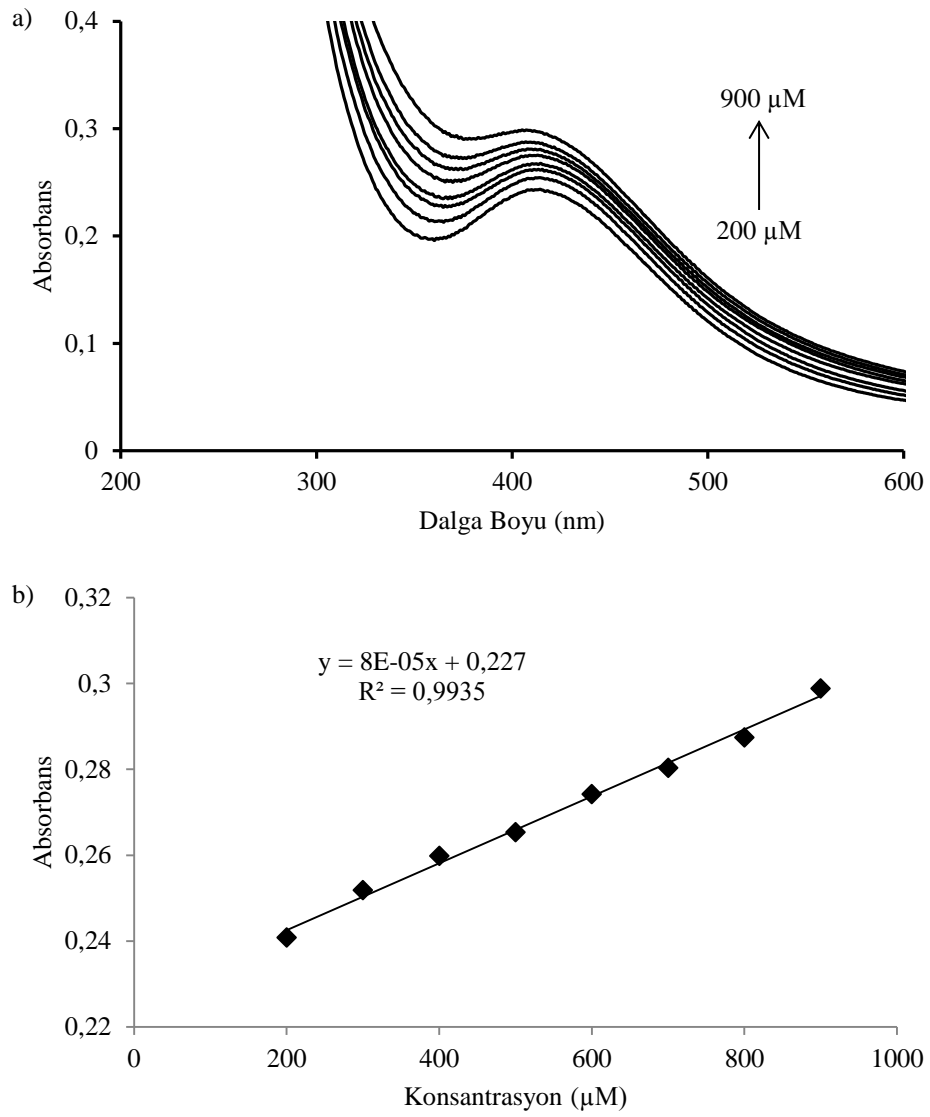
Cys bulunan ortamda gözlenen absorbans değişiminin yanında histidin amino asidinin absorbans spektrumunda da farklılık gözlenmiştir. His için gözlenen bu değişim diğer bölümlerde incelenecektir. Cys'de gözlenen pikin $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.33).



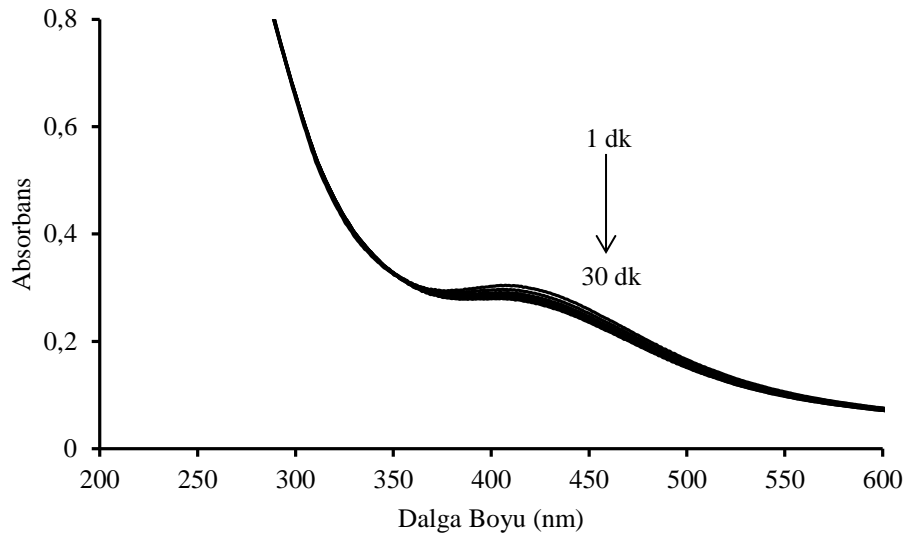
Şekil 4.33. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

AgGSH ve Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda pikin kırmızıya (403 nm) kaydığı gözlenmiştir. Cys ve Cu^{2+} çözelti karışımında meydana gelen etkileşim nedeniyle 255 nm'de bir pik oluşmuştur. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ çözeltisinin absorbansı diğer çözelti karışımlarından ayrılmıştır. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{Cys}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,10'dur.

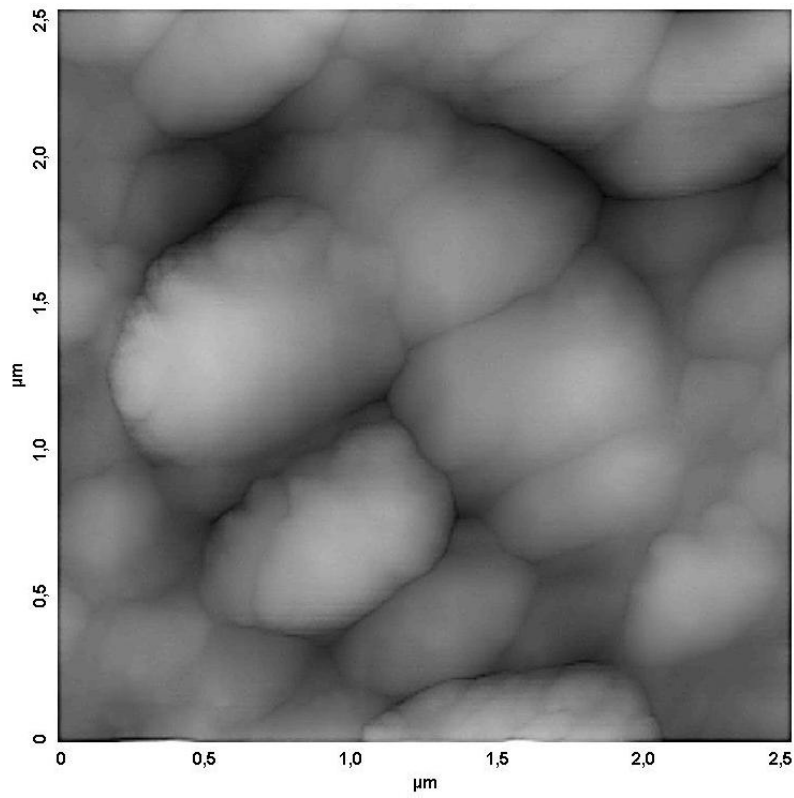
Şekil 4.34'de kalibrasyon doğrusu, 405 nm'deki absorbans değişimlerinin 200 – 900 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.35'de gösterilmiştir. AFM görüntüsü Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.34. Cu^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



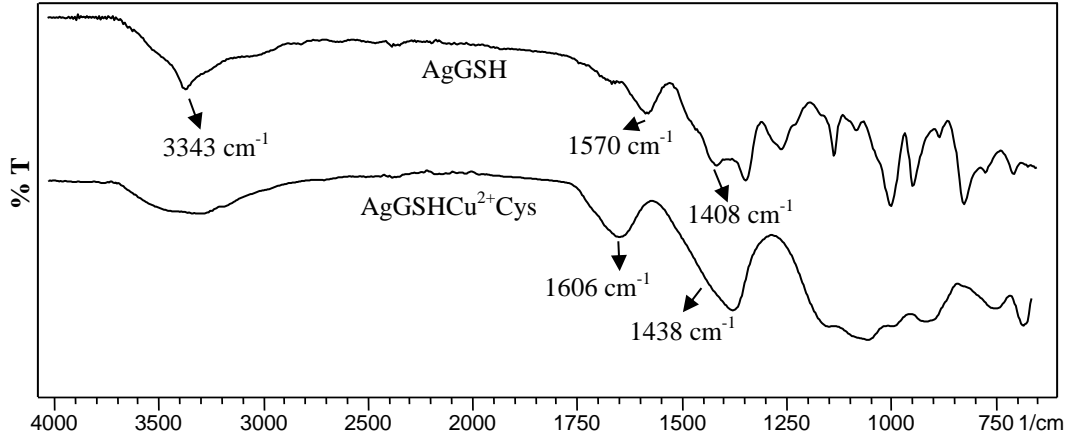
Şekil 4.35. Zamanla değişen AgGSHCu²⁺Cys absorbansları



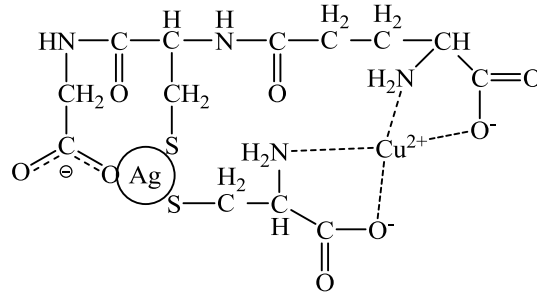
Şekil 4.36. AgGSHCu²⁺Cys yapısının AFM görüntüsü (2,5x2,5 µm)

AgGSH ve AgGSHCu²⁺Cys'in FTIR spektrumları Şekil 4.37'de gösterilmektedir. AgGSH spektrumunda görülen ve -NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹'deki pikin AgGSHCu²⁺Cys spektrumunda çıkmaması bu grubun komplekse katıldığını

göstermektedir. AgGSH'de bulunan 1570 ve 1408 cm^{-1} 'deki karboksilat titreşim pikleri ise AgGSHCu²⁺Cys'de 1606 ve 1438 cm^{-1} 'e kayması bu grubun da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSHCu²⁺Cys kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.38'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



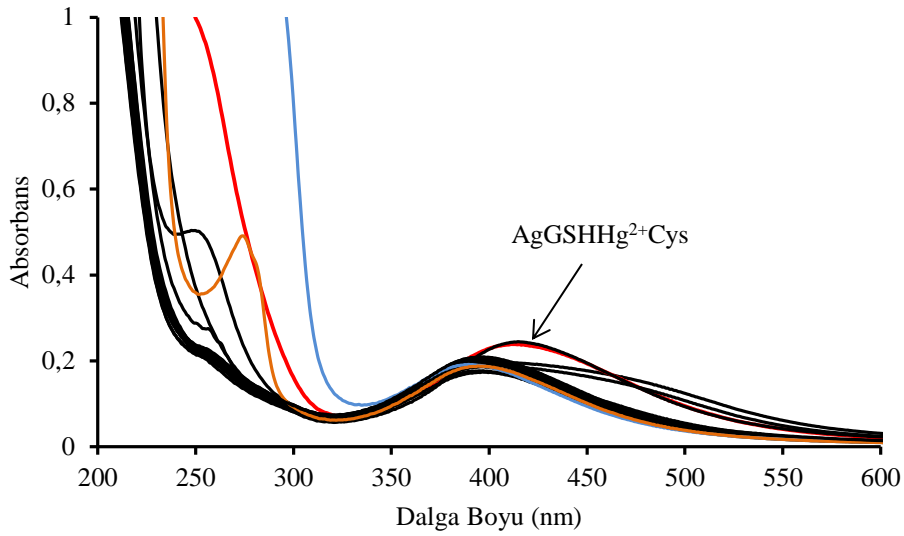
Şekil 4.37. AgGSHCu²⁺Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.38. AgGSHCu²⁺Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.1.5 Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda L-sistein tayini

Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda 20 amino asit ile yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları Şekil 4.39'da gösterilmektedir. Cys'nin yanında histidin, arginin, lisin ve metiyonin amino asitlerinde etkileşim verdiği gözlenmiştir. Bu etkileşimler diğer bölümlerde incelenecektir.

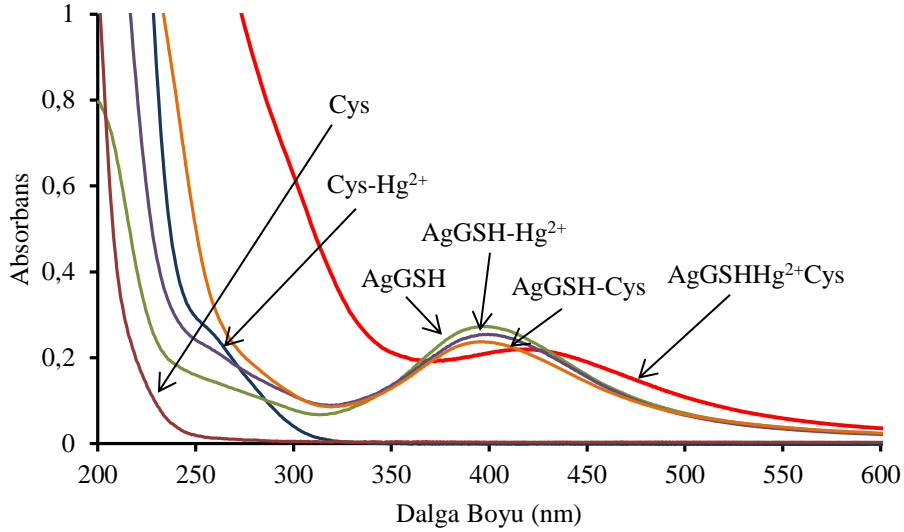


Şekil 4.39. Sistein ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

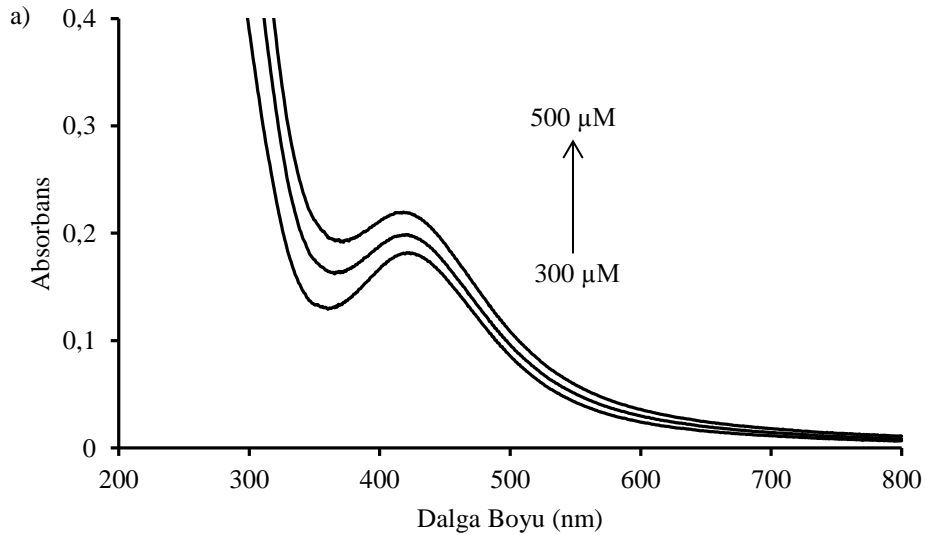
Gözlenen pikin $AgGSHHg^{2+}Cys$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için $AgGSH$, $AgGSH$ ve Hg^{2+} , $AgGSH$ ve Cys , Cys , Cys ve Hg^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.40). $AgGSH$ ve Hg^{2+} iyonu bulunan çözelti karışımının absorpsiyon şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu düşüş, Sumesh ve arkadaşları [473] tarafından açıklanan adsorpsiyon ve amalgam oluşumundan kaynaklanmaktadır. Hg^{2+} iyonlarının gümüş nanoparçacığına adsorpsiyonu SPR'yi düşüreceğinden absorbans azalacaktır. Öte yandan gümüş ile oluşacak civa amalgamı $AgGSH$ yapısının konsantrasyonunu düşürecektir. Diğer tüm tayinlerde bahsi geçen $AgGSH$ ve Hg^{2+} iyon çözeltisi karışımlarının absorpsiyon spektrumlarında aynı durum söz konusu olup sonraki bölümlerde bu durumun nedeninden bahsedilmeyecektir. Cys ve Hg^{2+} iyonu bulunan çözelti karışımının absorpsiyon spektrumunda, 261 nm'de etkileşimden kaynaklanan küçük bir pik oluşmuştur. $AgGSHHg^{2+}Cys$ çözeltisinin absorpsiyon spektrumunun diğer karışım çözeltilerinin absorpsiyon spektrumundan farklı olduğu belirlenmiştir. $AgGSHHg^{2+}Cys$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,20'dir.

Şekil 4.41'deki kalibrasyon doğrusu, 418 nm'deki absorbans değişimlerinin 300 – 500 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde

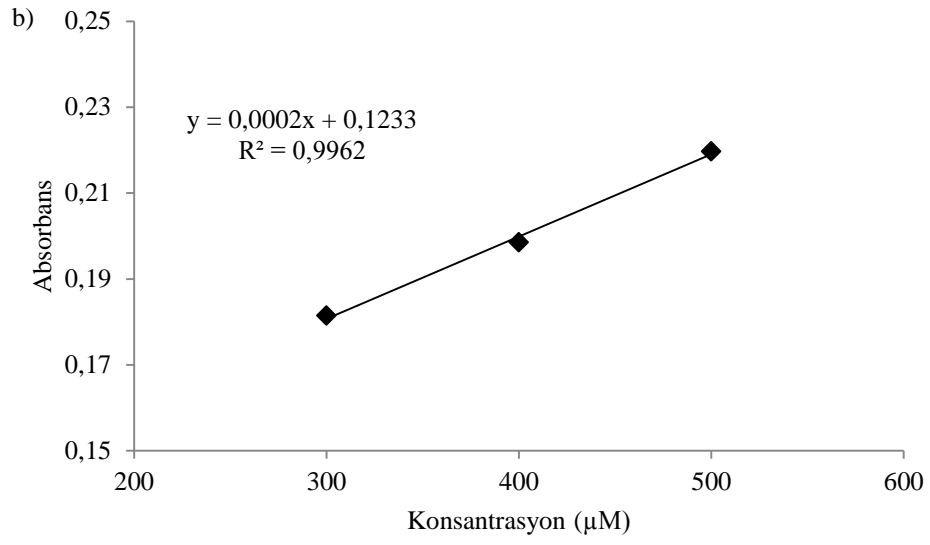
gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.42’de gösterilmiştir. Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} iyonları bulunan ortamlara göre Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda zamanla absorbans şiddetinin az da olsa arttığı görülmüştür. Bu artış gerçekleşen etkileşimin zayıf ve yavaş gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 4.43’de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agrege olduğu görülmektedir.



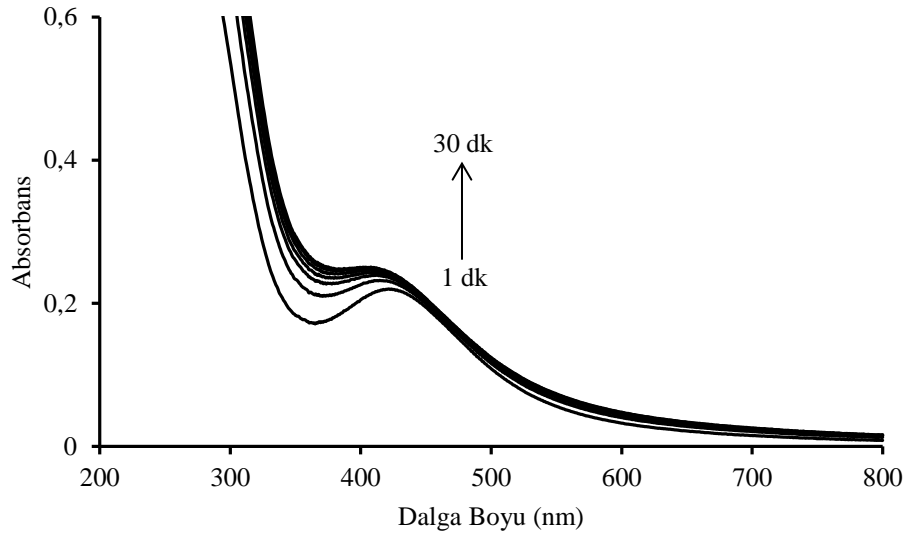
Şekil 4.40. AgGSHHg²⁺Cys, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve Cys, Cys, Cys ve Hg²⁺ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



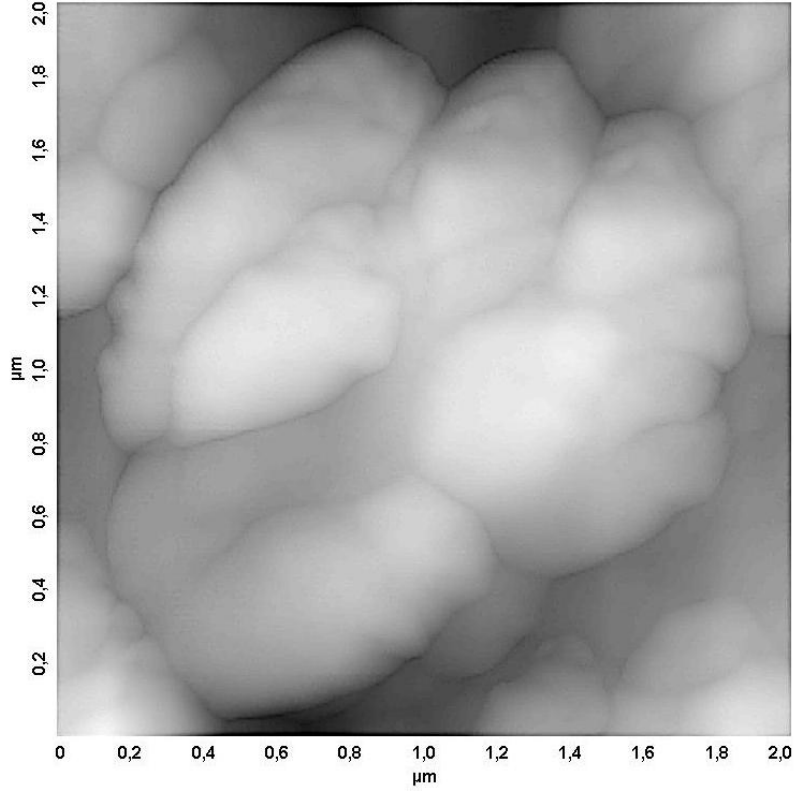
Şekil 4.41. Hg²⁺ bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.41(Devam). Hg^{2+} bulunan ortamda artan Cys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)

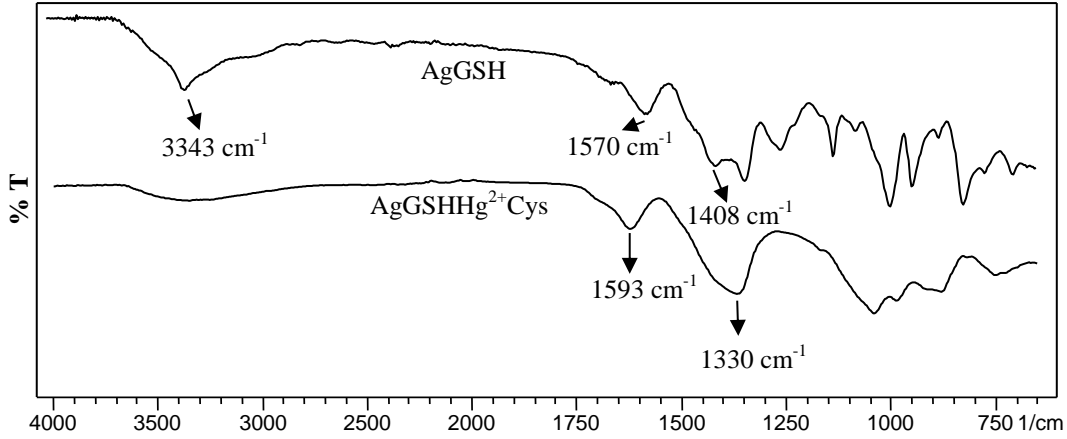


Şekil 4.42. Zamanla değişen AgGSHHg^{2+} Cys absorbansları

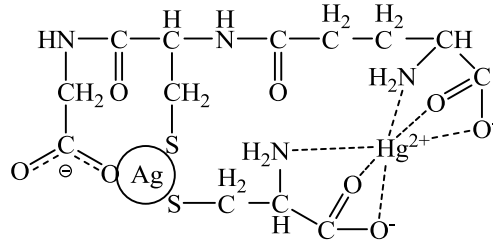


Şekil 4.43. AgGSHHg²⁺Cys yapısının AFM görüntüsü (2x2 μm)

AgGSHHg²⁺Cys kompleksinin yapı aydınlatması için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.44'de görülmektedir. AgGSH spektrumunda görülen 3343 cm⁻¹'deki -NH₃⁺ piki AgGSHHg²⁺Cys spektrumunda görülmemiştir. Bu durum -NH₃⁺ grubunun etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH'deki karboksilat titreşiminden kaynaklanan 1570 cm⁻¹'deki pikin AgGSHHg²⁺Cys spektrumunda 1593 cm⁻¹'e kayması bu pikin de etkileşime katıldığını göstergesidir. AgGSHHg²⁺Cys spektrumunda görülen 1330 cm⁻¹'deki pik Hg(NO₃)₂'den kaynaklanan nitrat grubunun pikidir ve karboksilat pikleri ile örtüşmüştür. AgGSHHg²⁺Cys kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.45'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir. Hg²⁺ için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip Hg²⁺ kompleksleri de mevcuttur [457, 474].



Şekil 4.44. AgGSHHg²⁺Cys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.45. AgGSHHg²⁺Cys yapısının muhtemel bağlanma şekli

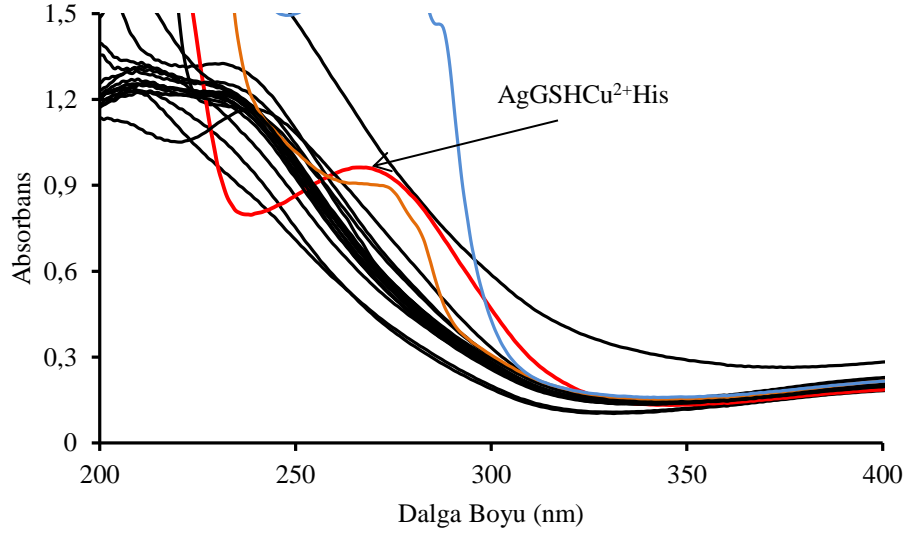
4.2.2. L-histidin tayini

L-histidin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Cu^{2+} , Hg^{2+} ve Co^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumlarının yorumlanmasında ve yapı tahmininde literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [475-478].

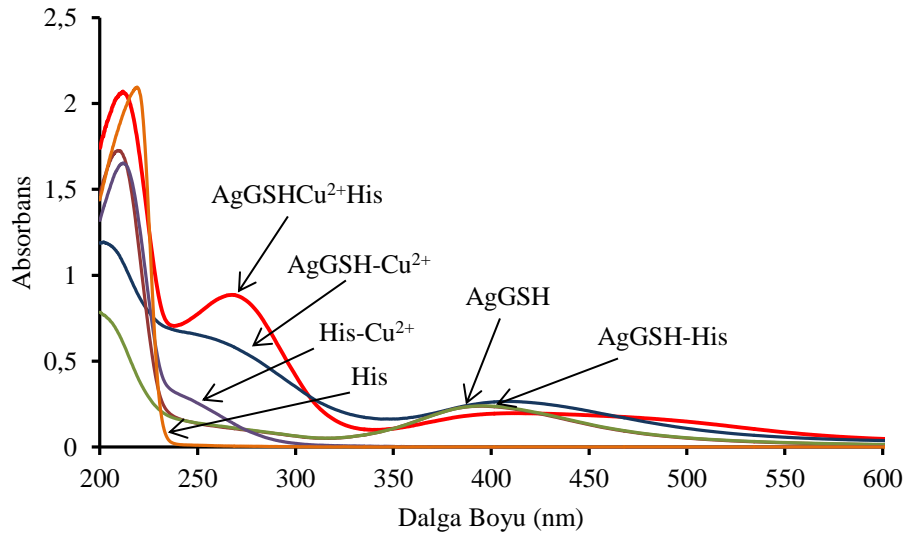
4.2.2.1. Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini

Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda histidin davranışı Şekil 4.46'da gösterilmiştir. 267,7 nm'de ortaya çıkan absorpsiyon piki, AgGSH, Cu^{2+} iyonu ve His amino asidi arasında bir etkileşim varlığına işaret etmektedir. Gözlenen pikin AgGSHCu²⁺His yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve

His, His, His ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.47).



Şekil 4.46. Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

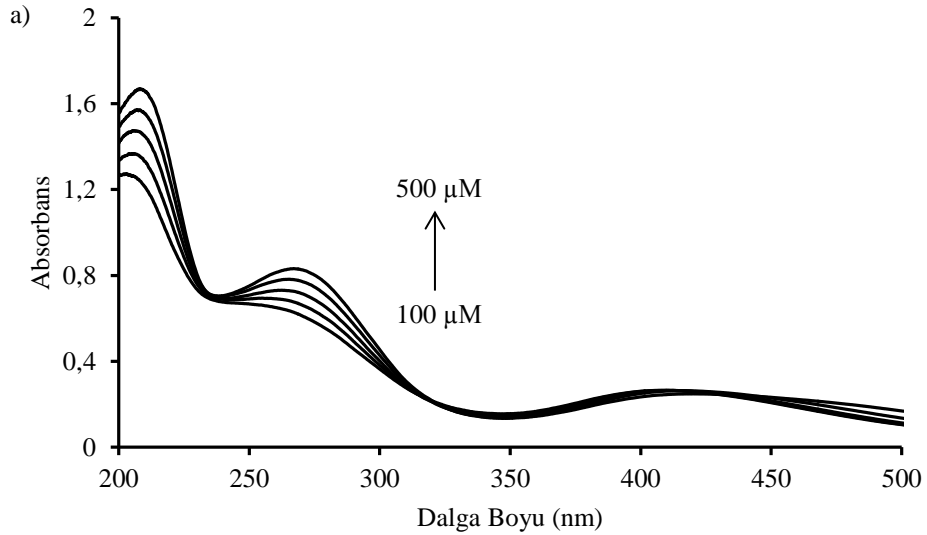


Şekil 4.47. AgGSHCu²⁺His, AgGSH, AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve His, His, His ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

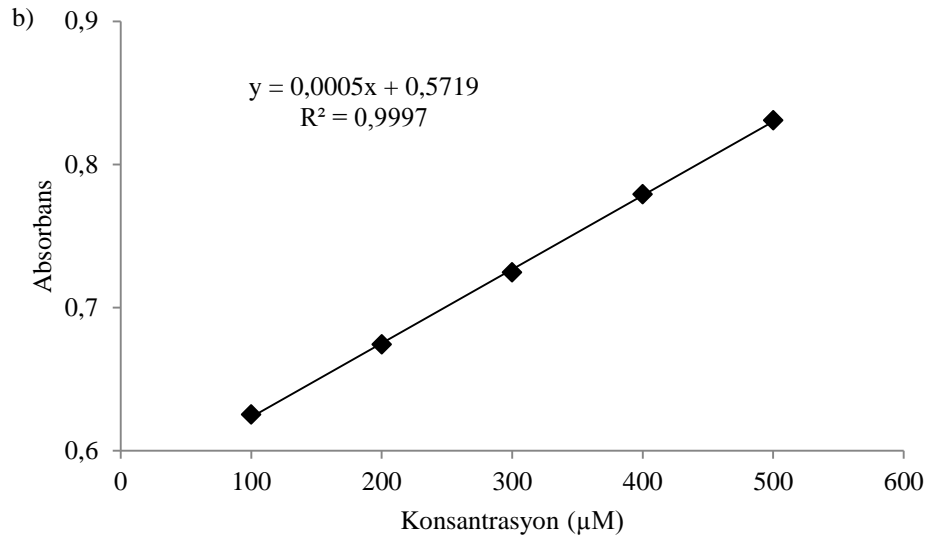
AgGSH ve Cu^{2+} iyonu içeren çözeltinin absorpsiyon spektrumunda 263,7 nm'de bir pik oluşmuştur. AgGSH'in 395 nm'deki absorpsiyon piki ise genişleyerek 407 nm'ye kaymıştır. AgGSH ve Cu^{2+} iyonu arasında bir etkileşim mevcuttur. His ve Cu^{2+}

çözelti karışımında ise 254 nm’de zayıf da olsa bir pik görülmüştür. AgGSH ve His çözeltilinde ise herhangi bir absorpsiyon değişimi gözlenmemiştir. AgGSHCu²⁺His çözeltilinin absorpsiyonunun diğer karışımlardan farklı olduğu görülmüştür. AgGSHCu²⁺His çözeltilinin ölçülen pH’ı 6,80’dir.

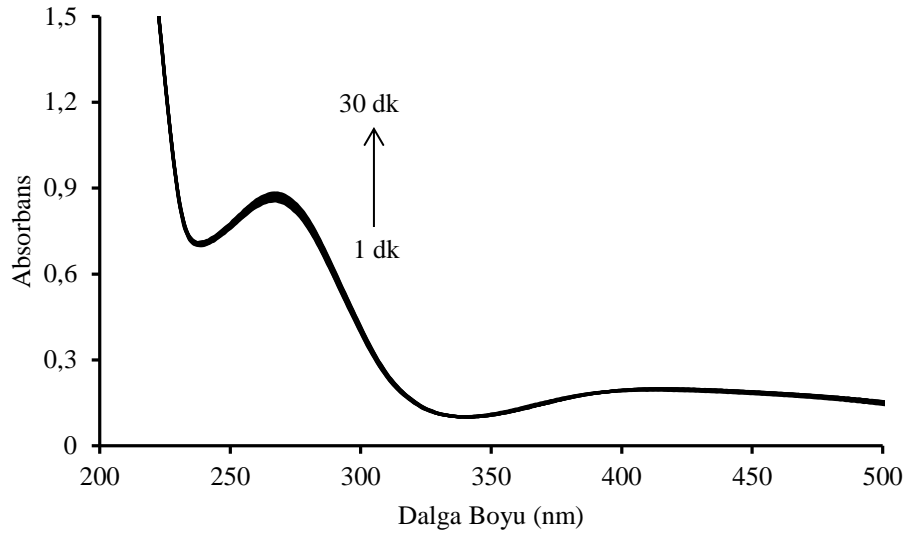
Şekil 4.48’deki kalibrasyon doğrusu, 267,7 nm’deki absorbans değişimlerinin 100 – 500 µM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.49’da gösterilmiştir. Zamanla absorbansta az da olsa artış gözlenmesi kompleksleşmenin yüksek oranda olmayan bir şekilde devam ettiğini göstermektedir. AFM görüntüsü Şekil 4.50’de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



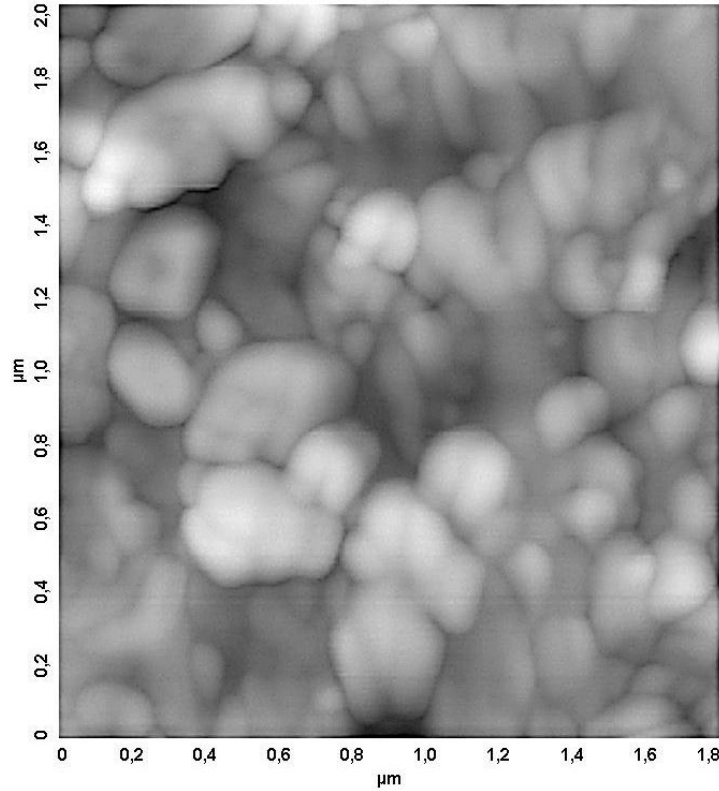
Şekil 4.48. Cu²⁺ bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.48(Devam). Cu^{2+} bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



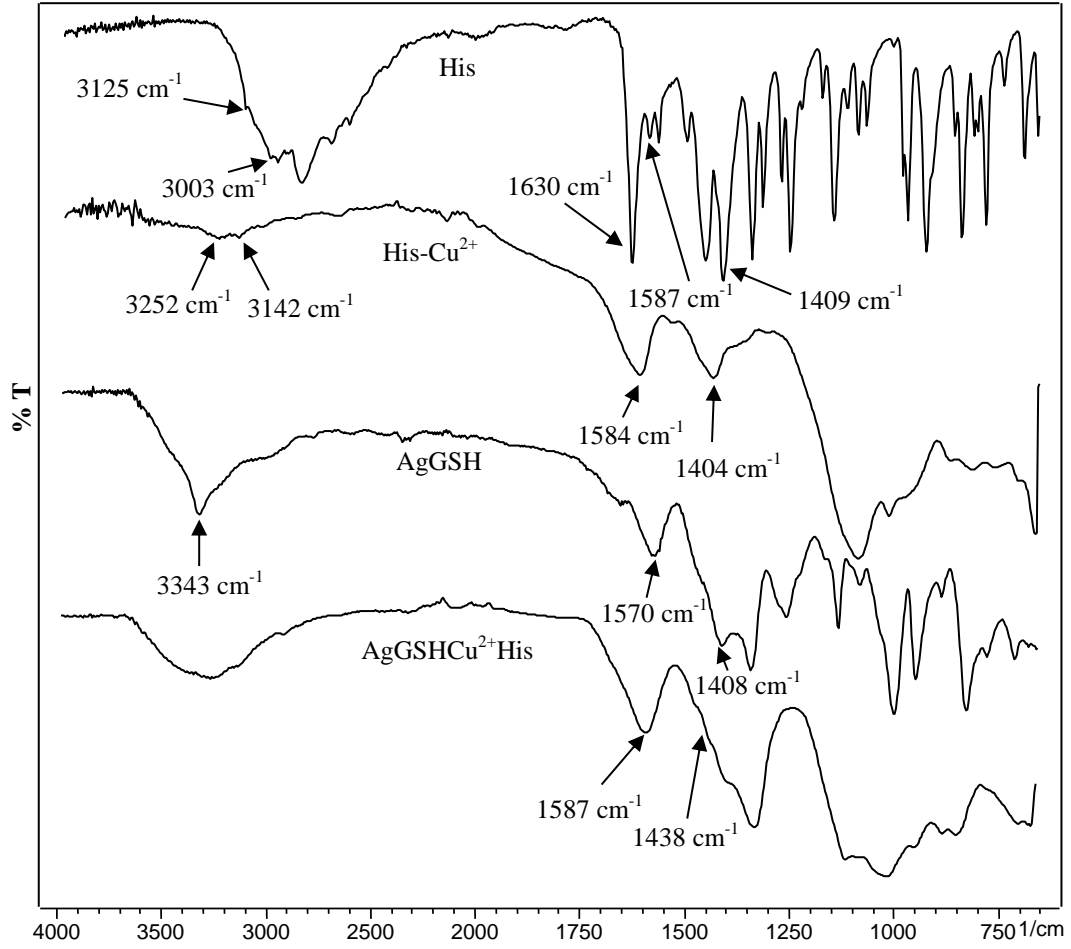
Şekil 4.49. Zamanla değişen AgGSHCu^{2+} His absorbansları



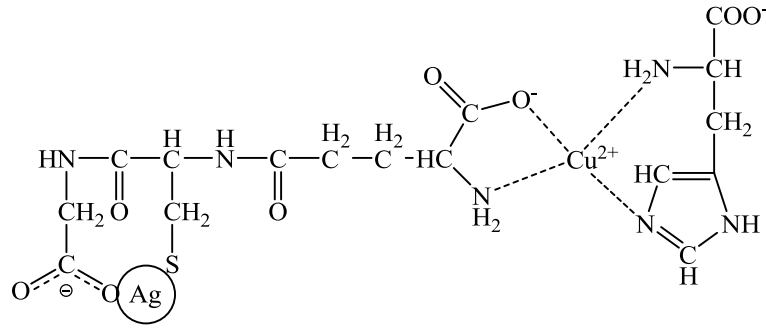
Şekil 4.50. AgGSHCu²⁺His yapısının AFM görüntüsü (2x1,8 µm)

AgGSHCu²⁺His kompleksinin bağlanma yapısının anlaşılabilmesi için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.51’de gösterilmiştir. His amino asidinin AgGSH ile metal iyonu bulunmayan ortamda herhangi bir etkileşim vermediği, UV spektroskopisi ile alınan absorpsiyon spektrumlarında anlaşılmıştır. Cu²⁺ ile verdiği kompleksin yapı analizi için His ve His-Cu²⁺ çözeltilerinin çözücü buharlaştırılması sonrasında FTIR spektrumları alınmıştır. His spektrumunda 3125 ve 3003 cm⁻¹’deki pikler –NH₂ titreşimleri nedeniyle ortaya çıkmıştır. His-Cu²⁺ spektrumunda –NH₂ piklerinin şiddetlerinin azalarak 3252 ve 3142 cm⁻¹’e kayması bu grubun etkileşime girdiğini göstermektedir. 1630 cm⁻¹’deki pik ise –NH grubundan kaynaklanmaktadır ve His-Cu²⁺’da görülmemesi etkileşime katıldığını göstermektedir. Karboksilat grubunun asimetrik ve simetrik gerilmesinden kaynaklanan 1587 ve 1409 cm⁻¹’deki piklerinin ise His-Cu²⁺’da 1584 ve 1404 cm⁻¹’de görülmesi –COO⁻ grubunun etkileşime girmediğini göstermektedir. AgGSHCu²⁺His çözelti spektrumunda ise AgGSH’deki –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹’deki pikin olmadığı bu grubun etkileşime girdiğini göstermektedir. Ayrıca AgGSH çözelti spektrumunda karboksilat

titreşimlerinden kaynaklanan 1570 ve 1408 cm^{-1} 'deki piklerin, $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{His}$ çözelti spektrumunda 1587 ve 1438 cm^{-1} 'e kayması da bu grubun etkileşime girdiğini göstermektedir. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{His}$ kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.52'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



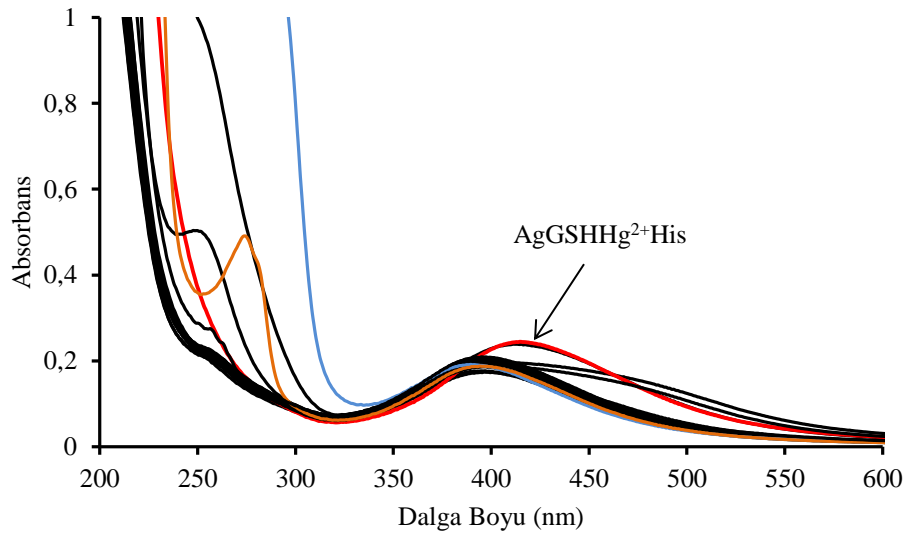
Şekil 4.51. His, His- Cu^{2+} , $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{His}$ ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.52. AgGSHCu²⁺His yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.2.2. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini

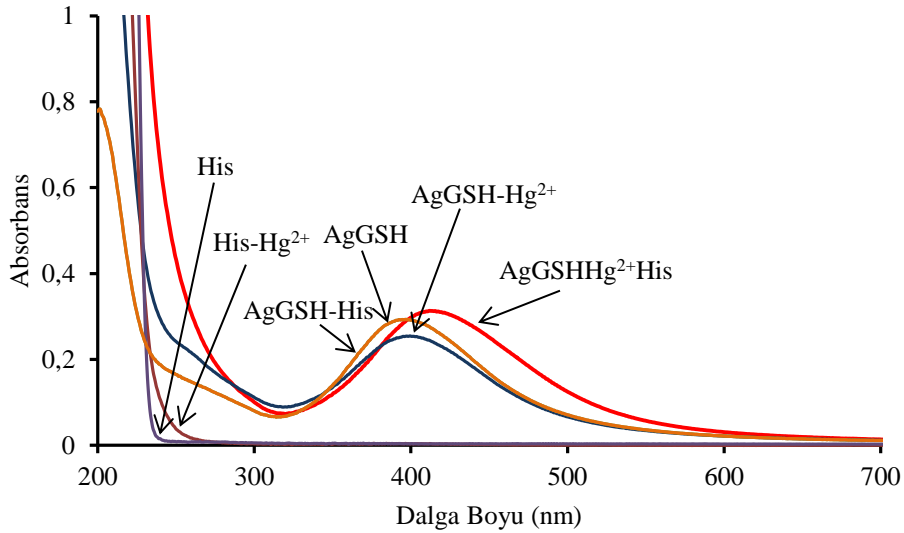
Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda amino asitlerin absorpsiyon spektrumları Şekil 4.53'te gösterilmektedir. Cys ve His spektrumları çakışmaktadır. His bulunan ortamda gözlenen pikin AgGSHCu²⁺His yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve His, His, His ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.53. Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

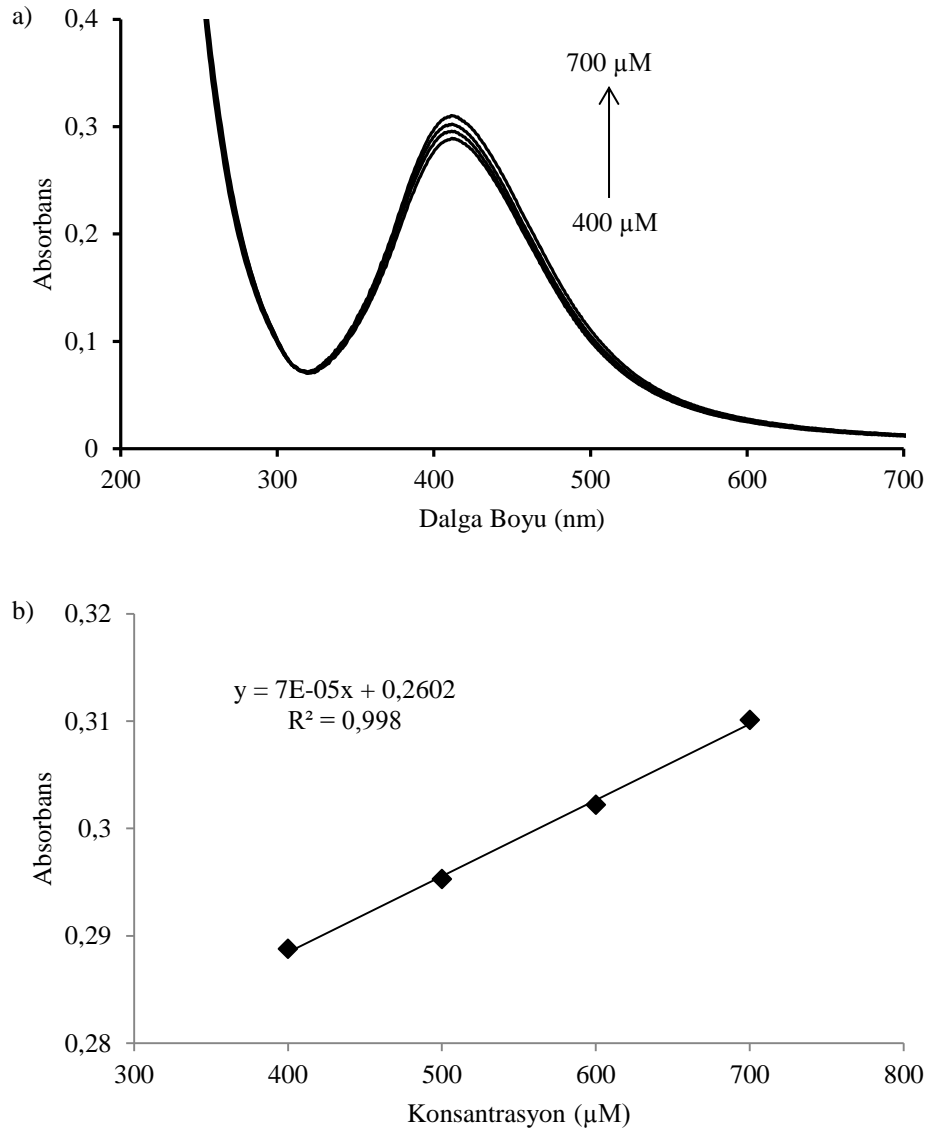
AgGSH ve Hg²⁺ iyon çözeltisi karışımının spektrumuna bakıldığında absorbansta düşüş görülmektedir. His ve Hg²⁺ iyonunun bulunduğu çözelti absorbanсында

herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. AgGSHHg²⁺His çözeltisinin absorbens piki kırmızıya kayarak 412 nm’de çıkmıştır. AgGSHHg²⁺His çözeltisinin ölçülen pH’ı 6,85’tir.

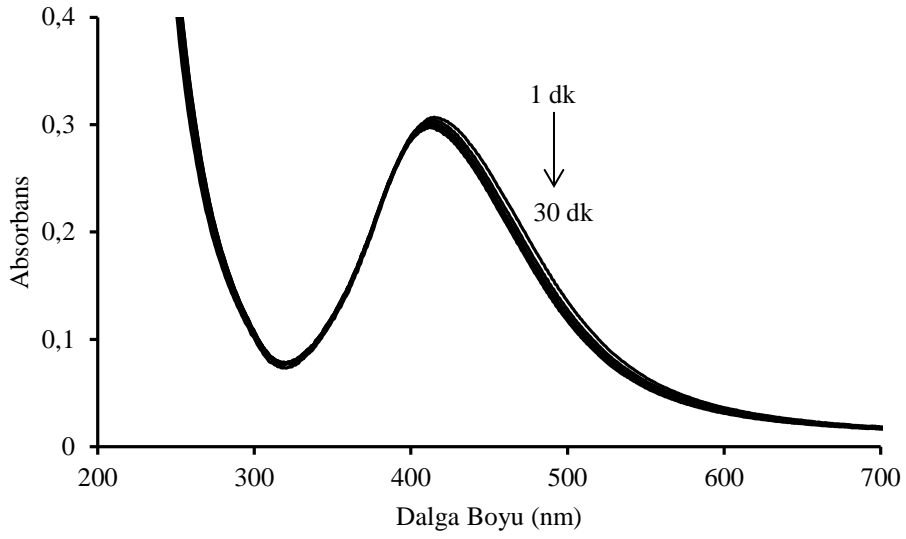


Şekil 4.54. AgGSHHg²⁺His, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve His, His, His ve Hg²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

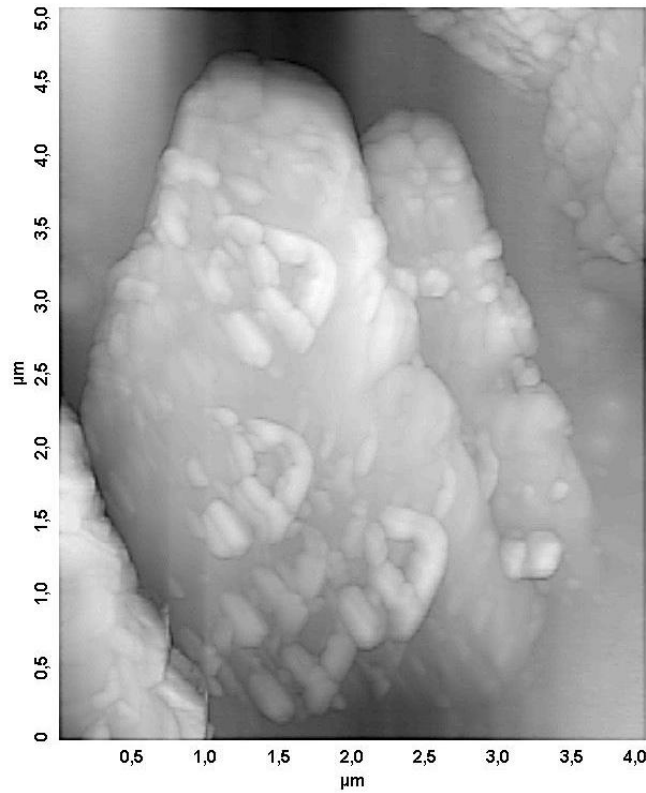
Şekil 4.55’deki kalibrasyon doğrusu, 412 nm’deki absorbens değişimlerinin 400 – 700 µM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.56’da gösterilmiştir. Zamanla absorbansta düşme gözlenmiştir. Ortamda bulunan ve etkileşime girmeyen Hg²⁺ iyonlarının önceden bahsedildiği gibi gümüş nanoparçacığı ile etkileşime girmesi absorbensı az da olsa düşürmüştür. AFM görüntüsü Şekil 4.57’de gösterilmiştir. Taneciklerin agrega olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.55. Hg^{2+} bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



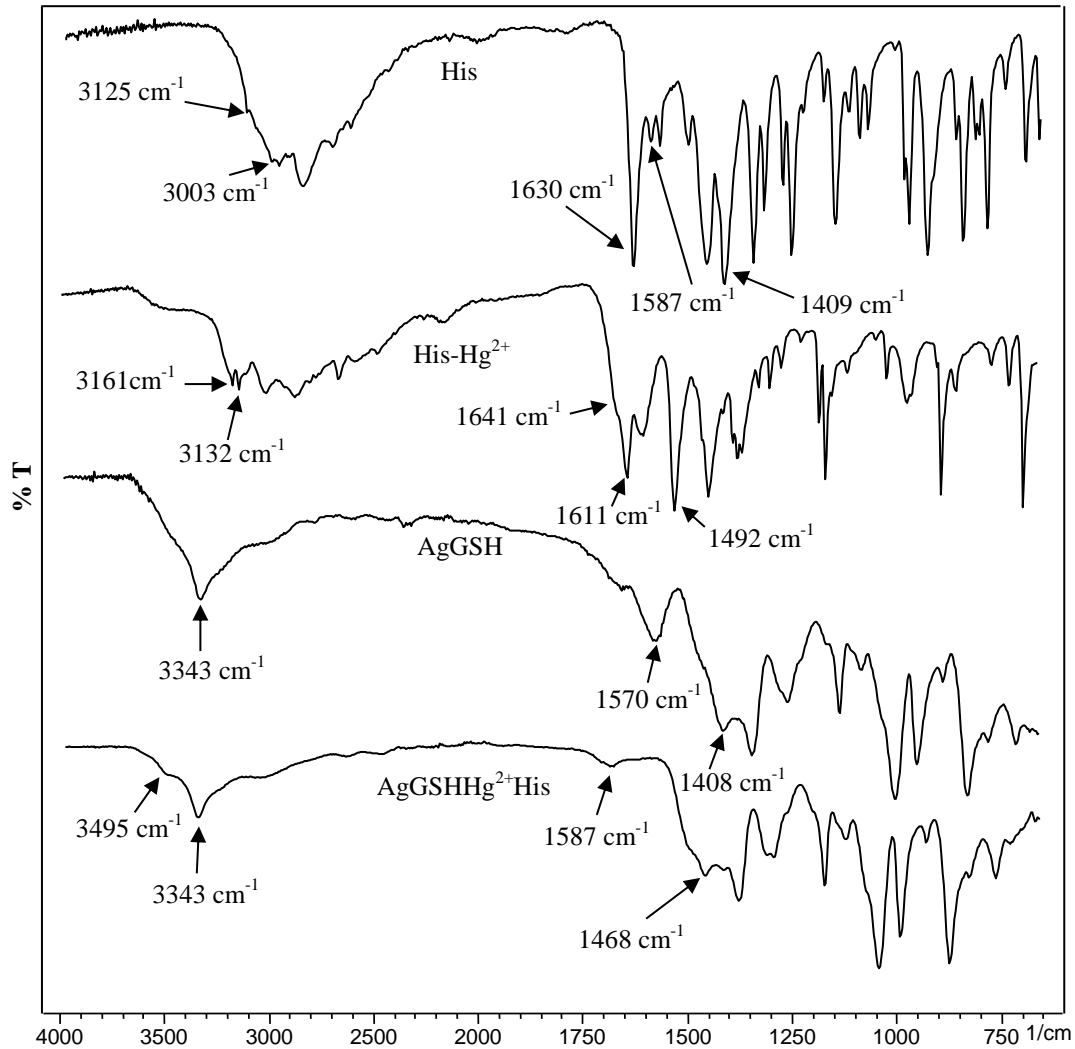
Şekil 4.56. Zamanla değişen AgGSHHg²⁺His absorbanları



Şekil 4.57. AgGSHHg²⁺His yapısının AFM görüntüsü (5x4 µm)

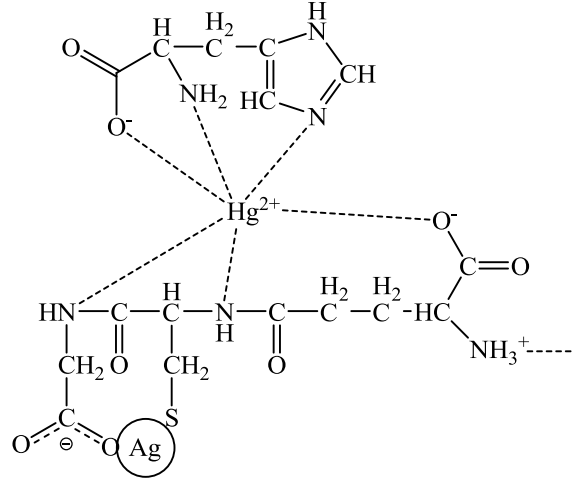
His, His-Hg²⁺, AgGSHHg²⁺His ve AgGSH'in FTIR spektrumları Şekil 4.58'de gösterilmektedir. His yapısında bulunan 3125 ve 3003 cm⁻¹'deki pirimer amin pikleri His-Hg²⁺'de 3161 ve 3132 cm⁻¹'e kayarak belirginleşmesi bu piklerin etkileşime

katıldığını göstermektedir. 1630 cm^{-1} 'deki $-\text{NH}$ grubunun piki 1641 cm^{-1} 'e kayarak 1611 cm^{-1} 'deki karboksilat grubunun piki ile örtülmüştür. His spektrumundaki 1587 ve 1409 cm^{-1} 'deki karboksilat piklerinin His- Hg^{2+} spektrumunda 1611 ve 1492 cm^{-1} 'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{His}$ spektrumunda ise $-\text{NH}_3^+$ grubunun pikinin yer değiştirmedığı 1570 ve 1408 cm^{-1} 'deki karboksilat piklerinin ise 1587 ve 1468 cm^{-1} 'e kaydığı görülmüştür. Bu sonuçlar $-\text{NH}_3^+$ grubunun etkileşime katılmadığını, $-\text{COO}^-$ grubunun ise katıldığını göstermektedir. 3495 cm^{-1} 'deki pik AgGSH yapısında bulunan amin gruplarının etkileşime katılıp kayması sonucu belirginleşmiştir.



Şekil 4.58. His, His- Hg^{2+} , $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{His}$ ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

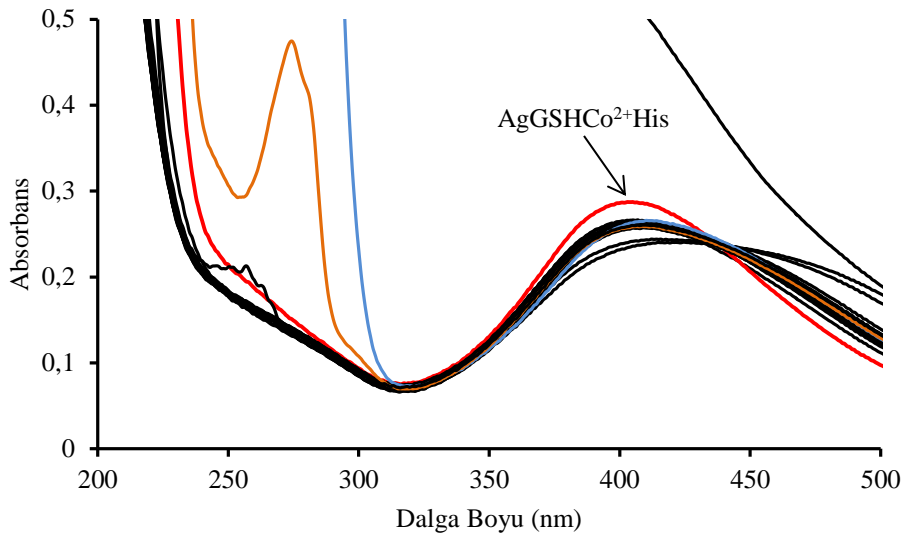
AgGSHHg²⁺His kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.59'da gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir. Hg²⁺ için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip Hg²⁺ kompleksleri de mevcuttur [457, 474].



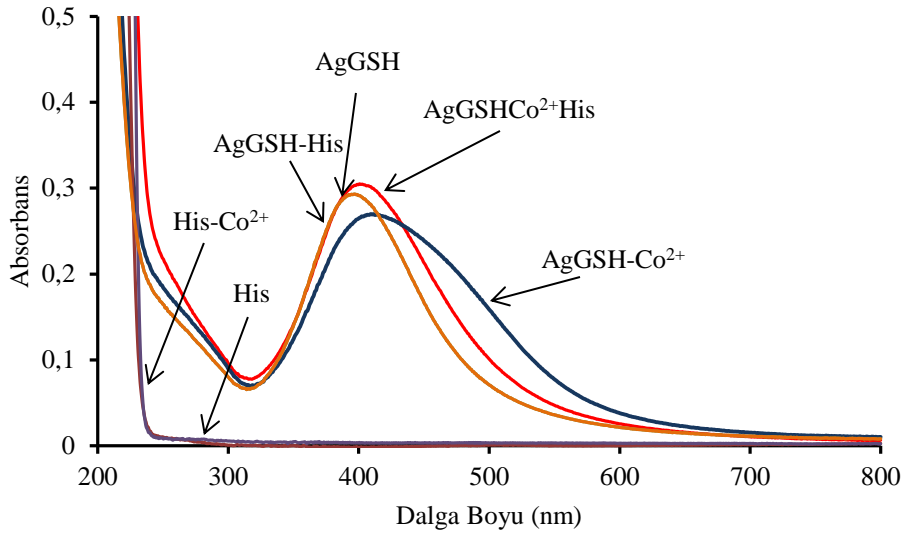
Şekil 4.59. AgGSHHg²⁺His yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.2.3. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda L-histidin tayini

Co²⁺ iyonu bulunan ortamda His çözeltisinin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.60'da gösterilmektedir. Absorpsiyon pikinin şiddetinde artma gözlenmiştir. Gözlenen pikin AgGSHCo²⁺His yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve His, His, His ve Co²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.61).



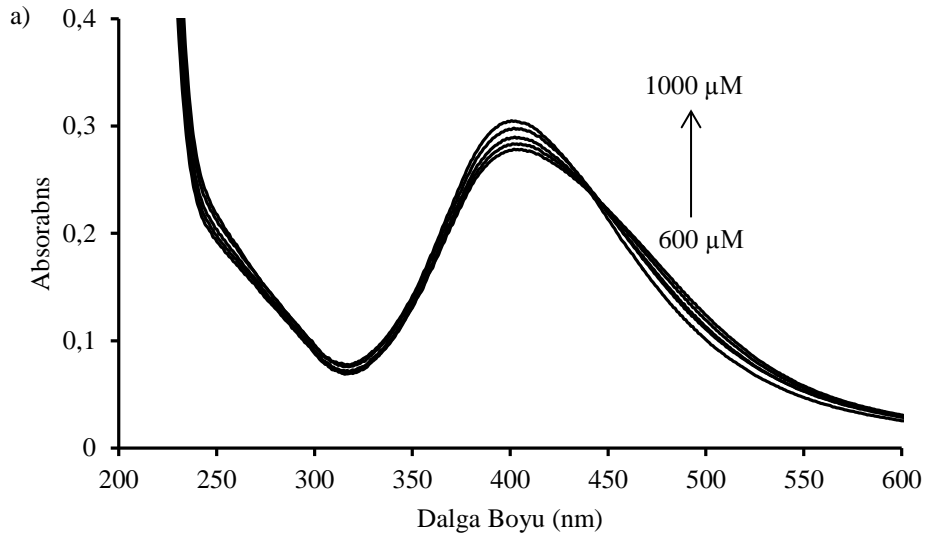
Şekil 4.60 Histidin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları



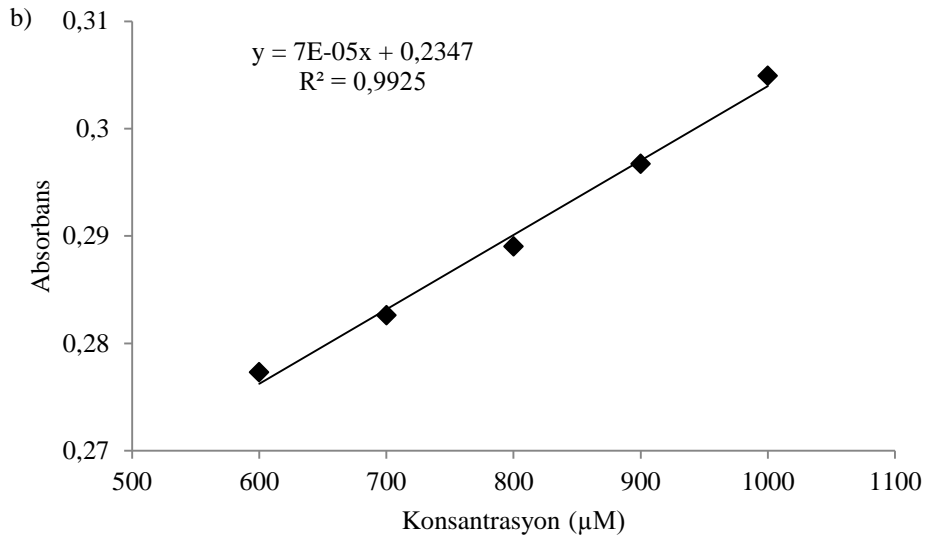
Şekil 4.61. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{His}$, AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve His , His , His ve Co^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

AgGSH ve Co^{2+} çözeltilerinin karışımlarının absorpsiyon spektrumu meydana gelen etkileşim ve agregasyon sonucu genişlemiştir. His ve Co^{2+} çözeltilerinin karışımında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{His}$ çözelti spektrumunda absorpsiyon artışı ve maksimumda kayma (400,5 nm) görülmüştür. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{His}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,10'dur.

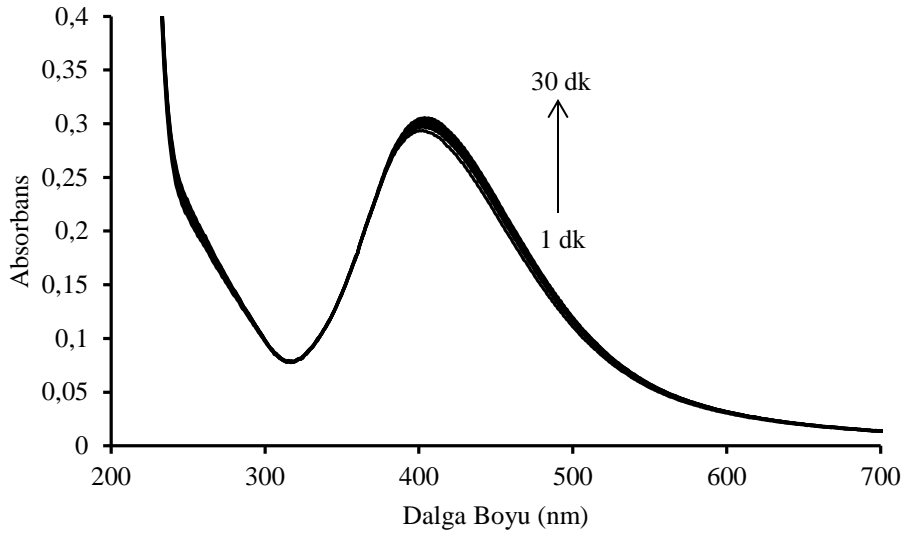
Şekil 4.62'deki kalibrasyon doğrusu, 400,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 600 – 1000 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekil 4.62'de gösterilen His konsantrasyonuna bağlı absorbans artışı grafiğinde, 600 μM konsantrasyondaki absorpsiyon spektrumunun 1000 μM 'a göre daha yayvan olduğu görülmektedir. Bunun nedeni ortamda bulunan fazla Co^{2+} iyonun AgGSH ile etkileşime girmesidir. His konsantrasyonu arttıkça fazla Co^{2+} iyonları $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{His}$ kompleksine katıldığından absorpsiyon piki daha dar gözükmetedir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.63'de gösterilmiştir. Zamanla absorbansta az da olsa artış gözlenmiştir. Şekil 4.64'de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir.



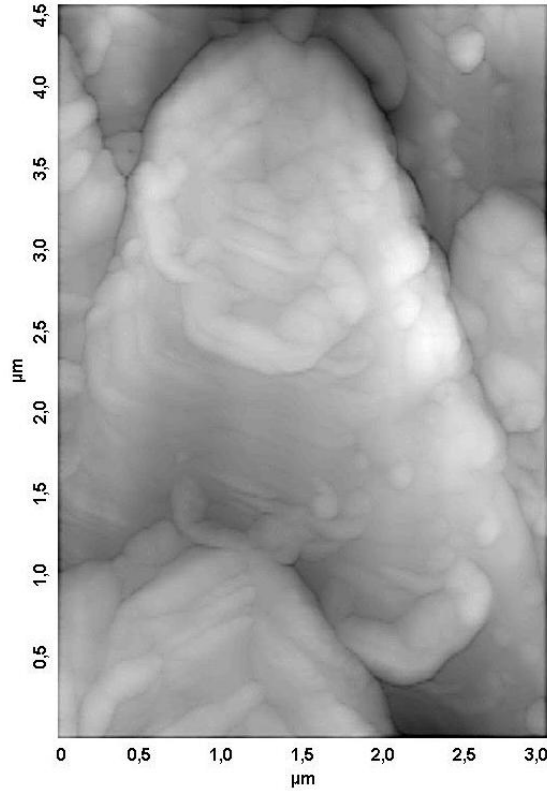
Şekil 4.62. Co^{2+} bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.62(Devam). Co^{2+} bulunan ortamda artan His konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



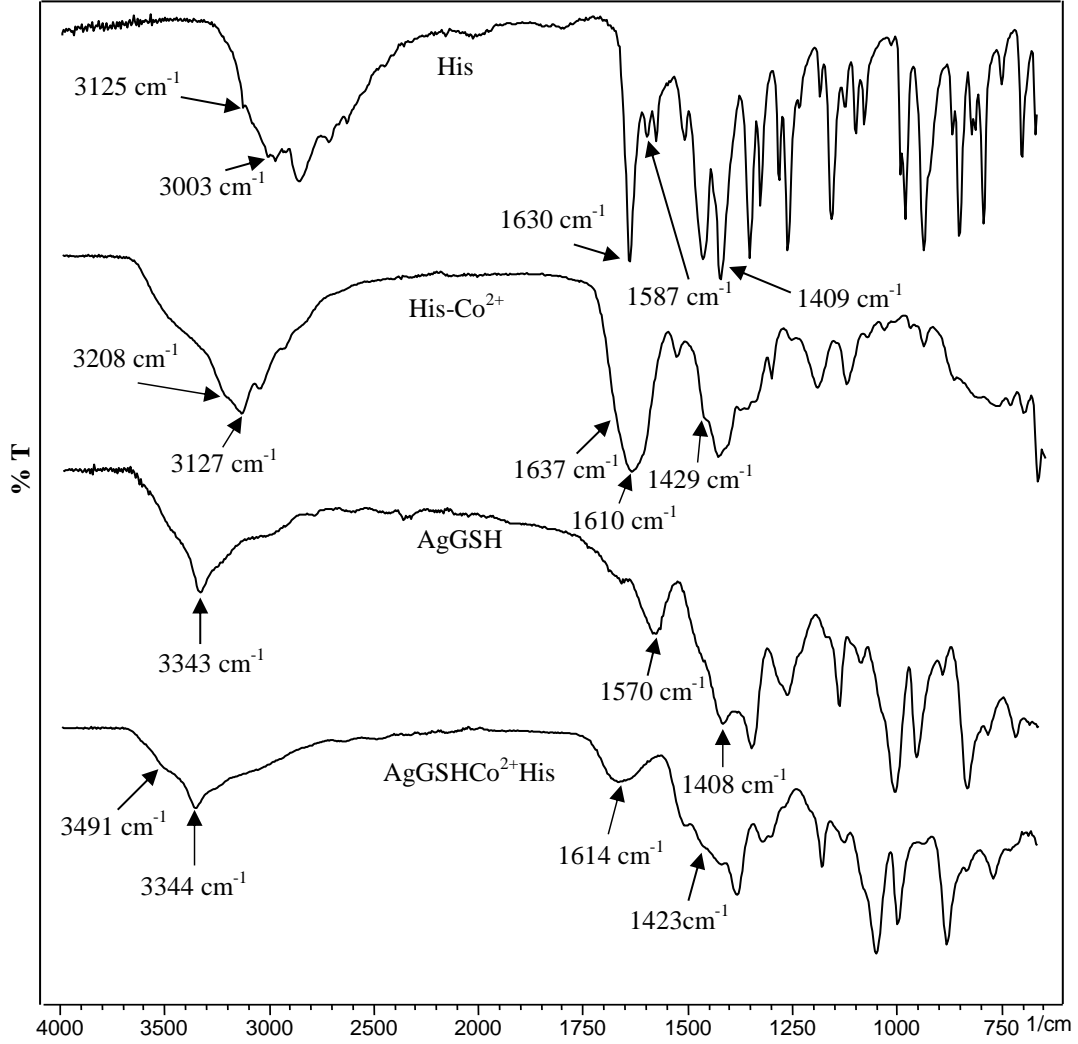
Şekil 4.63. Zamanla değişen $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{His}$ absorbansları



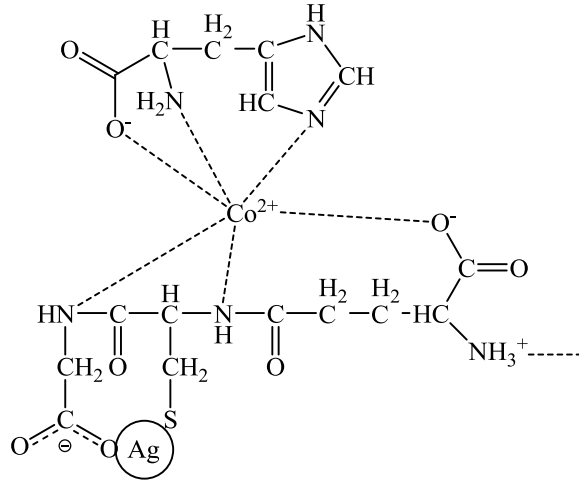
Şekil 4.64. AgGSHCo²⁺His yapısının AFM görüntüsü (4,5x3 µm)

AgGSHCo²⁺His kompleksinin yapı analizi için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.65’de gösterilmektedir. His yapısında bulunan 3125 ve 3003 cm⁻¹’deki pirmer amin piklerinin His-Co²⁺ çözelti spektrumunda 3208 ve 3127 cm⁻¹’e kayması –NH₂ grubunun etkileşime katıldığını göstermektedir. 1630 cm⁻¹’de görülen –NH grubunun titreşim pikinin 1637 cm⁻¹’e kayarak karboksilat grubunun asimetrik titreşim piki ile örtüşmesi –NH grubunun da etkileşime katıldığını göstermektedir. –COO⁻ grubunun 1587 ve 1409 cm⁻¹’deki asimetrik ve simetrik titreşim pikleri ise 1610 cm⁻¹ ve 1429 cm⁻¹’e kayması bu grubun da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH spektrumunda –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹’deki pikin AgSGHCo²⁺His spektrumunda 3344 cm⁻¹’de çıkması bu grubun etkileşime katılmadığını göstermektedir. 1570 ve 1408 cm⁻¹’deki karboksilatın asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerinin AgSGHCo²⁺His spektrumunda 1614 ve 1423 cm⁻¹’e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. 3491 cm⁻¹’de çıkan pik ise seconder amin gruplarının etkileşime girmesi sonucu kayarak belirginleşmiştir.

AgSGHCo²⁺His kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.66'da gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.65. His, His-Co²⁺, AgGSHCo²⁺His ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.66. AgGSHCo²⁺His yapısının muhtemel bağlanma şekli

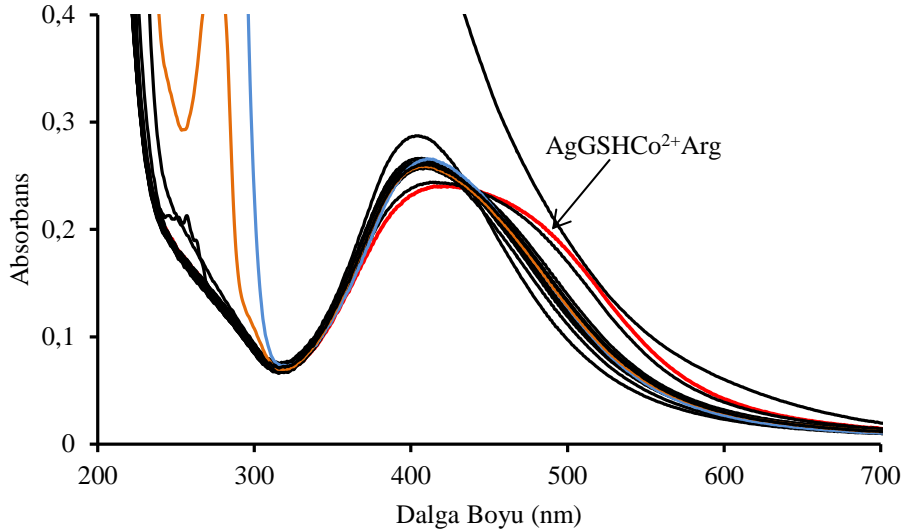
4.2.3. L-arginin tayini

L-arginin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Co²⁺ ve Hg²⁺ iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumlarının yorumlanmasında ve yapı tahmininde literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [479-484].

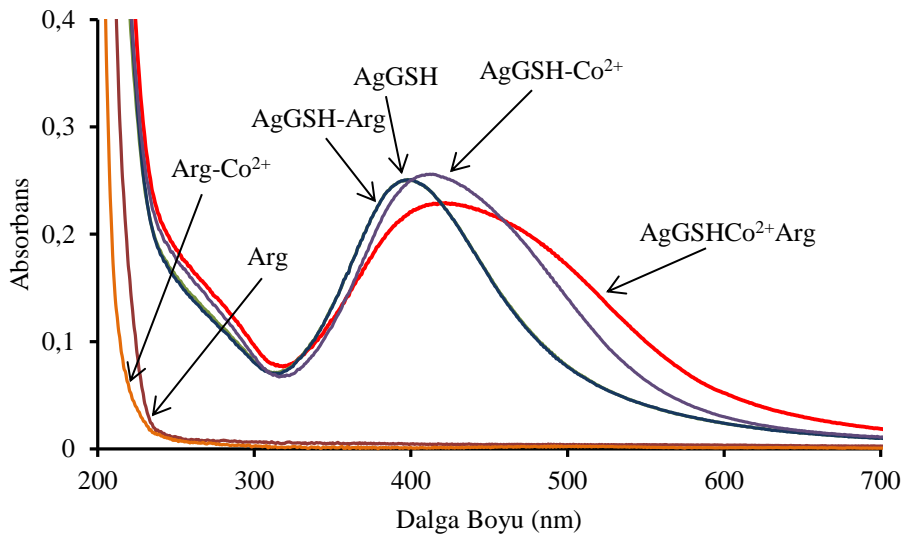
4.2.3.1. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda L-arginin tayini

Co²⁺ iyonu bulunan ortamda Arg amino asidinin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.67'de gösterilmektedir. Arg absorbans spektrumunun genişlediği görülmektedir ve lizin amino asidinin absorpsiyon spektrumu ile hemen hemen örtüşmektedir. Arg bulunan ortamda gözlenen pikin AgGSHCo²⁺Arg yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve Arg, Arg, Arg ve Co²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.68). AgGSH'in 395 nm'deki absorpsiyon spektrumunun Co²⁺ iyonu ile olan etkileşimi sonrası genişlediği görülmüştür. AgGSH ve Arg çözelti karışımının absorpsiyon spektrumu AgGSH'in spektrumu ile aynı olması AgGSH ile Arg arasında herhangi bir etkileşim olmadığını göstermektedir. Arg ve Arg-Co²⁺ çözelti spektrumlarında ise kayda değer bir pik görülmemiştir. AgGSHCo²⁺Arg absorpsiyon spektrumu ise AgGSH-Co²⁺ çözelti karışımına göre daha da genişlemiştir. Bu sonuç Arg ile

agregasyonun arttığını göstermektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Arg}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,80'dir.



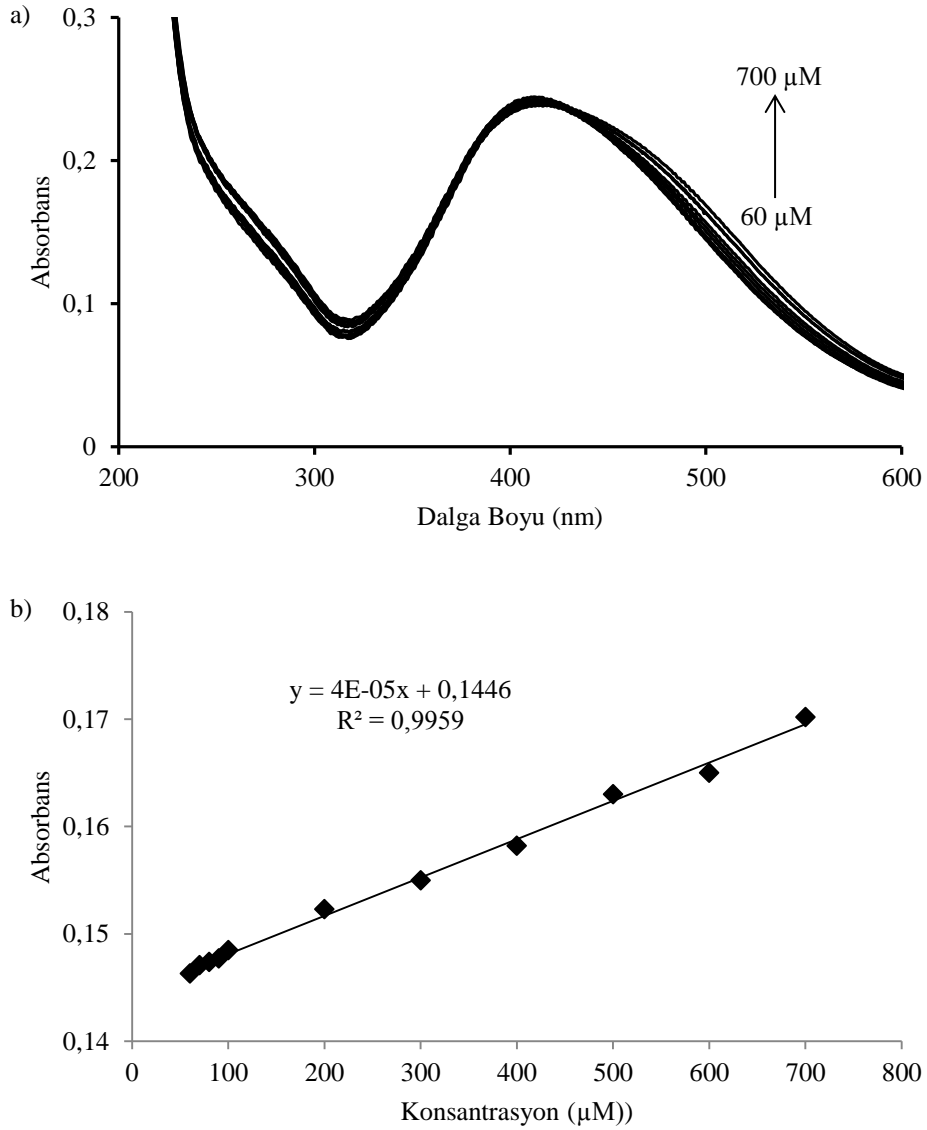
Şekil 4.67. Arginin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları



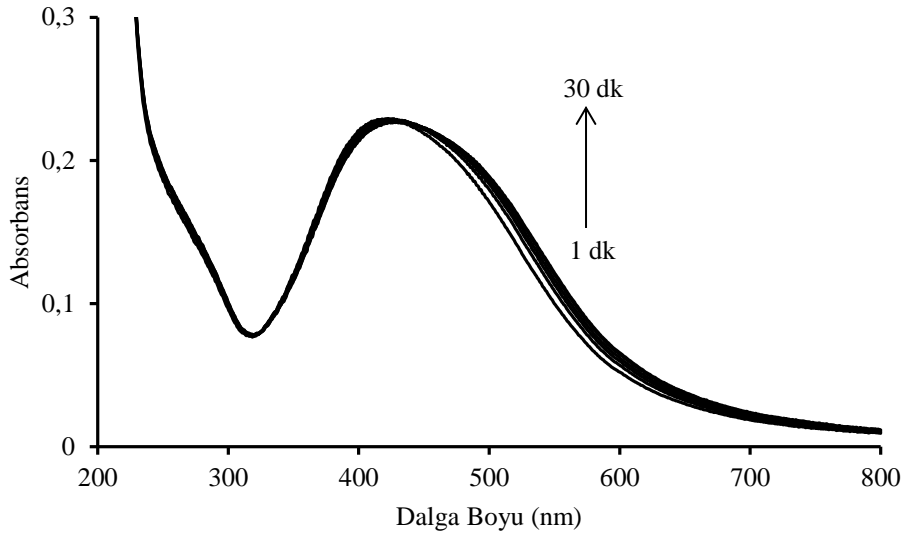
Şekil 4.68. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Arg}$, AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve Arg , Arg , Arg ve Co^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.69'daki kalibrasyon doğrusu, 499 nm'deki absorbans değişimlerinin 60 – 700 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Arg konsantrasyonu arttıkça agregasyon fazlaştığından

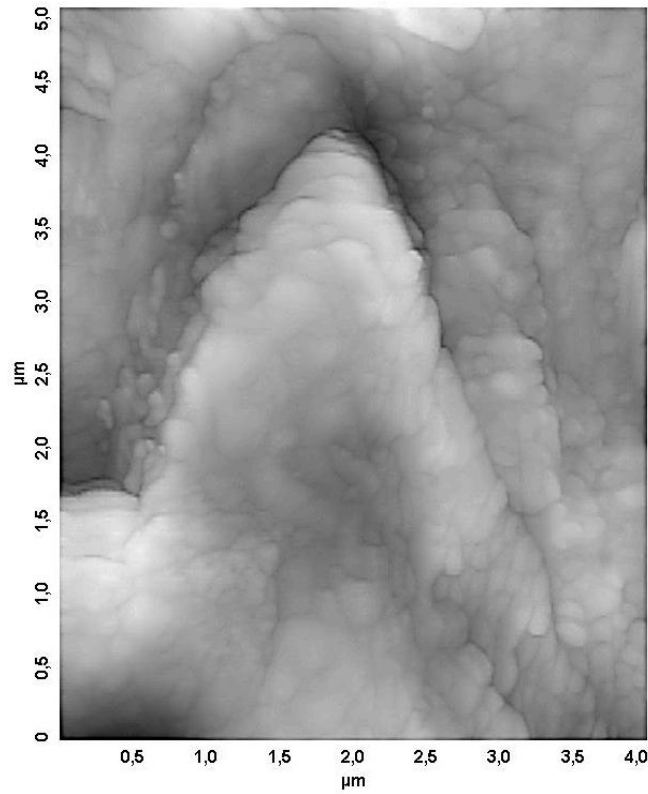
konsantrasyonun yükselmesiyle piklerdeki genişlik artmaktadır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbanza etkisi Şekil 4.70'de gösterilmiştir. Zamanla absorbansta görülen artış kompleksleşmenin yavaş gerçekleştiğini göstermektedir. AFM görüntüsü Şekil 4.71'de gösterilmiştir. AgGSHCo²⁺ Arg yapısının agregasyona uğradığı görülebilmektedir.



Şekil 4.69. Co²⁺ bulunan ortamda artan Arg konsantrasyonlarındaki absorbanz değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



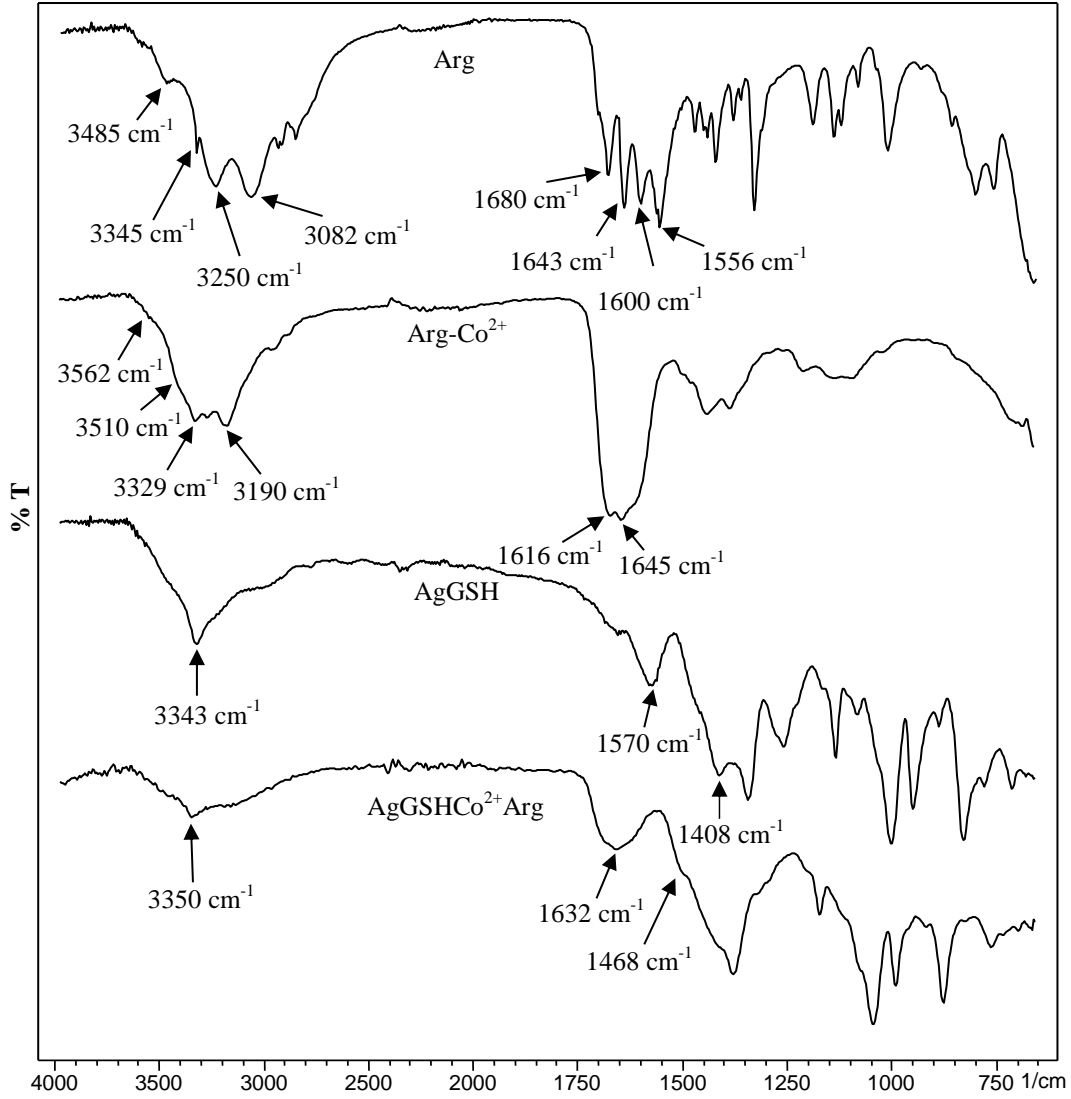
Şekil 4.70. Zamanla değişen AgGSHCo²⁺ Arg absorbanları



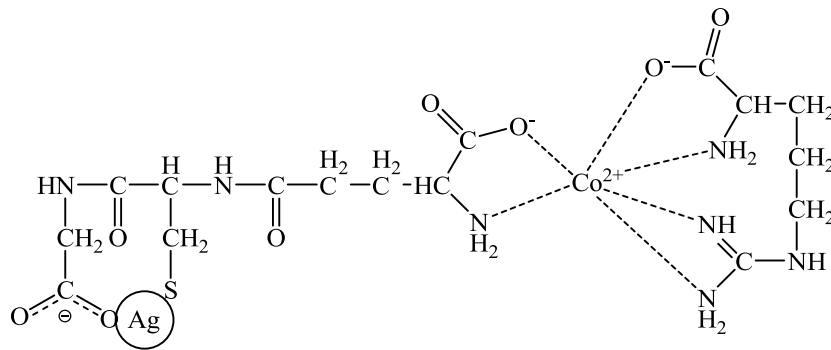
Şekil 4.71. AgGSHCo²⁺ Arg yapısının AFM görüntüsü (5x4 µm)

Arg, Arg-Co²⁺, AgGSHCo²⁺ Arg ve AgGSH'in FTIR spektrumları Şekil 4.72'de gösterilmiştir. Arg spektrumunda 3485 ve 3345 cm⁻¹'de bulunan pikler imin grubundan kaynaklanan -NH titreşim pikleridir. Bu piklerin Arg-Co²⁺ spektumunda

3562 ve 3410 cm^{-1} 'de çıkması ve şiddetlerinin azalması imin kısmında bulunan $-\text{NH}$ grubunun etkileşime girdiğini göstermektedir. 3250 ve 3082 cm^{-1} 'de görülen pikler ise primer amin grubunun pikleri olup Arg-Co^{2+} spektrumunda 3329 ve 3190 cm^{-1} 'e kayması bu grubun da etkileşime katıldığını göstermektedir. 1680 cm^{-1} 'de görülen pik imin grubundan kaynaklanan $-\text{NH}$ eğilme titreşim pikidir ve Arg-Co^{2+} spektrumunda görülmemiştir. 1643 cm^{-1} 'deki $-\text{NH}$ piki ise Arg-Co^{2+} spektrumunda karboksilat pikleri içine gömülerek görünmez hale gelmiştir. Arg-Co^{2+} spektrumunda görülen 1616 ve 1645 cm^{-1} 'deki pikler ise Arg yapısında bulunan 1600 ve 1556 cm^{-1} 'deki karboksilat grubunun asimetric ve simetric gerilme titreşim piklerinin kayması sonucu oluşmuştur. Bu durum karboksilat gruplarının da etkileşime katıldığı göstermektedir. AgGSH spektrumunda görülen 3343 cm^{-1} 'deki $-\text{NH}_3^+$ grubundan kaynaklanan pikin $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Arg}$ spektrumunda 3350 cm^{-1} 'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH 'in 1570 ve 1408 cm^{-1} 'deki karboksilat pikleri ise 1632 ve 1468 cm^{-1} 'e kayması etkileşime girdiklerini göstermektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Arg}$ kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.73'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



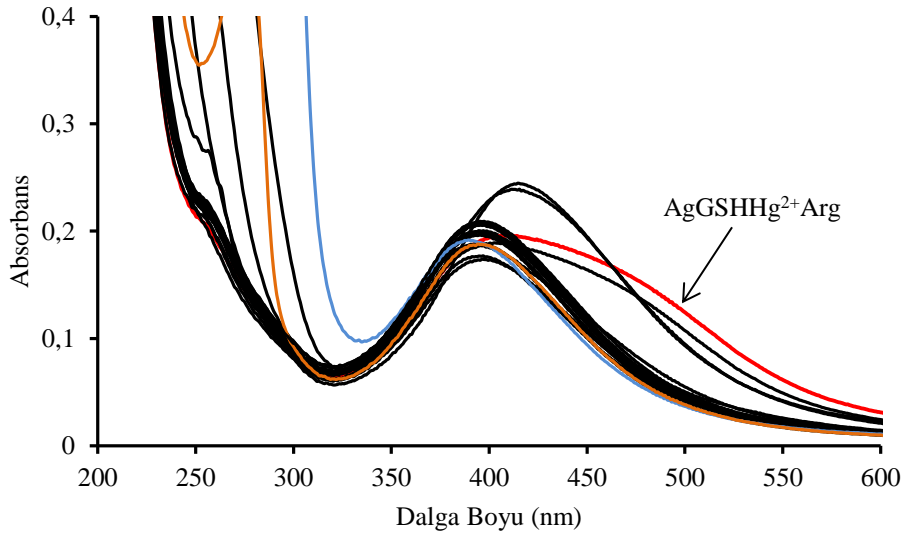
Şekil 4.72. Arg, Arg- Co^{2+} , AgGSH Co^{2+} Arg ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.73. AgGSH Co^{2+} Arg yapısının muhtemel bağlanma şekli

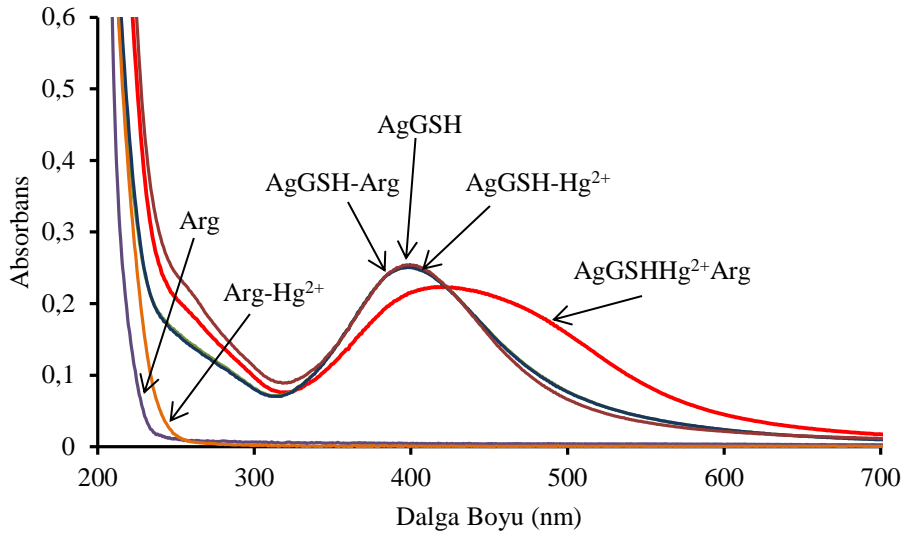
4.2.3.2. Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda L-arginin tayini

Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda Arg amino asidinin verdiği absorpsiyon piki Şekil 4.74'de gösterilmiştir. Absorpsiyon pikinin genişlediği görülmüştür. Absorpsiyon şiddeti, benzer bir absorpsiyon davranışı gösteren lizin amino asidinden fazla çıkmıştır.



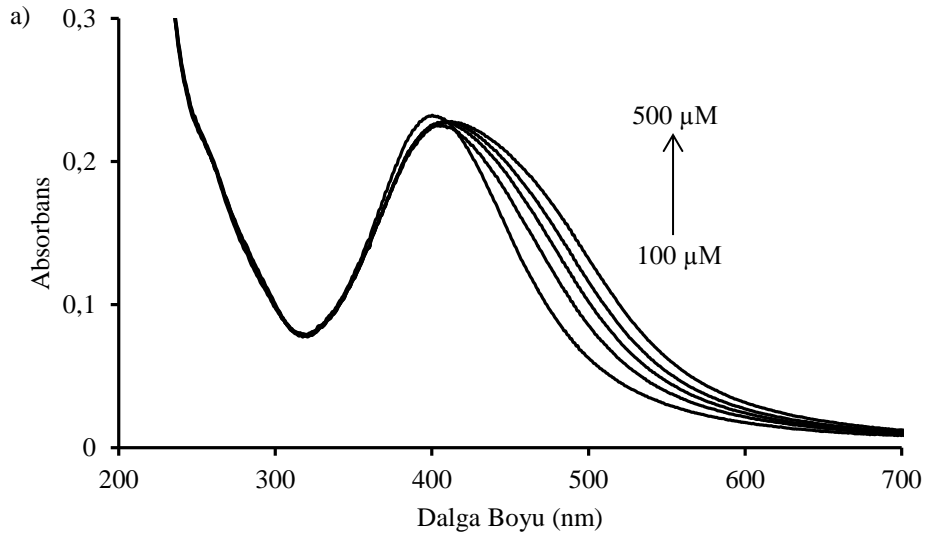
Şekil 4.74. Arginin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

Gözlenen pikin $AgGSHHg^{2+}Arg$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için $AgGSH$, $AgGSH$ ve Hg^{2+} , $AgGSH$ ve Arg , Arg , Arg ve Hg^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.75). $AgGSH$ ve Hg^{2+} iyon çözeltisi karışımının absorpsiyon şiddetinde azalma meydana gelmiştir. Arg ve Hg^{2+} iyonu çözeltilerinin karışımından alınan absorpsiyon spektrumundan yapı hakkında bilgi elde edilememiştir. $AgGSHHg^{2+}Arg$ çözeltisinin absorpsiyon pikinin genişleyerek kırmızıya kaydığı görülmektedir. $AgGSHHg^{2+}Arg$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,40'tır.

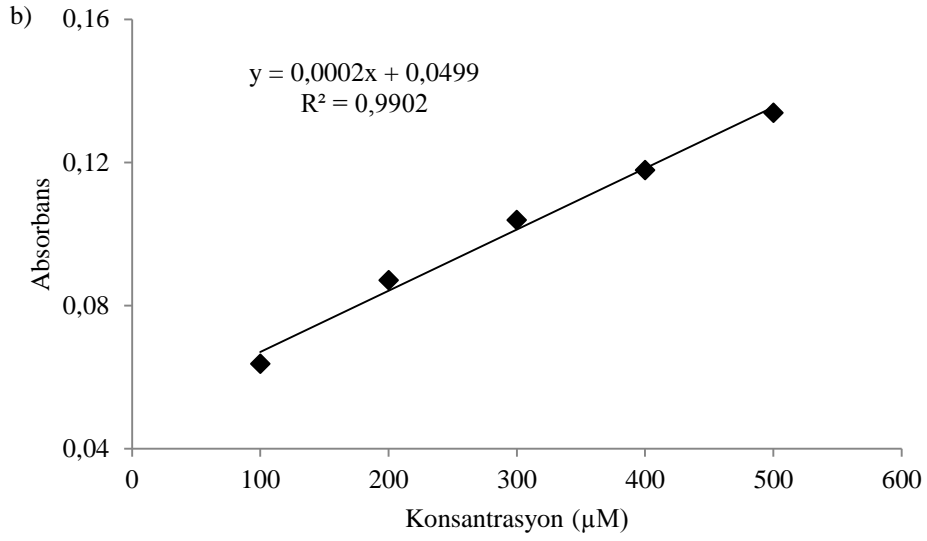


Şekil 4.75. AgGSHHg^{2+} Arg, AgGSH, AgGSH ve Hg^{2+} , AgGSH ve Arg, Arg, Arg ve Hg^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.76'daki kalibrasyon doğrusu, 499 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 500 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir.

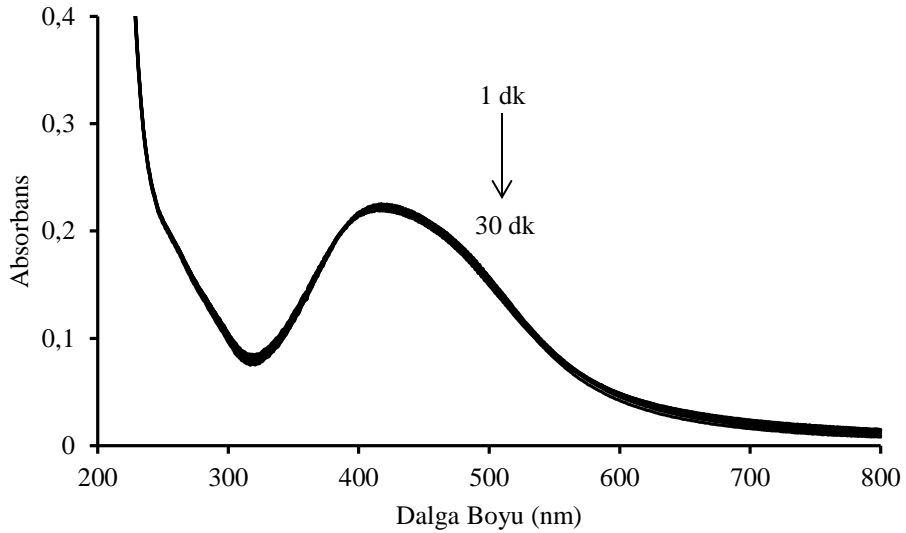


Şekil 4.76. Hg^{2+} bulunan ortamda artan Arg konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)

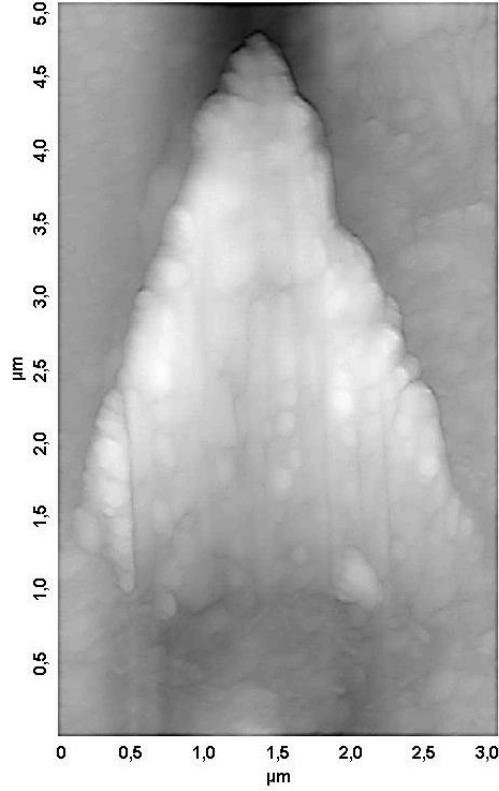


Şekil 4.76(Devam). Hg^{2+} bulunan ortamda artan Arg konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)

Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.77’de gösterilmiştir. Zamanla daha önce belirtilen nedenlerle absorbans şiddetinde azalma gerçekleşmiştir. Şekil 4.78’de gösterilen AgGSHHg^{2+} Arg kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülebilmektedir.

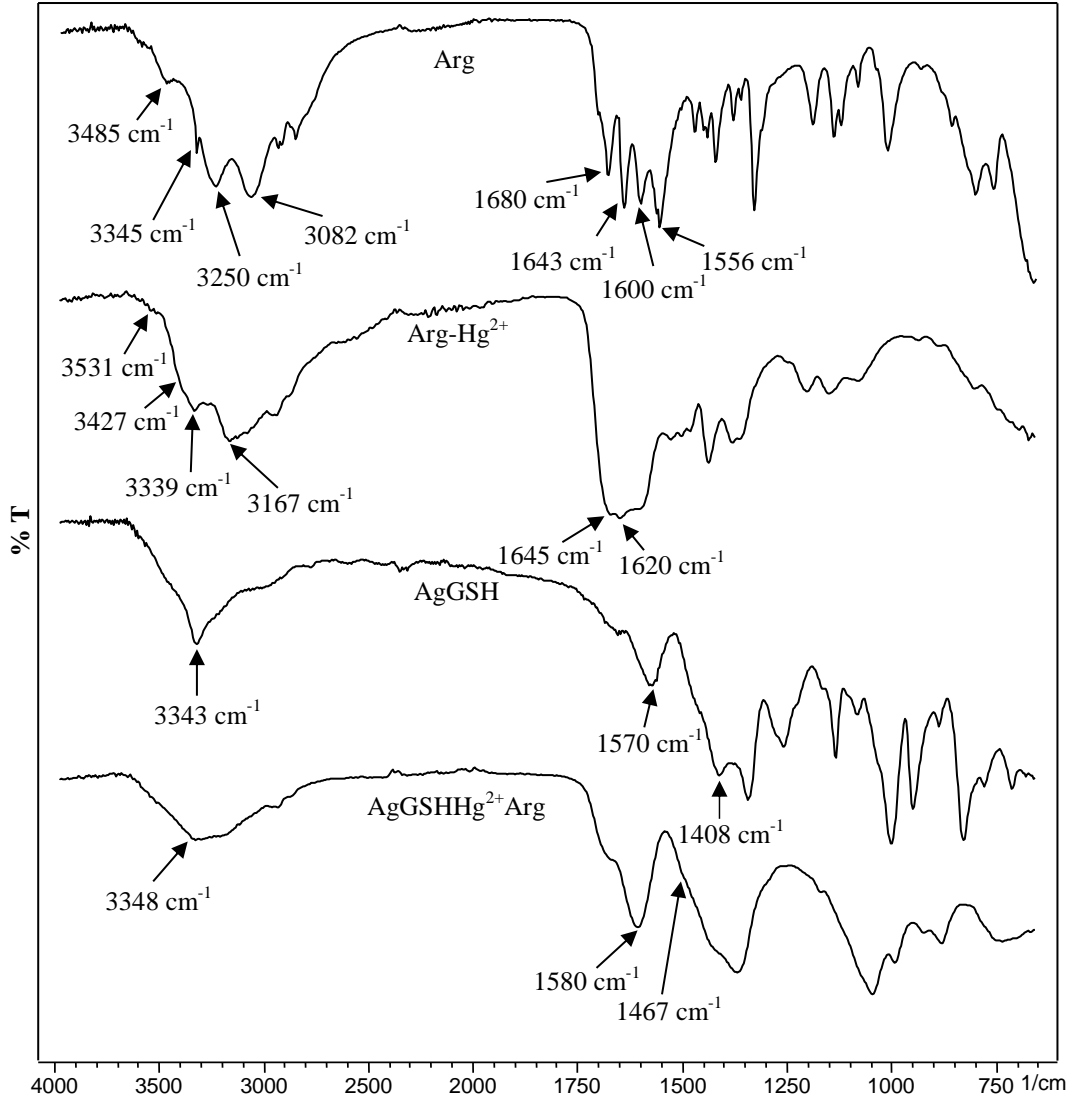


Şekil 4.77. Zamanla değişen AgGSHHg^{2+} Arg absorbansları

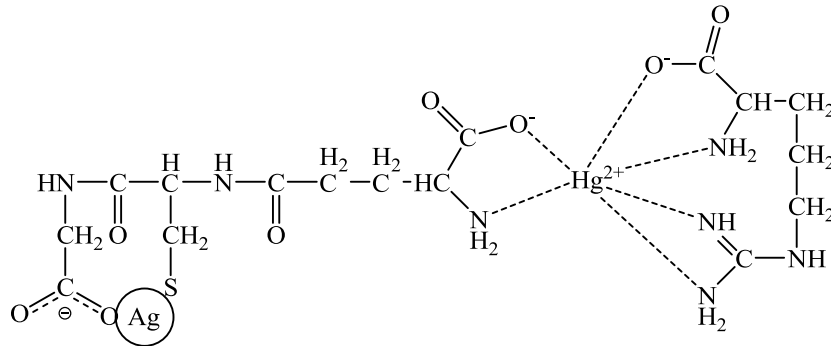


Şekil 4.78. AgGSHHg²⁺Arg yapısının AFM görüntüsü (3x5 µm)

AgGSHHg²⁺Arg kompleksinin yapı analizi için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.79'da gösterilmektedir. Arg yapısında bulunan iminden kaynaklanan 3485 ve 3345 cm⁻¹'deki -NH piklerinin Arg-Hg²⁺'da 3531 ve 3427 cm⁻¹'e kayması bu grubun etkileşime girdiğini göstermektedir. 3082 ve 3250 cm⁻¹'deki -NH piklerinin ise 3339 ve 3167 cm⁻¹'e kayması bu grubun da etkileşime katıldığını işaret etmektedir. 1680 cm⁻¹'deki iminden kaynaklanan -NH piki Arg-Co²⁺'da gözlenmemiştir. 1643 cm⁻¹'deki -NH piki ise kayan karboksilat pikleri ile örtüşmüştür. 1600 ve 1556 cm⁻¹'deki karboksilat pikleri 1645 ve 1620 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu kayma etkileşim olduğunu göstermektedir. AgGSH'de bulunan 3343 cm⁻¹'deki -NH₃⁺ piki AgGSHHg²⁺Arg spektrumunda 3348 cm⁻¹'e kaymıştır. 1570 ve 1408 cm⁻¹'deki karboksilat pikleri ise 1580 ve 1467 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu durum iki grubunda etkileşime girdiğini göstermektedir. AgGSHHg²⁺Arg kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.80'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir. Hg²⁺ için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip Hg²⁺ kompleksleri de mevcuttur [457, 474].



Şekil 4.79. Arg, Arg-Hg²⁺, AgGSHHg²⁺Arg ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



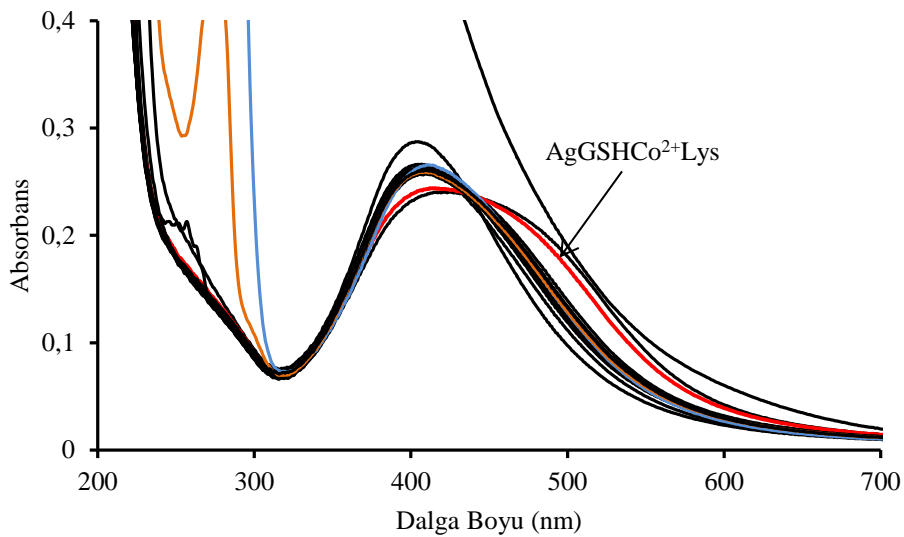
Şekil 4.80. AgGSHHg²⁺Arg yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.4. L-lisin tayini

L-lisin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Co^{2+} ve Hg^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumlarının yorumlanmasında ve yapı tahmininde literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [485-487].

4.2.4.1. Co^{2+} iyonu bulunan ortamda L-lisin tayini

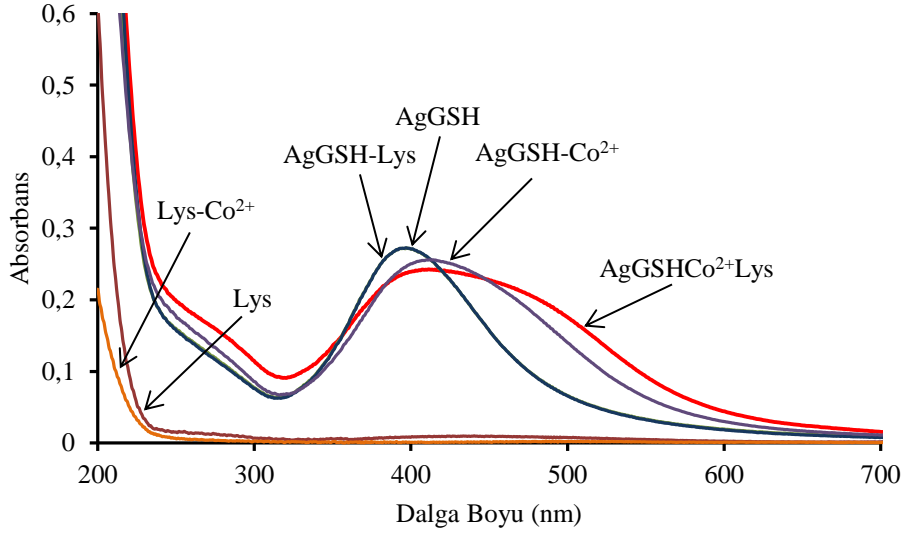
Co^{2+} iyonu bulunan ortamda Lys amino asidinin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.81'de gösterilmiştir. Genişleyen absorpsiyon pikinin Arg amino asidi bulunan çözelti absorbansı ile örtüştüğü görülmektedir.



Şekil 4.81. Lisin ve diğer amino asit çözeltilerinin Co^{2+} iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

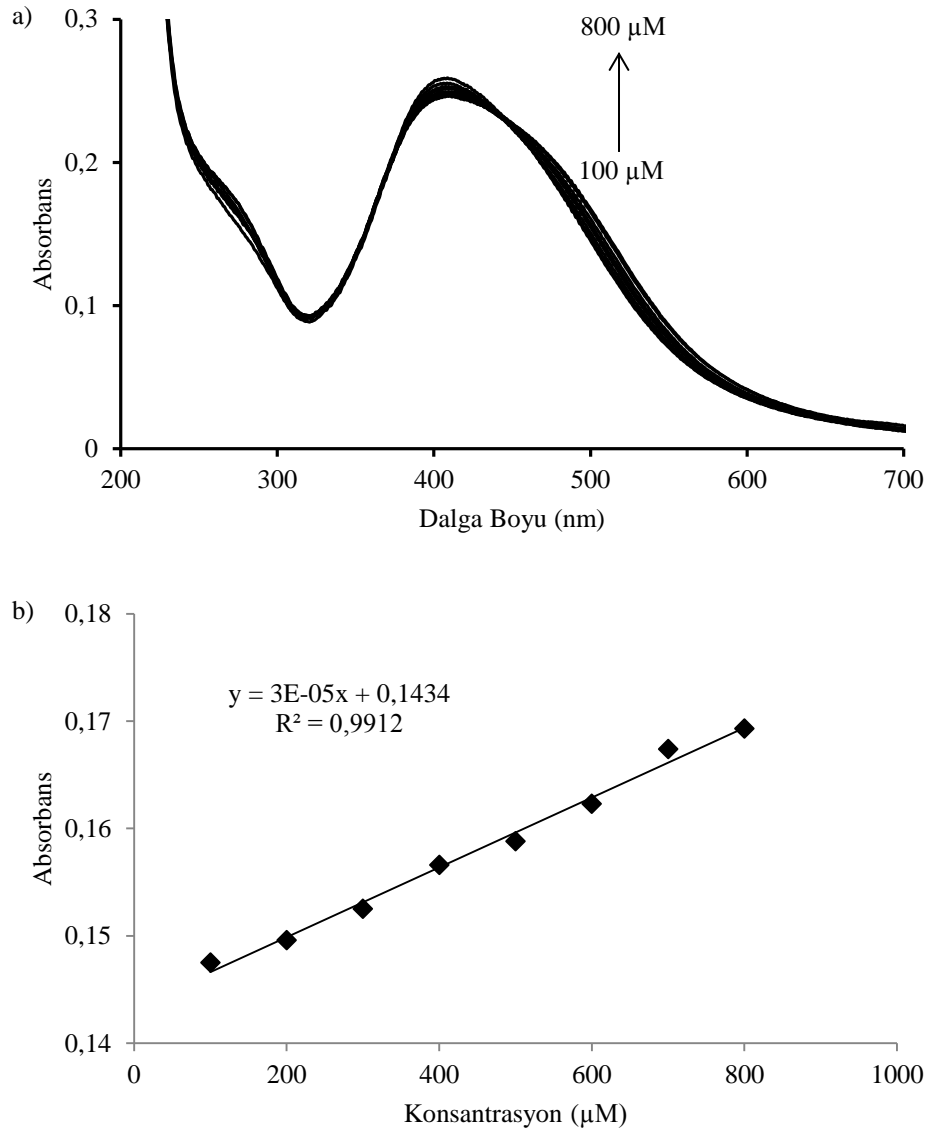
Gözlenen pikin $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Lys}$ yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve Lys , Lys , Lys ve Co^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.82). AgGSH ve Co^{2+} iyonu çözelti karışımının spektrumunda absorpsiyon pikinin genişlediği ve kırmızıya kaydığı görülmüştür. AgGSH ve Lys arasında bir etkileşim olmadığı karışım çözeltisinin absorpsiyon spektrumlarının örtüşmesinden anlaşılabilmektedir. Diğer spektrumlarda kayda değer bir pik görülmemiştir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Lys}$ absorpsiyon pikinin AgGSH-Co^{2+} karışımına göre daha fazla yayvanlaşması daha

fazla agregasyon olduğunu göstermektedir. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Lys}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,85'tir.

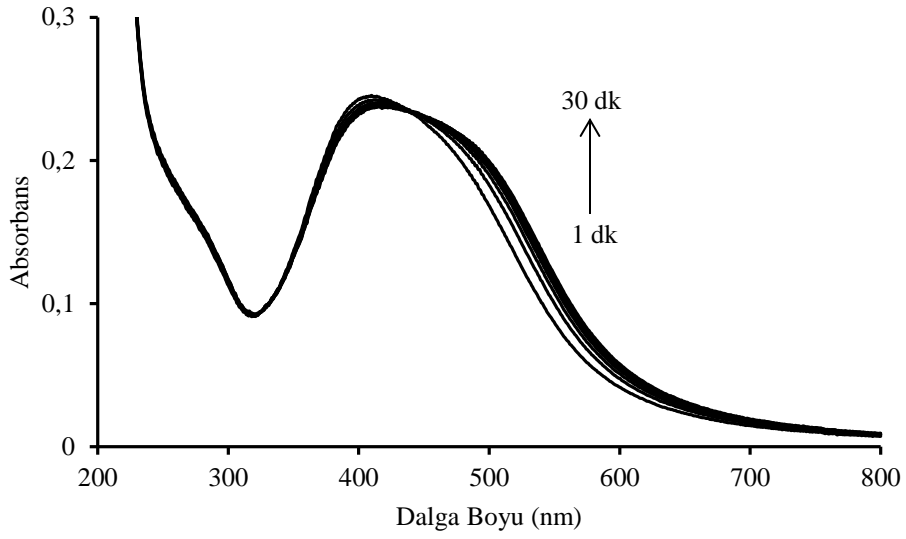


Şekil 4.82. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Lys}$, AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve Lys , Lys , Lys ve Co^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

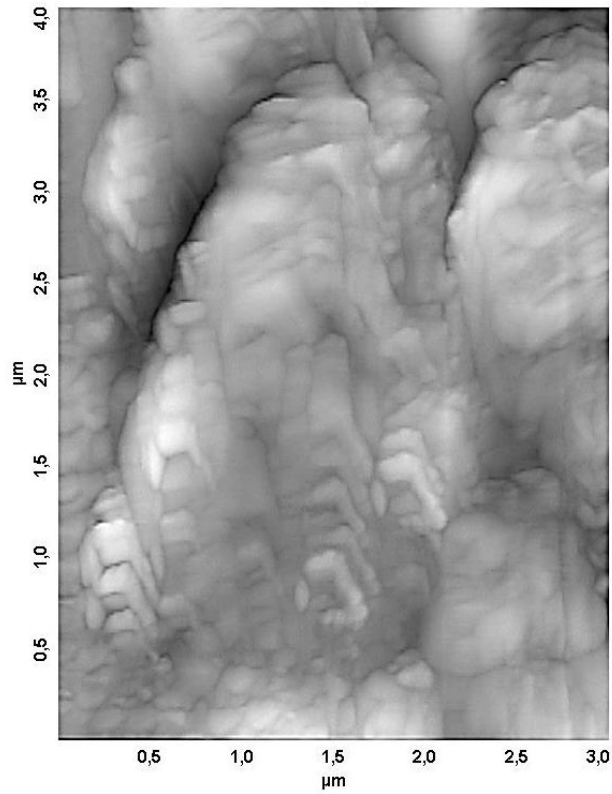
Şekil 4.83'deki kalibrasyon doğrusu, 499 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 800 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekilden de görülebileceği gibi Lys konsantrasyonu arttıkça agregasyon arttığından yüksek konsantrasyonlarda pik genişlemesi daha fazla gerçekleşmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.84'de gösterilmiştir. Zamanla kompleksleşme miktarı ve dolayısıyla agregasyon artmış absorpsiyon piki genişlemesi görülmüştür. Ayrıca kompleksleşmenin yavaş gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{Lys}$ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.85'de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir.



Şekil 4.83. Co^{2+} bulunan ortamda artan Lys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



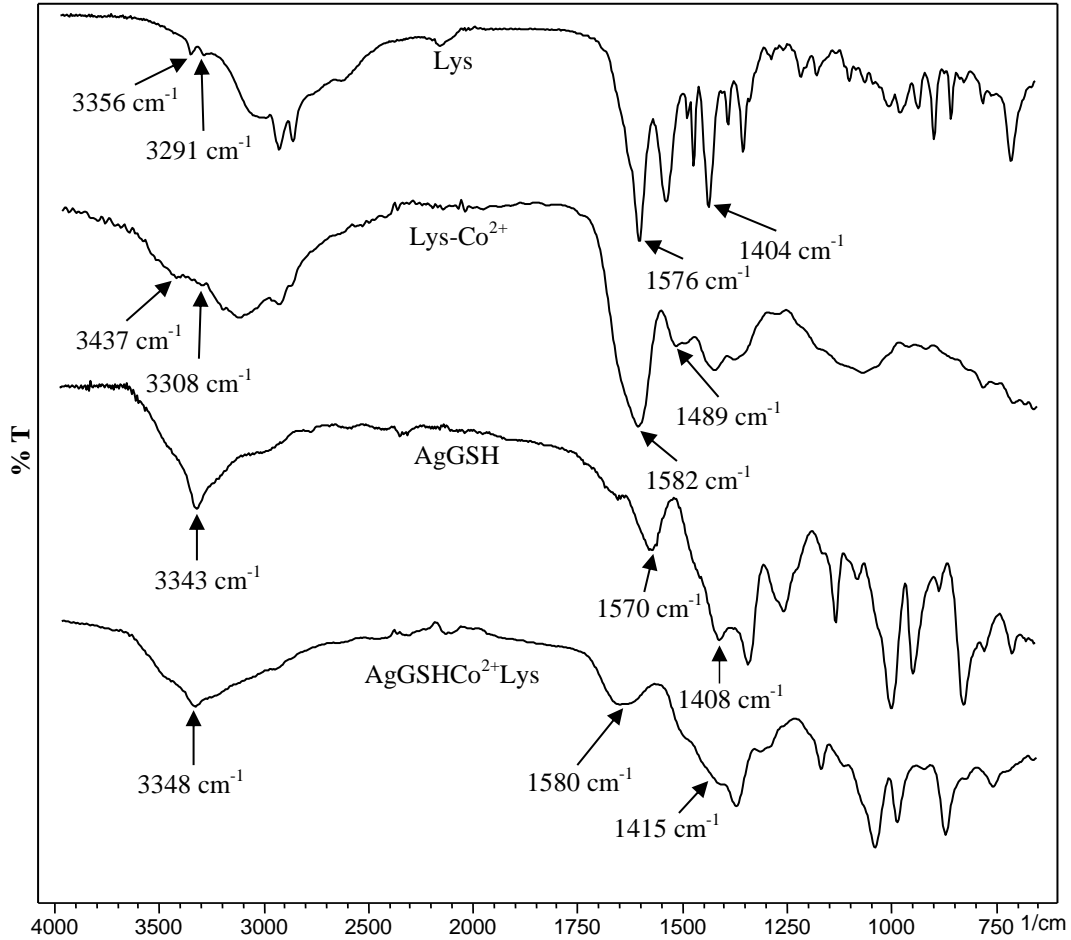
Şekil 4.84. Zamanla değişen AgGSHCo²⁺Lys absorbansları



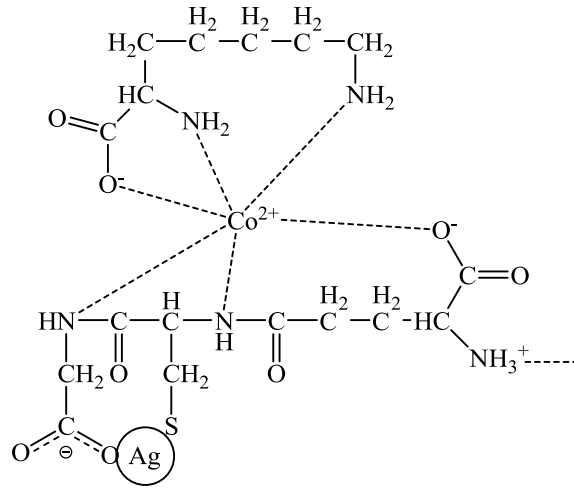
Şekil 4.85. AgGSHCo²⁺Lys yapısının AFM görüntüsü (4x3 µm)

Lys, Lys-Co²⁺, AgGSHCo²⁺Lys ve AgGSH'in FTIR spektrumları Şekil 4.86'da görülmektedir. Lys yapısında -NH grubundan kaynaklanan titreşim pikleri 3356 ve 3291 cm⁻¹'de görülmektedir. Bu piklerin Lys-Co²⁺ spektrumunda 3437 ve 3308 cm⁻¹

¹'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. –NH eğilmesinden kaynaklanan 1604 cm⁻¹'deki pik ise karboksilat gerilme piki içerisine gömülmüştür ve Lys-Co²⁺ spektrumunda da görülmemektedir. 1576 ve 1404 cm⁻¹'deki karboksilat pikleri Lys-Co²⁺ spektrumunda 1582 ve 1489 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu kayma bu grubun da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH spektrumunda –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹'deki pikin 3348 cm⁻¹ de çıkması bu grubun etkileşime katılmadığını göstermektedir. 1570 ve 1408 cm⁻¹'deki karboksilat piklerinin ise AgGSHCo²⁺Lys spektrumunda 1580 cm⁻¹ ve 1415 cm⁻¹'e kayması karboksilat gruplarının da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSHCo²⁺Lys kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.87'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir.



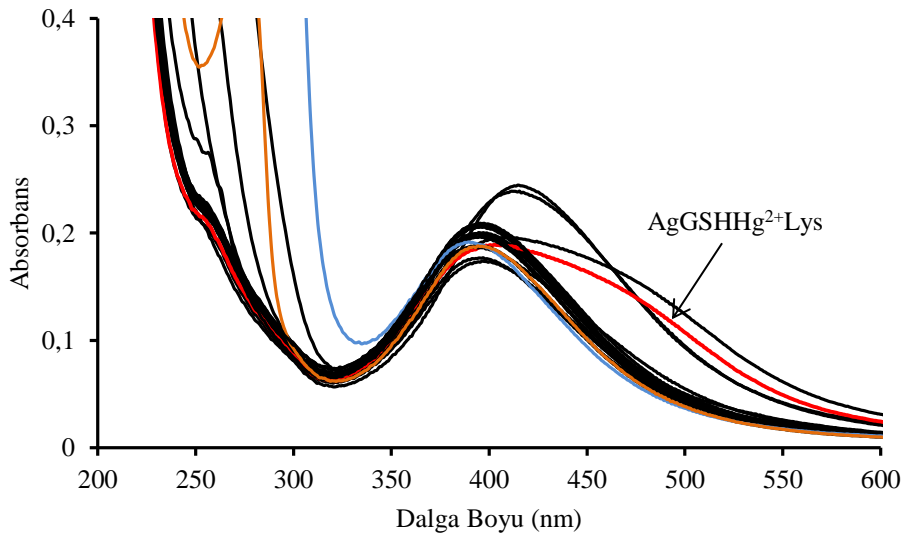
Şekil 4.86. Lys, Lys-Co²⁺, AgGSHCo²⁺Lys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.87. AgGSHCo²⁺Lys yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.4.2. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda L-lisin tayini

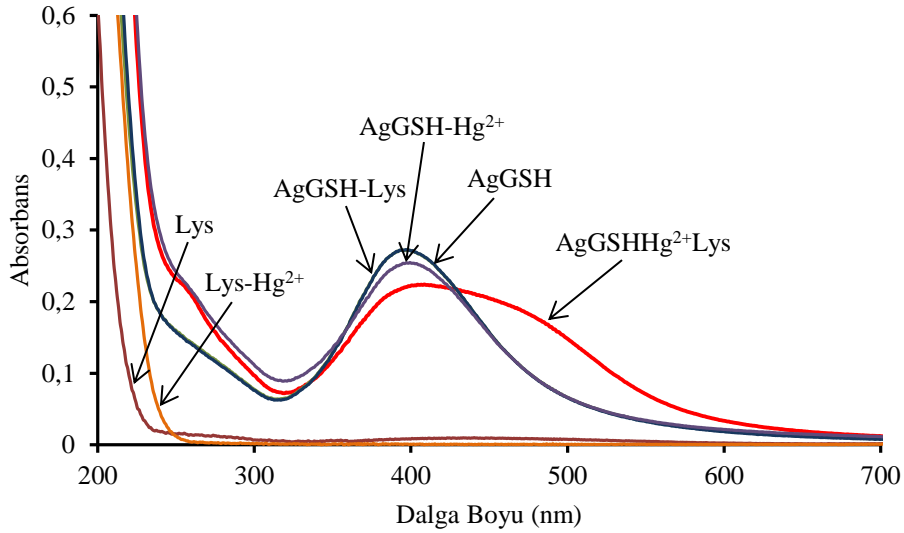
Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda lisin amino asidinin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.88'de gösterilmektedir. Genişleyen absorpsiyon pikinin Arg absorpsiyon şiddetinden daha az şiddete sahip olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.88. Lisin ve diğır amino asit çözeltilerinin Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları

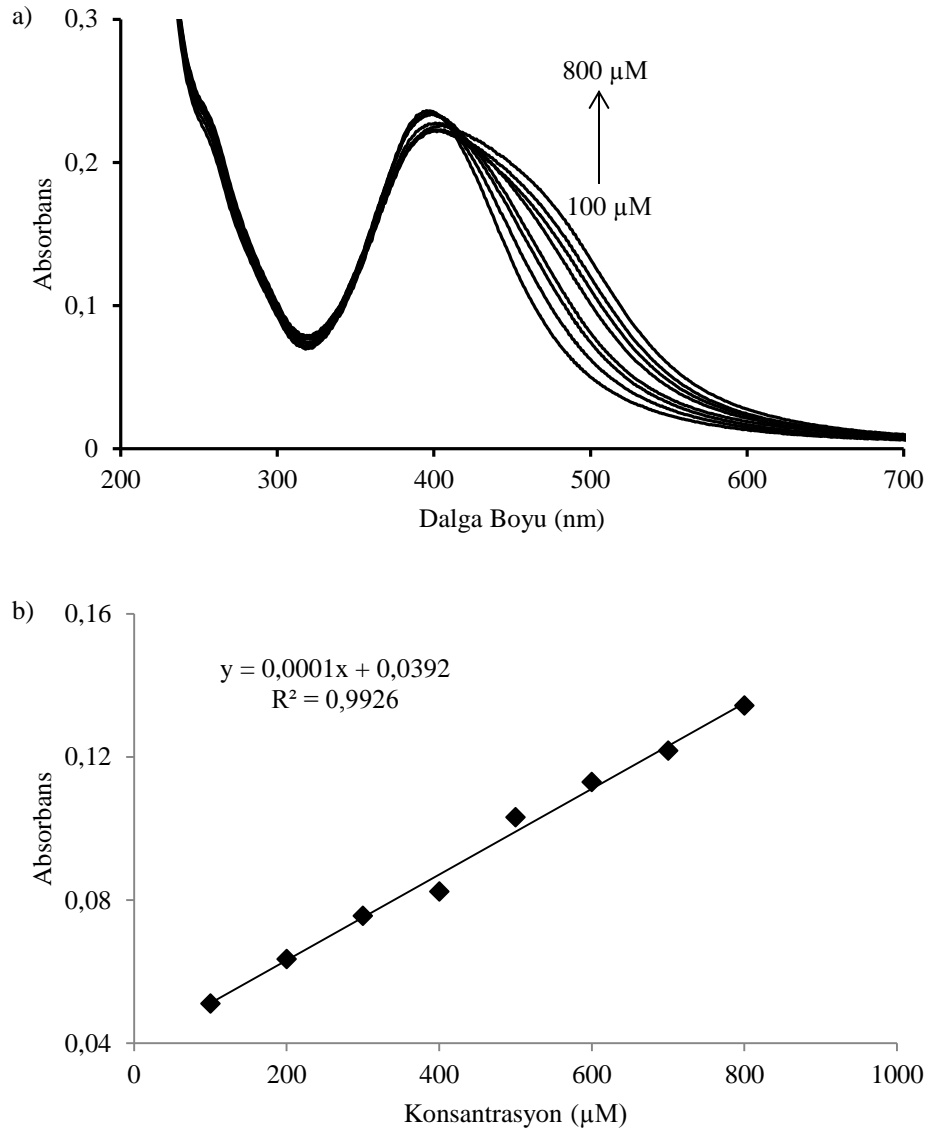
Gözlenen pikin AgGSHHg²⁺Lys yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve Lys, Lys, Lys ve Hg²⁺ iyonu çözelti

karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.89). AgGSH ve Hg^{2+} iyon çözeltisi karışım spektrumunda absorbans şiddetinin düştüğü görülmüştür. Diğer absorpsiyon spektrumlarında kayda değer bir değişim görülmemiştir. AgGSH Hg^{2+} Lys çözeltisi absorpsiyon spektrumunun agregasyondan dolayı genişlediği görülmüştür. AgGSH Hg^{2+} Lys çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,30'dur.

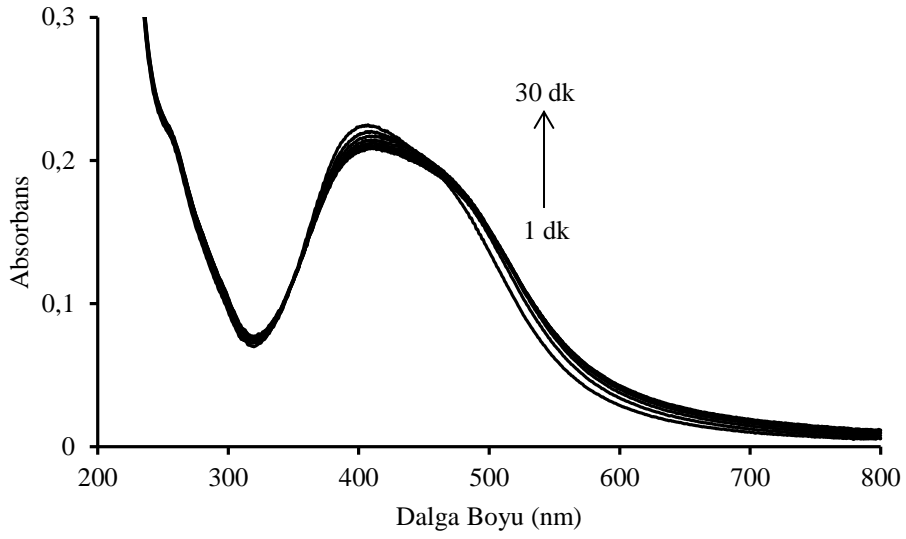


Şekil 4.89. AgGSH Hg^{2+} Lys, AgGSH, AgGSH ve Hg^{2+} , AgGSH ve Lys, Lys, Lys ve Hg^{2+} çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

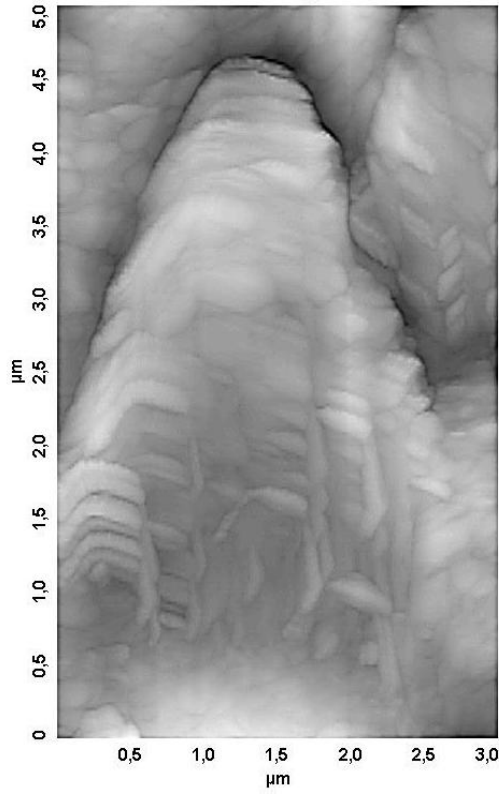
Şekil 4.90'daki kalibrasyon doğrusu, 499 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 800 μM konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.91'de gösterilmiştir. Zamanla kompleksleme miktarı ve dolayısıyla agregasyon artmış absorpsiyon piki genişlemesi görülmüştür. Şekil 4.92'de gösterilen AgGSH Hg^{2+} Lys kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agregate olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.90. Hg^{2+} bulunan ortamda artan Lys konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



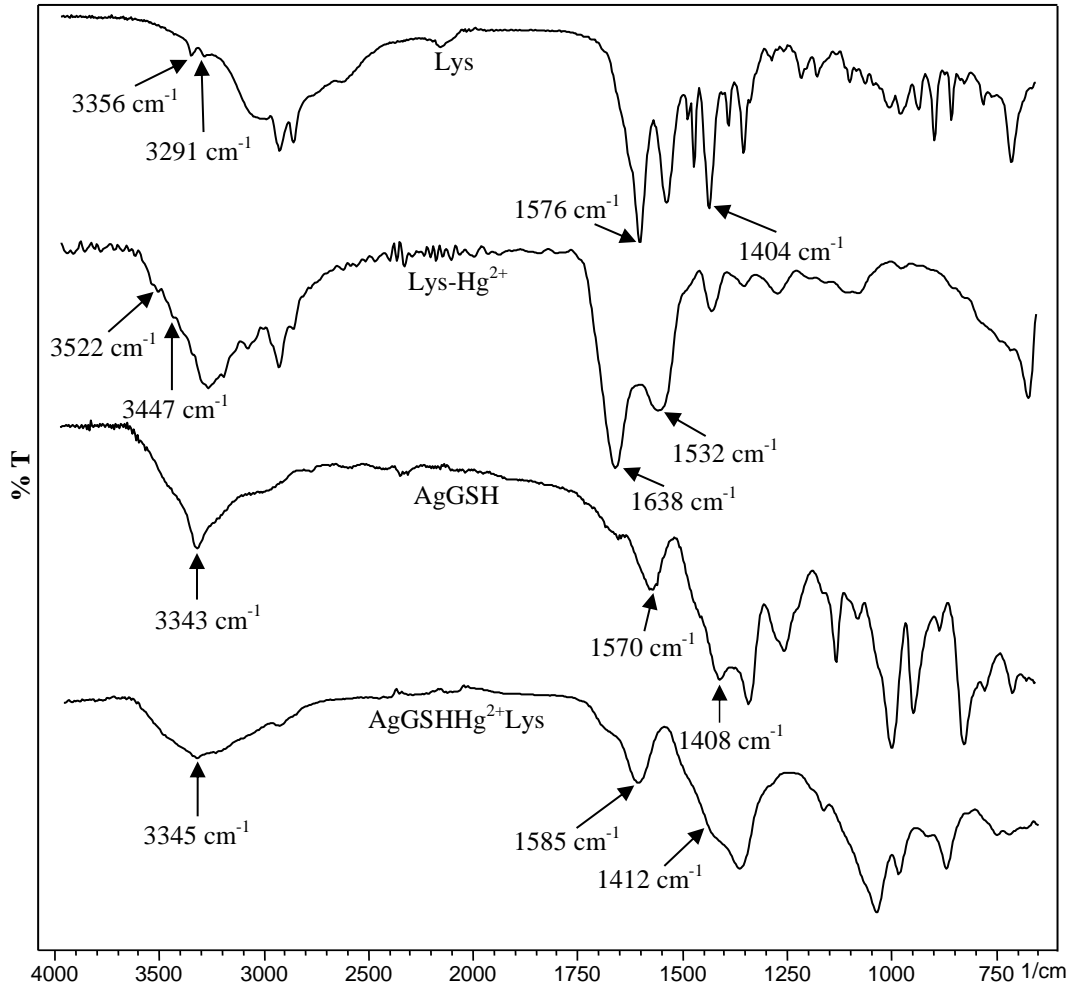
Şekil 4.91. Zamanla değişen AgGSHHg²⁺Lys absorbansları



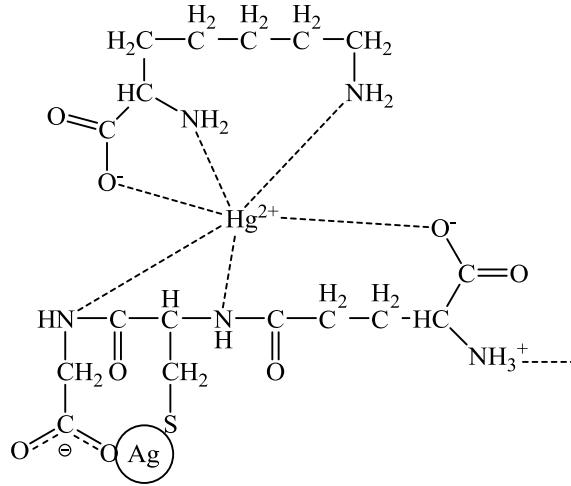
Şekil 4.92. AgGSHHg²⁺Lys yapısının AFM görüntüsü (5x3 µm)

AgGSHHg²⁺Lys kompleksinin yapı tayini için alınan FTIR spektrumları Şekil 4.93'de gösterilmektedir. Lys yapısında bulunan 3356 ve 3291 cm⁻¹'deki -NH titreşim piklerin Lys-Hg²⁺ spektrumunda 3522 ve 3447 cm⁻¹'e kayması bu grubun

etkileşime katıldığını göstermektedir. 1576 ve 1404 cm^{-1} 'deki karboksilat piklerin ise 1638 ve 1532 cm^{-1} 'e kayması bu grubun da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH yapısında bulunan $-\text{NH}_3^+$ grubunun piki olan 3343 cm^{-1} 'deki pikin AgGSHHg²⁺Lys spektrumunda 3345 cm^{-1} 'de çıkması bu grubun kompleksleşmeye katılmadığını göstermektedir. 1570 ve 1408 cm^{-1} 'deki karboksilat piklerinin ise 1585 ve 1412 cm^{-1} 'e kayması AgGSH yapısında bulunan karboksilatın da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSHHg²⁺Lys kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.94'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu düşünülmektedir. Hg²⁺ için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip Hg²⁺ kompleksleri de mevcuttur [457, 474].



Şekil 4.93. Lys, Lys-Co²⁺, AgGSHCo²⁺Lys ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



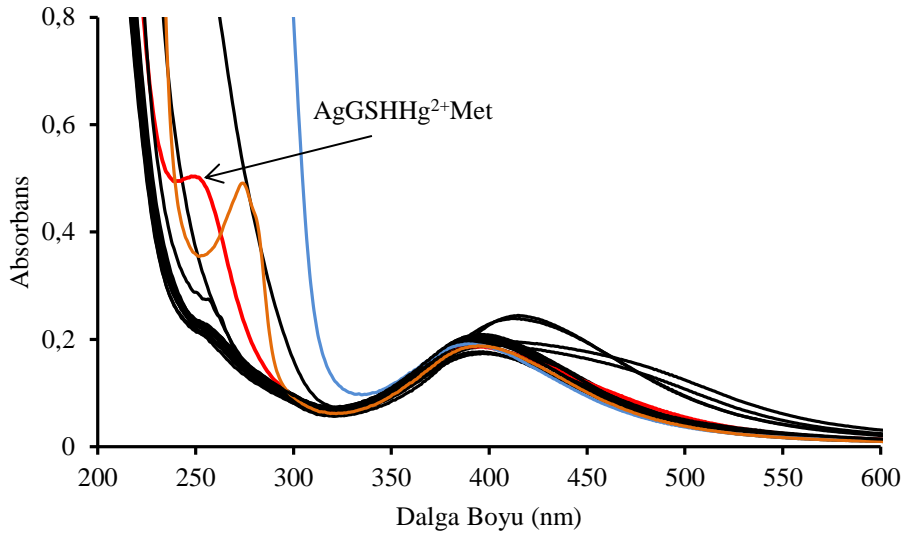
Şekil 4.94. AgGSHHg²⁺Lys yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.2.5. L-metiyonin tayini

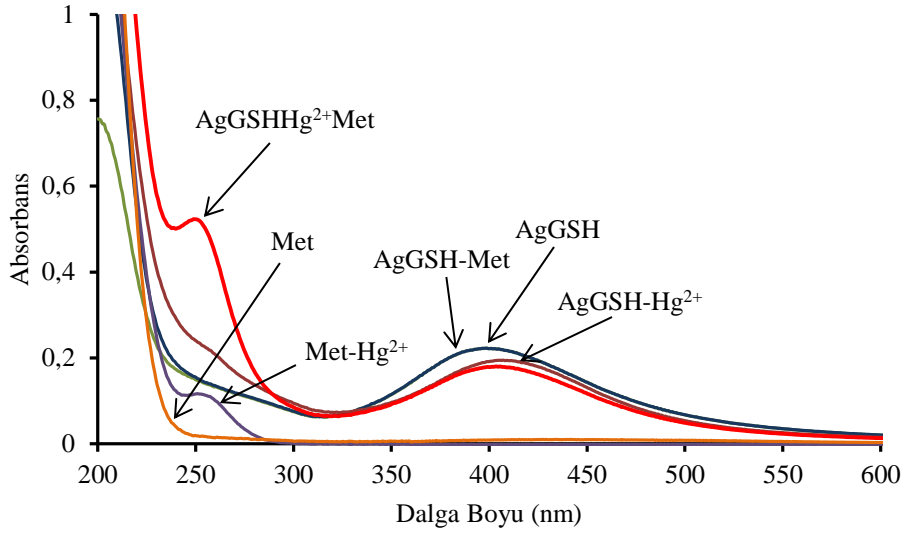
L-metiyonin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde sadece Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumlarının yorumlanmasında ve yapı tahmininde literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [488-491].

4.2.5.1. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda L-metiyonin tayini

Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda metiyonin amino asidinin absorpsiyon spektrumu Şekil 4.95'de gösterilmiştir. Gözlenen pikin AgGSHHg²⁺Met yapısına ait olup olmadığını anlayabilmek için AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve Met, Met, Met ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.96). AgGSH ve Hg²⁺ iyon çözeltisi karışımının absorpsiyon şiddetinde düşme meydana gelmiştir. Met ve Hg²⁺ çözelti karışımının absorpsiyon spektrumunda Met-Hg²⁺ etkileşiminden kaynaklanan 256 nm'de bir pik görülmektedir. AgGSH ve Met arasında bir etkileşimin gerçekleşmediği AgGSH-Met çözelti karışımının absorpsiyon spektrumunun AgGSH ile örtüşmesinden anlaşılmıştır. AgGSHHg²⁺Met çözeltisinin absorpsiyon spektrumu diğerlerinden farklı olarak 249 nm'de pik vermiştir. AgGSHHg²⁺Met çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,20'dir.



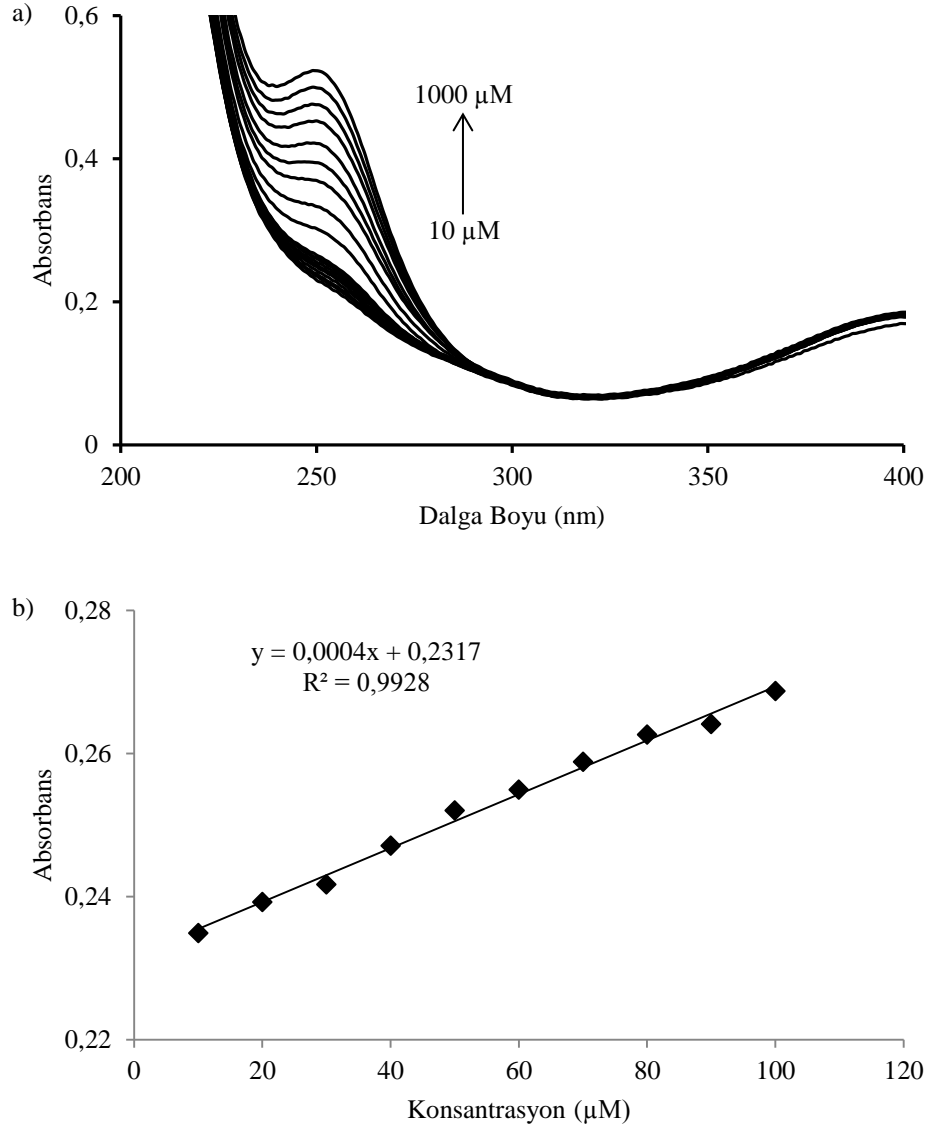
Şekil 4.95. Metiyonin ve diğer amino asit çözeltilerinin Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan etkileşim denemelerinin absorpsiyon spektrumları



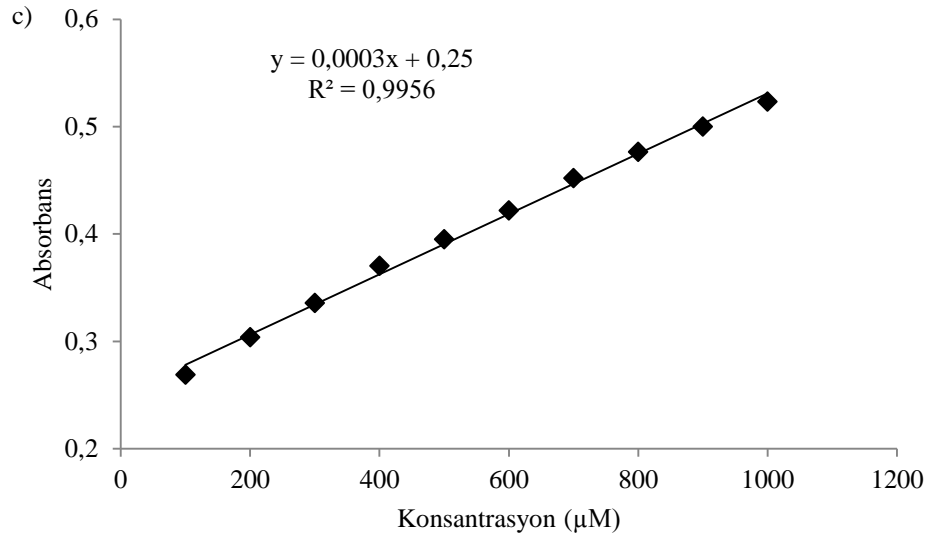
Şekil 4.96. AgGSHHg²⁺Met, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve Met, Met, Met ve Hg²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.97'deki kalibrasyon doğruları, 249 nm'deki absorbans değişimlerinin 10 – 100 µM ve 100 – 1000 µM konsantrasyon aralıklarına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrularının denklemleri ve korelasyon katsayıları grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.98'de gösterilmiştir. Zamanla kompleksleşme miktarı artmıştır. Hg²⁺ iyonunun AgGSH'e etkisi Met amino asidi ile etkileşim vermesi nedeniyle

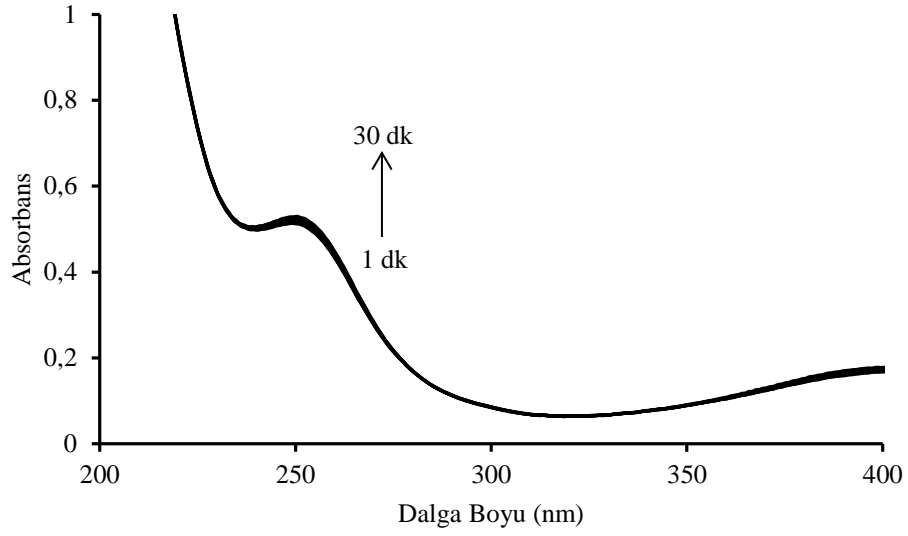
minimuma inmiştir. $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Met}$ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.99'da gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülebilmektedir.



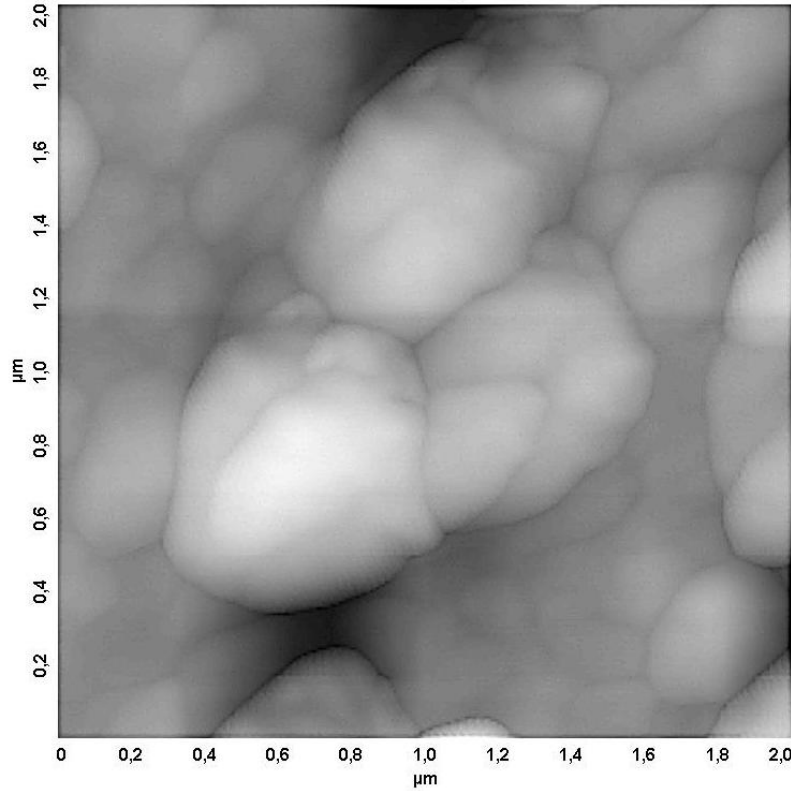
Şekil 4.97. Hg^{2+} bulunan ortamda artan Met konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 10 – 100 μM (b), 100 – 1000 μM (c) kalibrasyon doğruları



Şekil 4.97(Devam). Hg^{2+} bulunan ortamda artan Met konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a) ve 10 – 100 μM (b), 100 – 1000 μM (c) kalibrasyon doğruları



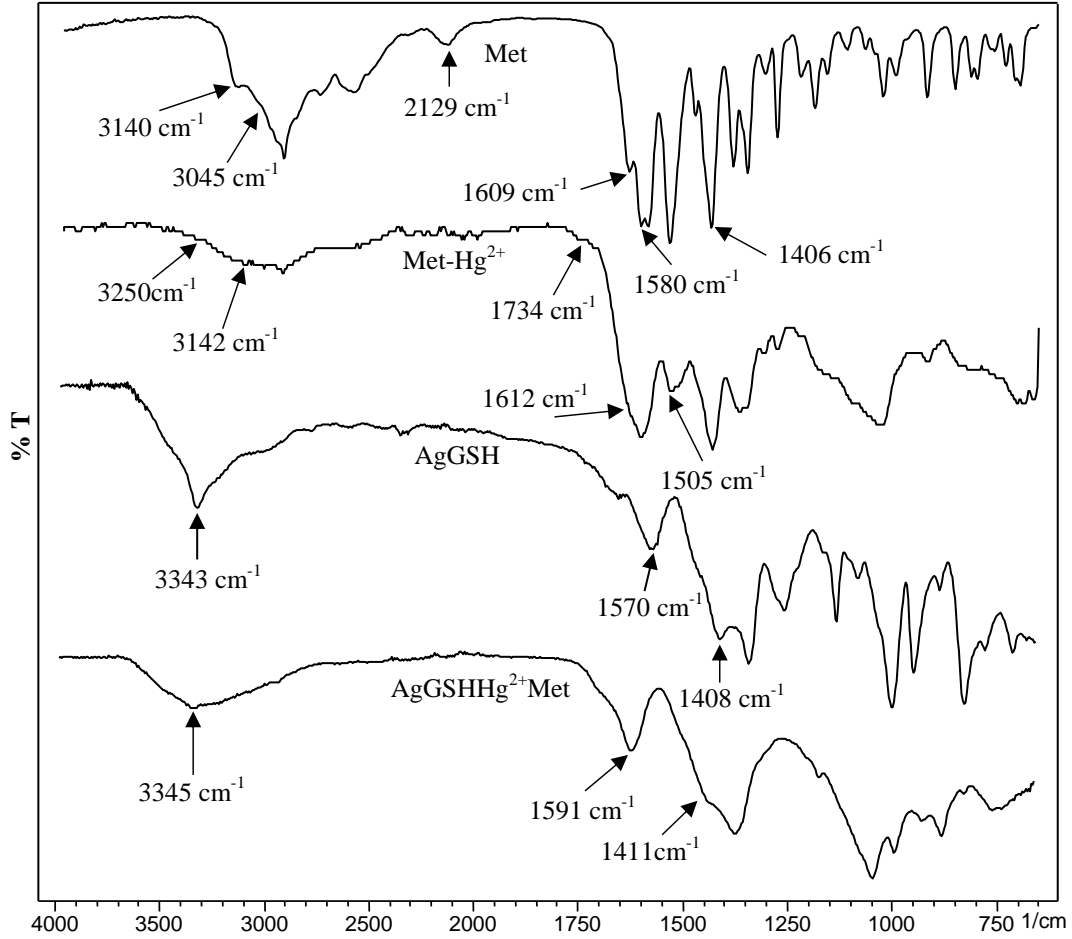
Şekil 4.98. Zamanla değişen $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Met}$ absorbansları



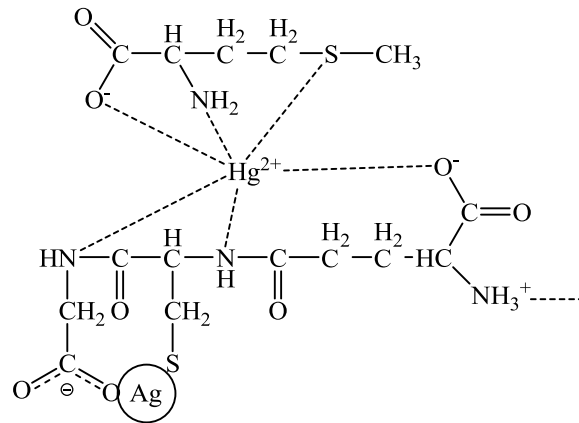
Şekil 4.99. AgGSHHg²⁺Met yapısının AFM görüntüsü (2x2 µm)

Şekil 4.100'de AgGSHHg²⁺Met kompleksinin yapı tayini için alınan FTIR spektrumları görülmektedir. Met yapısında görülen 3140 ve 3045 cm⁻¹'deki -NH gerilme titreşim piklerinin Met-Hg²⁺ spektrumunda 3250 ve 3142 cm⁻¹'e kayması bu grubun etkileşime girdiğini göstermektedir. 2129 cm⁻¹'de görülen pik ise kükürdün protonlanmasından kaynaklanan -SH pikidir ve Met-Hg²⁺ spektrumunda bulunmaması bu grubun Hg²⁺ ile etkileşime girdiğini göstermektedir. 1609 cm⁻¹'deki -NH piki şiddeti azalarak 1734 cm⁻¹'e kaymıştır. 1580 ve 1406 cm⁻¹'deki karboksilat piklerin ise Met-Hg²⁺ spektrumunda 1612 ve 1505 cm⁻¹'e kayması bu grupların da etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH spektrumundaki -NH₃⁺'den kaynaklanan 3343 cm⁻¹'deki pikin AgGSHHg²⁺Met spektrumunda 3345 cm⁻¹'de çıkması bu grubun etkileşime katılmadığını göstermektedir. 1570 ve 1408 cm⁻¹'deki karboksilat piklerinin ise 1591 ve 1411 cm⁻¹'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSHHg²⁺Met kompleksi için önerilebilecek pek çok yapı mevcuttur. Şekil 4.101'de gösterilen yapının muhtemel yapılar içerisinde olduğu

düşünülmektedir. Hg^{2+} için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip Hg^{2+} kompleksleri de mevcuttur [457, 474].



Şekil 4.100. Met, Met-Hg^{2+} , $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Met}$ ve AgGSH yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları



Şekil 4.101. $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{Met}$ yapısının muhtemel bağlanma şekli

4.3. Protein Tayinleri

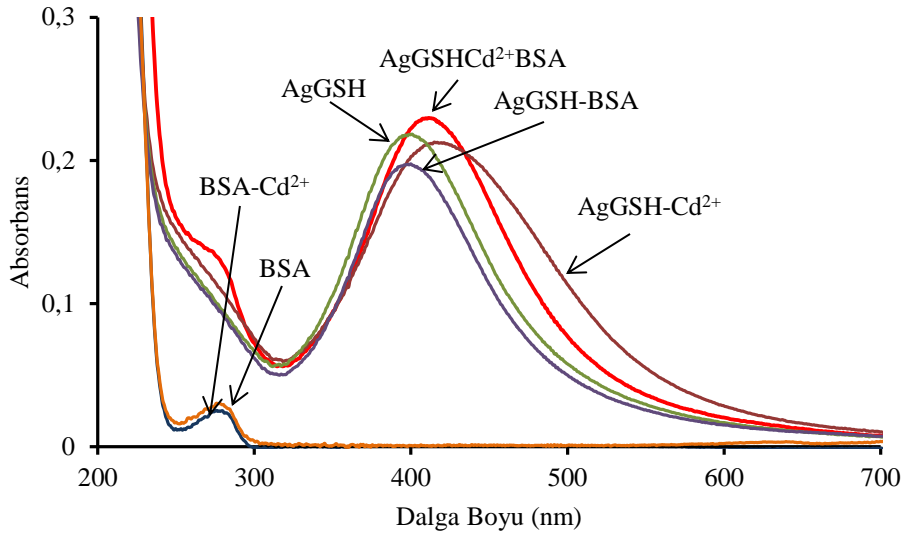
Bu bölümde değişik metal iyonları bulunan ortamlarda tayinleri gerçekleştirilen sığır serum albumini ve α -laktalbumin proteinlerinin tayin sınırları, FTIR spektrumları ve AFM görüntüleri tartışılacaktır.

4.3.1. Sığır serum albumini tayini

Sığır serum albumini tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları bölümün sonunda toplu bir şekilde verilecektir. Spektrumların yorumlanmasında literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [492-495].

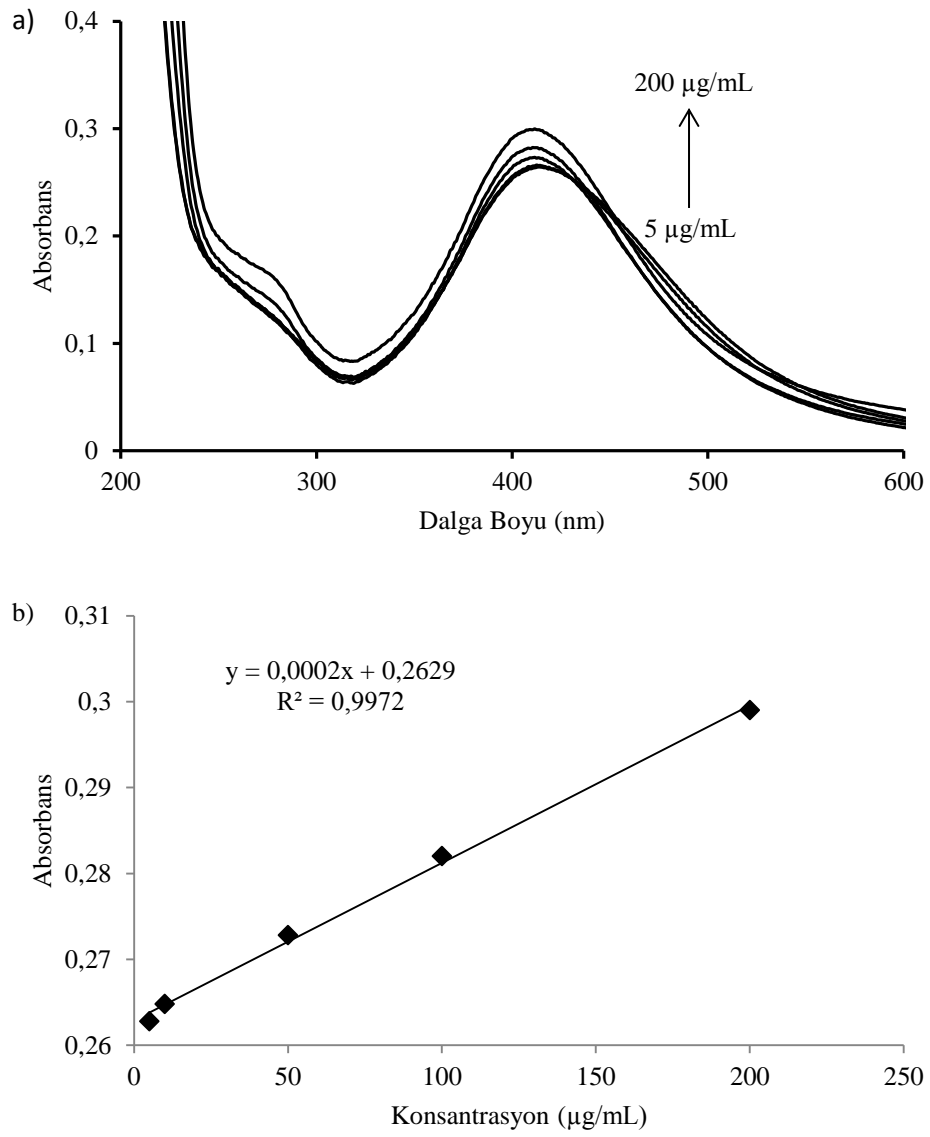
4.3.1.1. Cd^{2+} iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini

$\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$, AgGSH , AgGSH ve Cd^{2+} , AgGSH ve BSA , BSA , BSA ve Cd^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.102'de gösterilmektedir. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$ absorpsiyon piki diğer absorpsiyon piklerinden daha fazla şiddete sahiptir. AgGSH 'in spektrumuna göre absorpsiyon maksimumu kırmızıya kayarak 410 nm'de çıkmıştır. AgGSH-BSA çözeltisinin absorpsiyon şiddeti etkileşim nedeniyle azalmıştır. AgGSH-Cd^{2+} çözeltisinin spektrumu ise etkileşim sonucu oluşan agregasyondan dolayı genişleyerek kırmızıya kaydığı görülmüştür. BSA ve BSA-Cd^{2+} çözeltileri 260 nm'de düşük şiddetli pik vermişlerdir. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,25'dir.

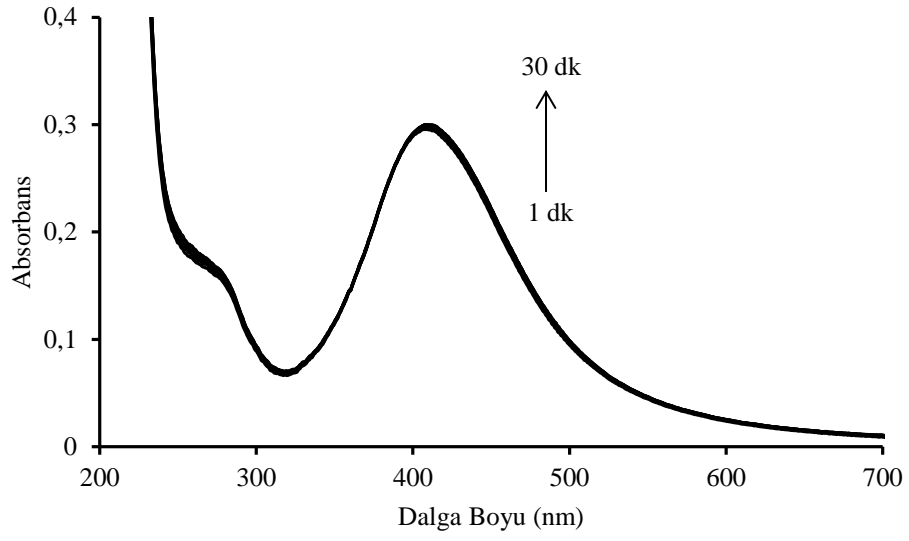


Şekil 4.102. AgGSHCd²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Cd²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

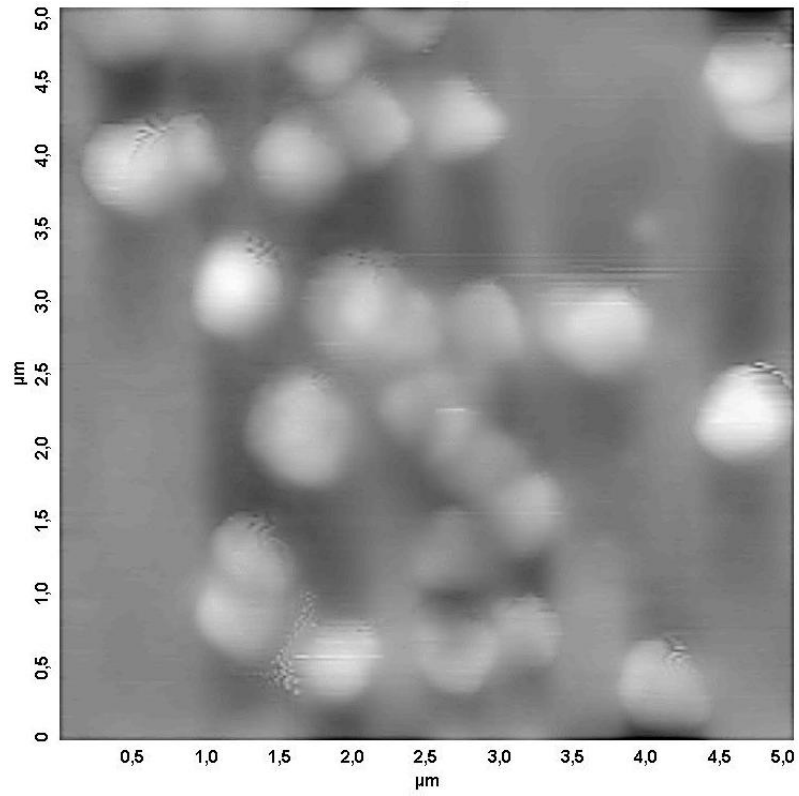
Şekil 4.103'deki kalibrasyon doğrusu, 410 nm'deki absorbans değişimlerinin 5 – 200 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. BSA konsantrasyonu arttıkça Cd²⁺ ile AgGSH etkileşiminden kaynaklanan agregasyonun azalması absorpsiyon piklerinin genişliğinin azalmasına neden olmuştur. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.104'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.105'de görülen AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.103. Cd^{2+} bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



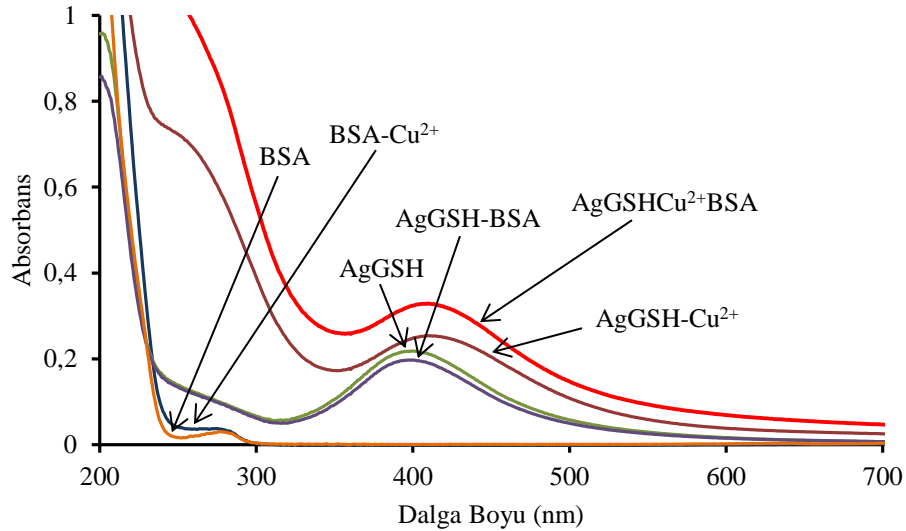
Şekil 4.104. Zamanla değişen AgGSHCd²⁺BSA absorbanları



Şekil 4.105. AgGSHCd²⁺BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

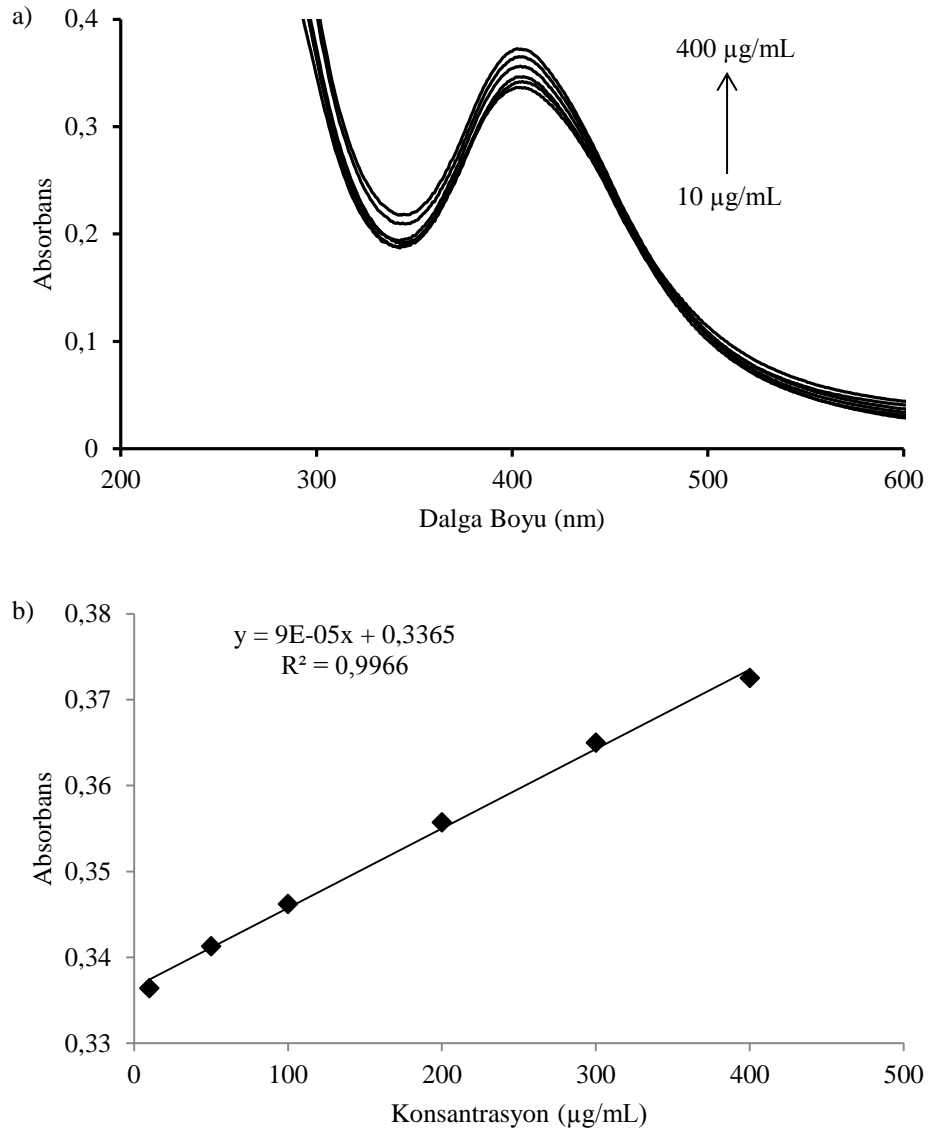
4.3.1.2. Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini

$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve BSA , BSA , BSA ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.106'da gösterilmektedir. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti diğer çözeltilerden daha fazla çıkmıştır ve kırmızıya kayma (403 nm) gözlenmiştir. AgGSH ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımının absorpsiyon maksimumu 409,5 nm'de çıkmıştır ve şiddeti $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ 'ya göre daha azdır. BSA-Cu^{2+} çözeltisi, BSA ile aynı dalga boyunda absorpsiyon maksimumu vermiştir. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,15'dir.

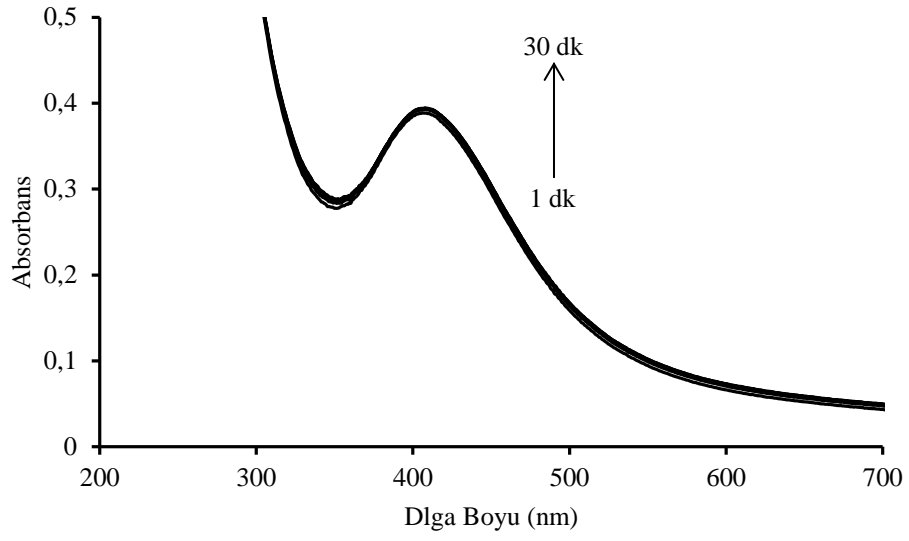


Şekil 4.106. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve BSA , BSA , BSA ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

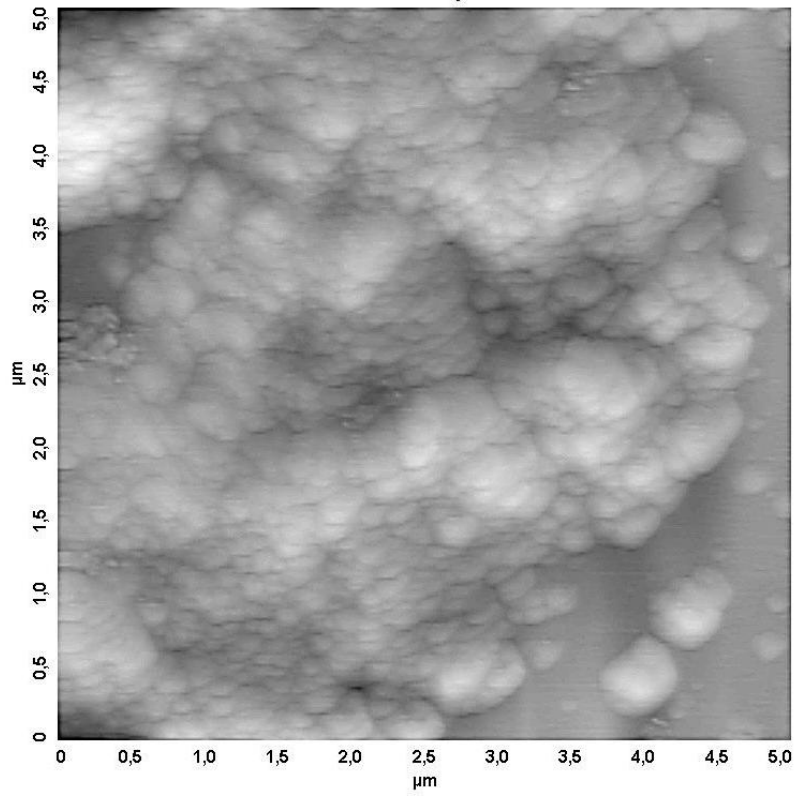
Şekil 4.107'deki kalibrasyon doğrusu, 403 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 10 – 400 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyona etkisi Şekil 4.108'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. AFM görüntüsü Şekil 4.109'da gösterilmiştir. Agregasyonun $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$ 'ya göre daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 4.107. Cu^{2+} bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



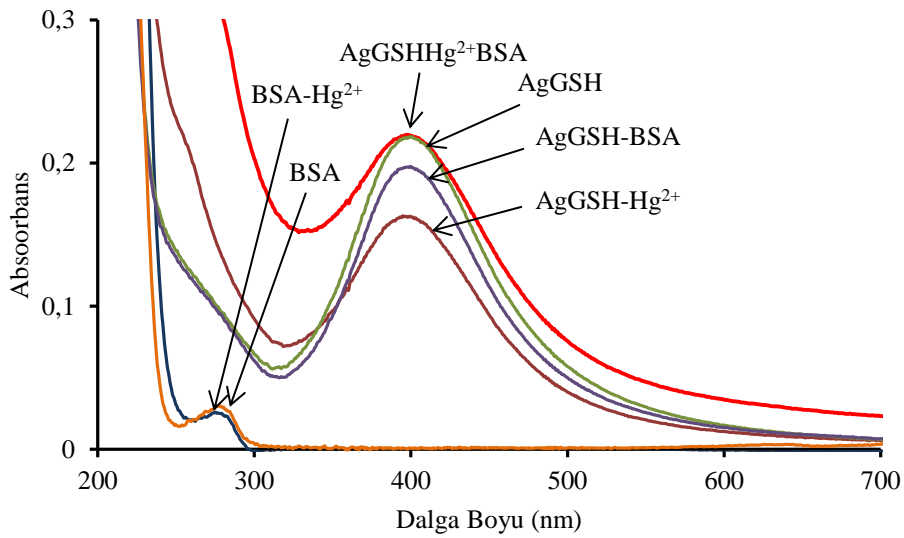
Şekil 4.108. Zamanla değişen AgGSHCu²⁺BSA absorbanları



Şekil 4.109. AgGSHCu²⁺BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

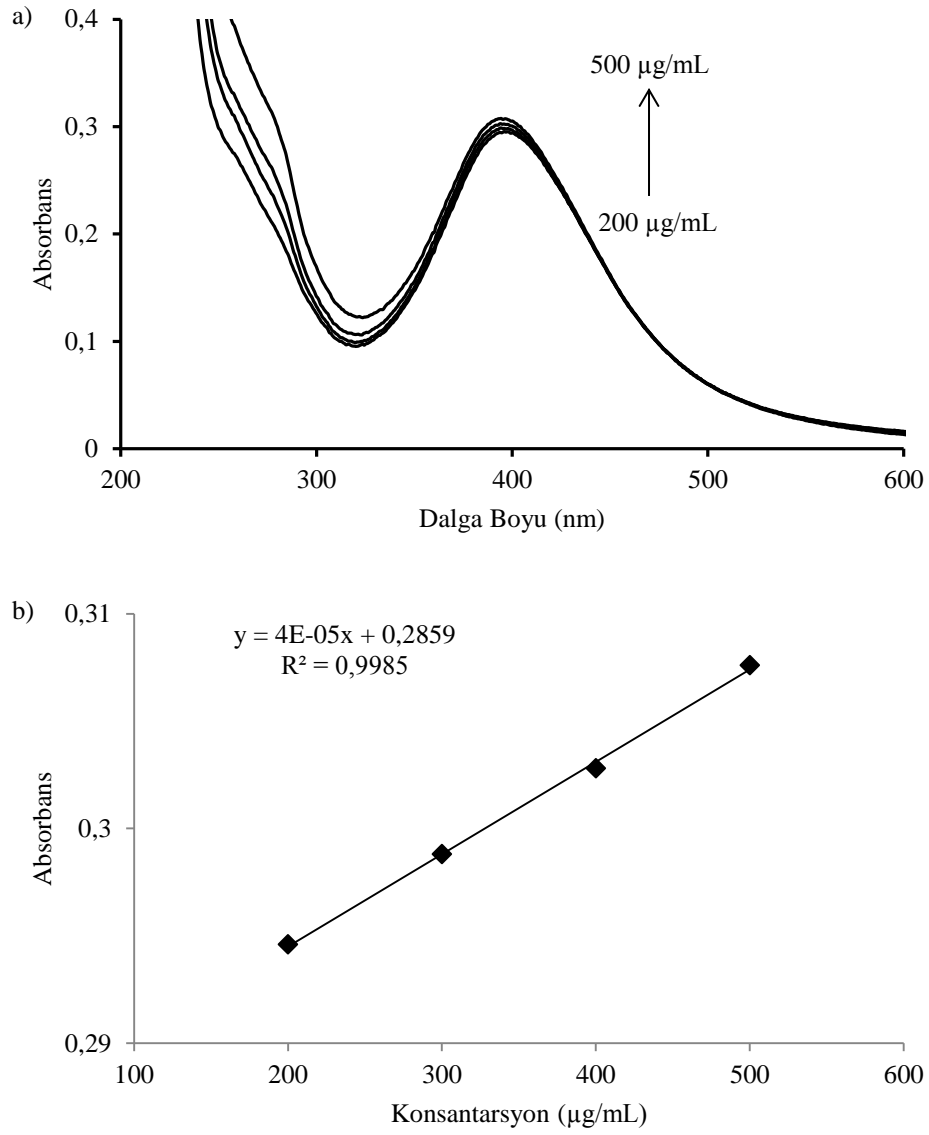
4.3.1.3. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini

AgGSHHg²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.110'da gösterilmektedir. BSA-Hg²⁺ çözelti karışımının absorpsiyon şiddeti BSA'ninkinden az da olsa düşük çıkmıştır. AgGSHHg²⁺BSA çözeltisinin absorpsiyon şiddeti AgGSH'inkiyle hemen hemen aynı çıkmıştır. Fakat gerçekleşen etkileşim nedeniyle spektrum karakteristiği farklıdır. AgGSHHg²⁺BSA çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,38'dir.

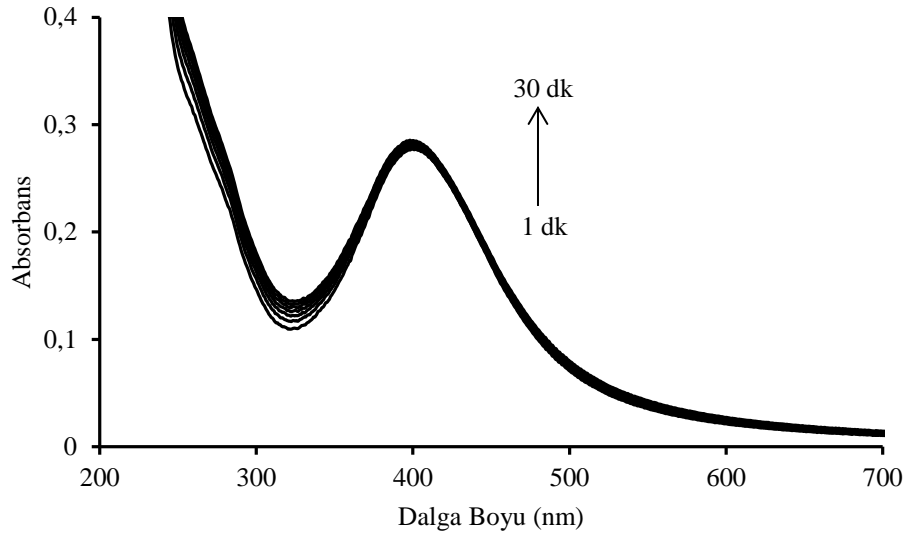


Şekil 4.110. AgGSHHg²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Hg²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

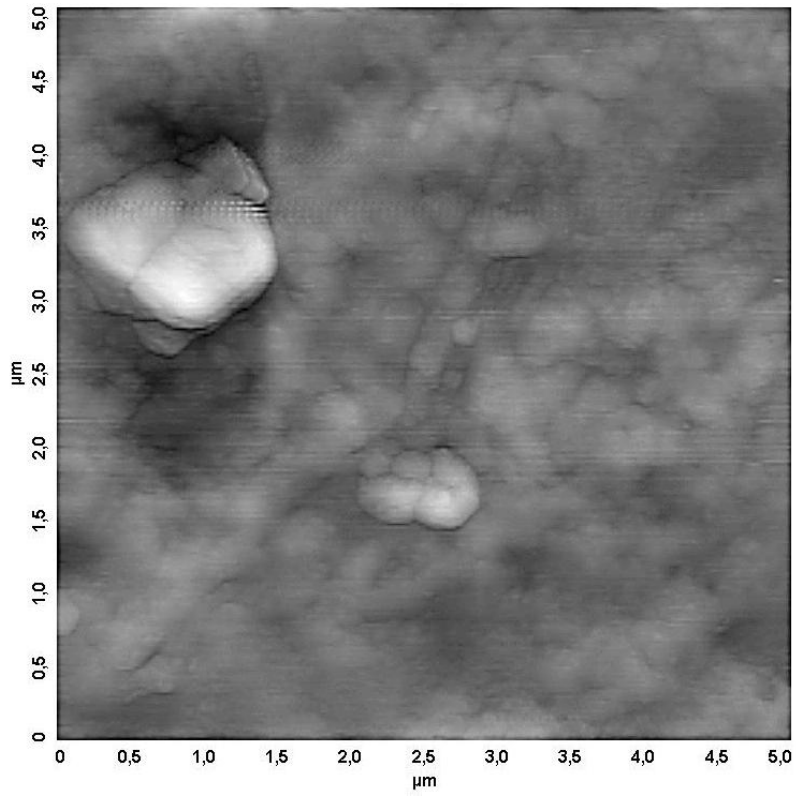
Şekil 4.111'deki kalibrasyon doğrusu, 394 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 200 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyona etkisi Şekil 4.112'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır. AFM görüntüsü Şekil 4.113'de gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.111. Hg^{2+} bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



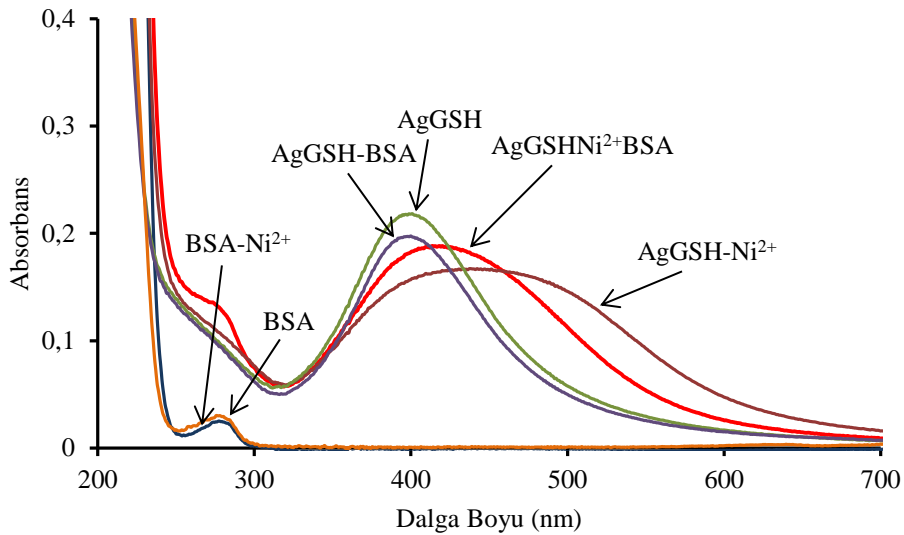
Şekil 4.112. Zamanla değişen AgGSHHg²⁺BSA absorbansları



Şekil 4.113. AgGSHHg²⁺BSA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

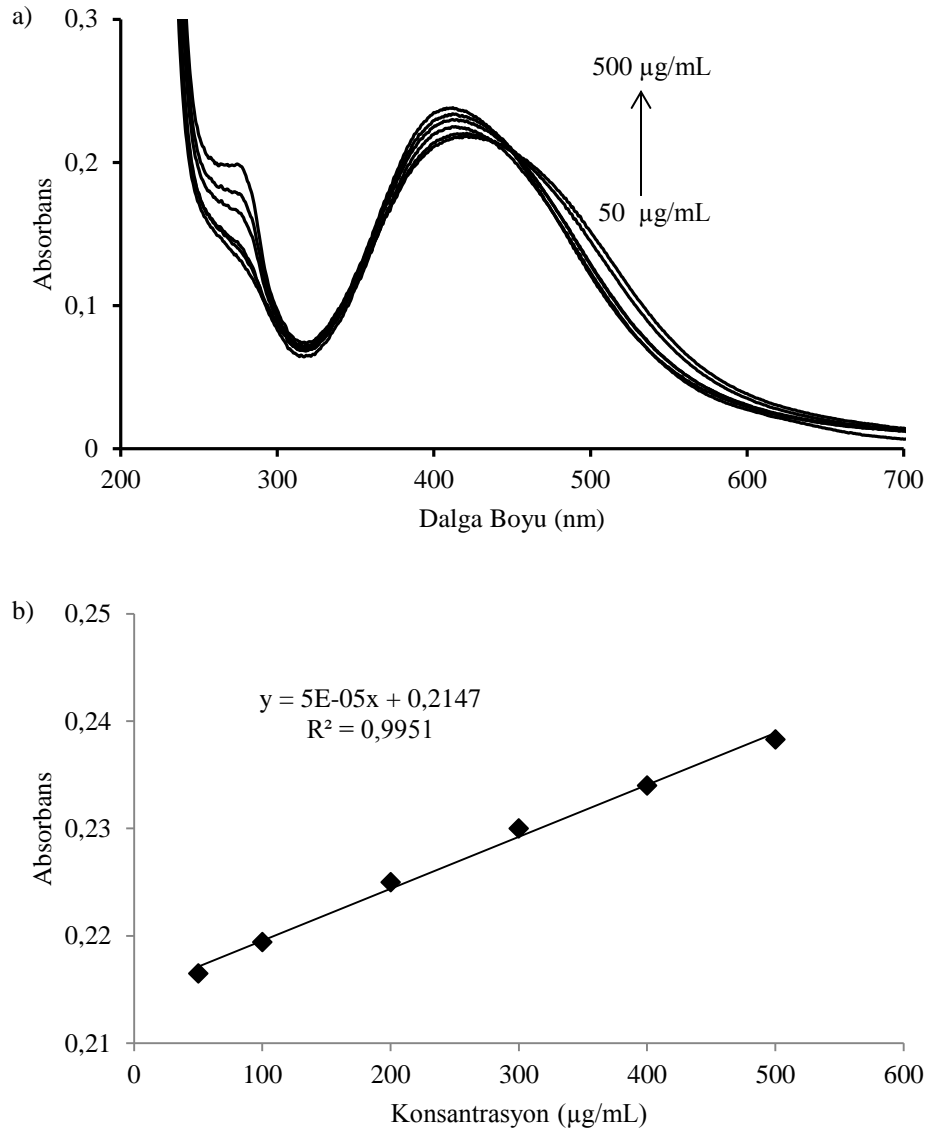
4.3.1.4. Ni²⁺ iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini

AgGSHNi²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Ni²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.114'de gösterilmektedir. BSA-Ni²⁺ çözeltisinin absorpsiyon şiddetinde düşme gerçekleşmiştir. AgGSH-Ni²⁺ çözelti karışımının absorpsiyon spektrumunda etkileşim sonucu meydana gelen agregasyon nedeniyle pik genişlemesi görülmüştür. AgGSHNi²⁺BSA spektrumunda meydana gelen kompleks nedeniyle Ni²⁺ iyonlarının AgGSH ile etkileşimi ve agregasyona etkisi azalmıştır. AgGSHNi²⁺BSA çözeltisinin absorpsiyon maksimumu 412 nm'ye kaymıştır. AgGSHNi²⁺BSA çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,26'dır.

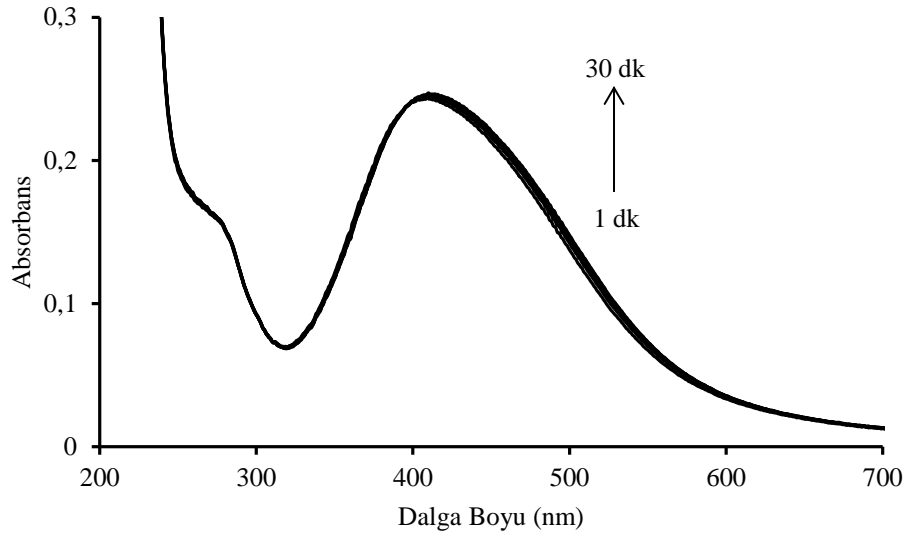


Şekil 4.114. AgGSHNi²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Ni²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

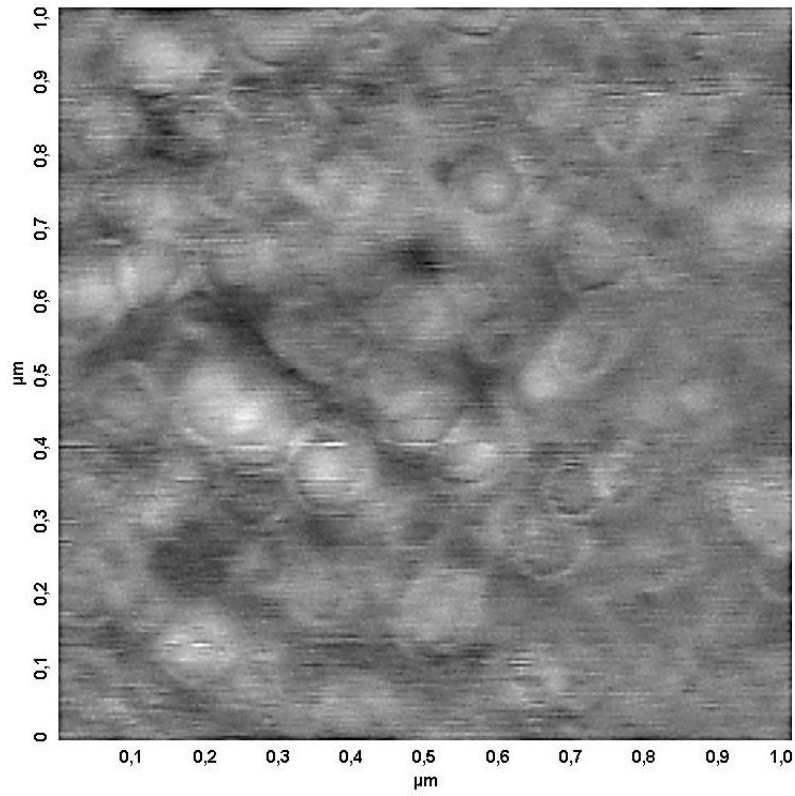
Şekil 4.115'deki kalibrasyon doğrusu, 412 nm'deki absorbans değişimlerinin 50 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.116'da gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. AgGSHNi²⁺BSA kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.117'de gösterilmiştir. Agregasyon sonucu boyutları 100 nm'yi geçen yapılar oluşmuştur.



Şekil 4.115. Ni^{2+} bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değışimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



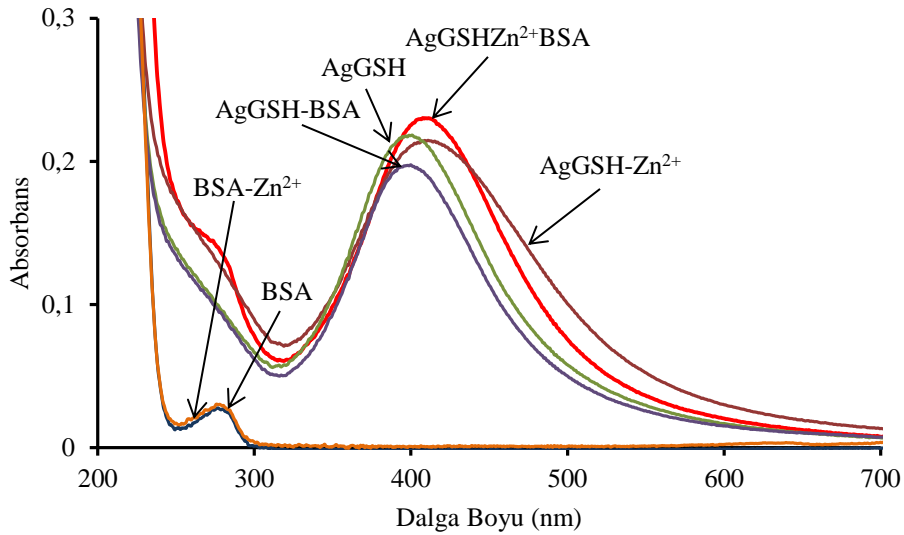
Şekil 4.116. Zamanla değişen AgGSHNi²⁺BSA absorbanları



Şekil 4.117. AgGSHNi²⁺BSA yapısının AFM görüntüsü (1x1 µm)

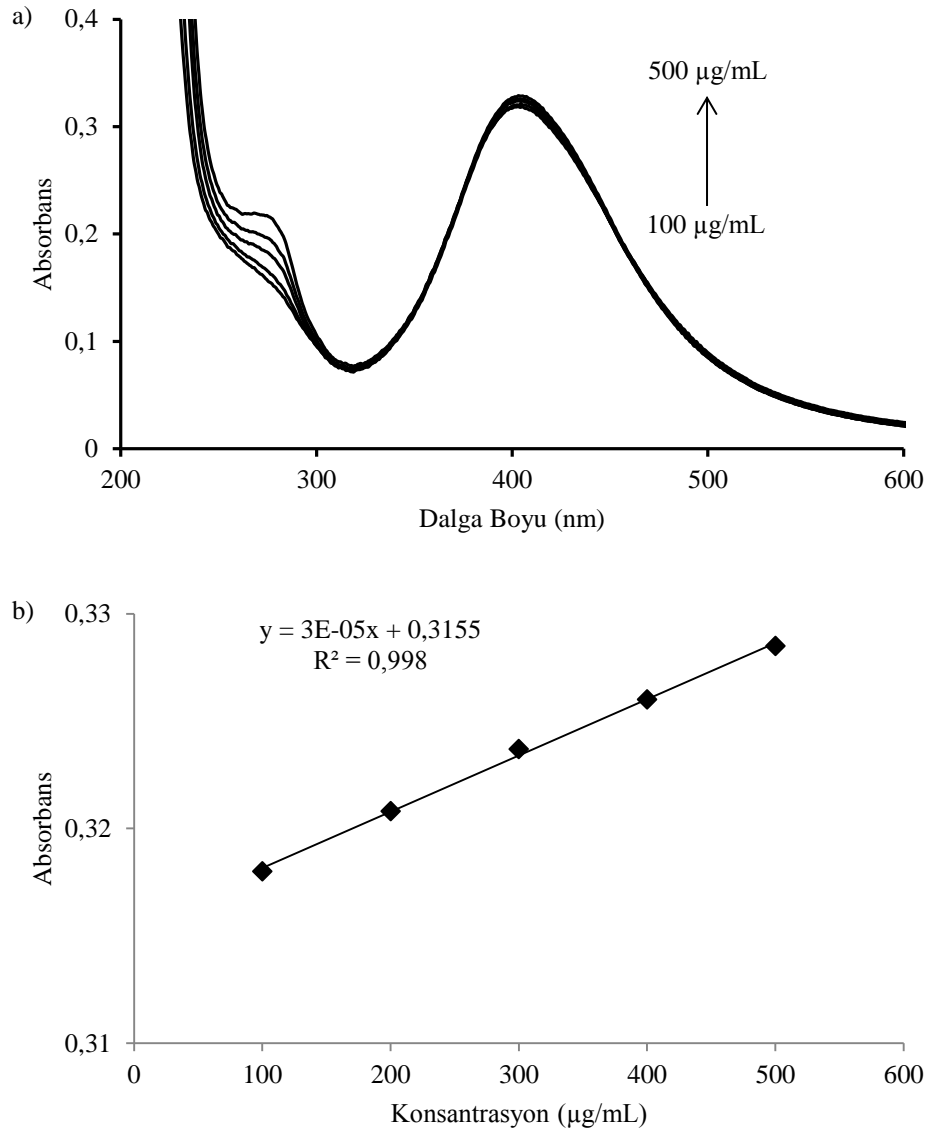
4.3.1.5. Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda sığır serum albumini tayini

AgGSHZn²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.118'de gösterilmektedir. AgGSH-Zn²⁺ çözelti karışımının absorpsiyon spektrumu etkileşimden dolayı az da olsa genişlemiş ve kırmızıya (404 nm) kaymıştır. BSA ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımının absorpsiyon şiddeti BSA'dan az da olsa düşük çıkmıştır. AgGSHZn²⁺BSA çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artmış ve 404 nm'ye kaymıştır. AgGSHZn²⁺BSA çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,45'dir.

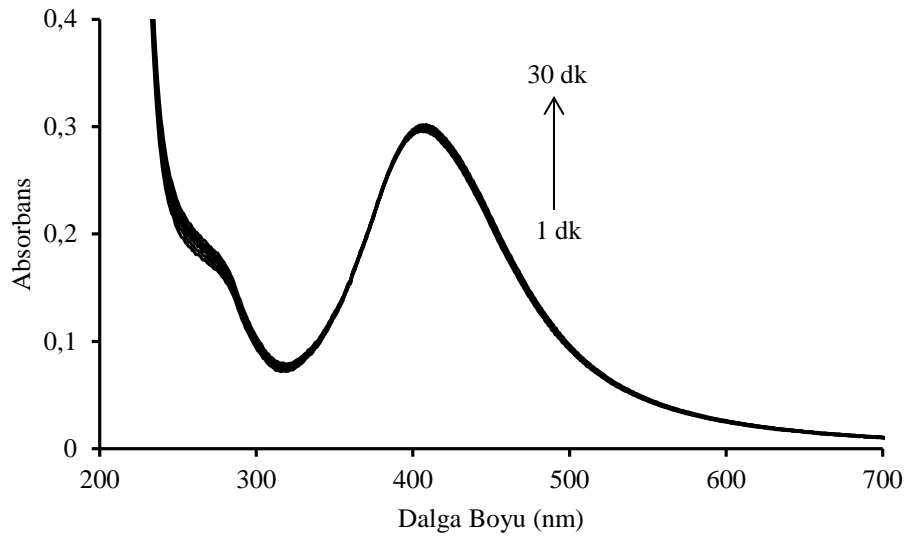


Şekil 4.118. AgGSHZn²⁺BSA, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve BSA, BSA, BSA ve Zn²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

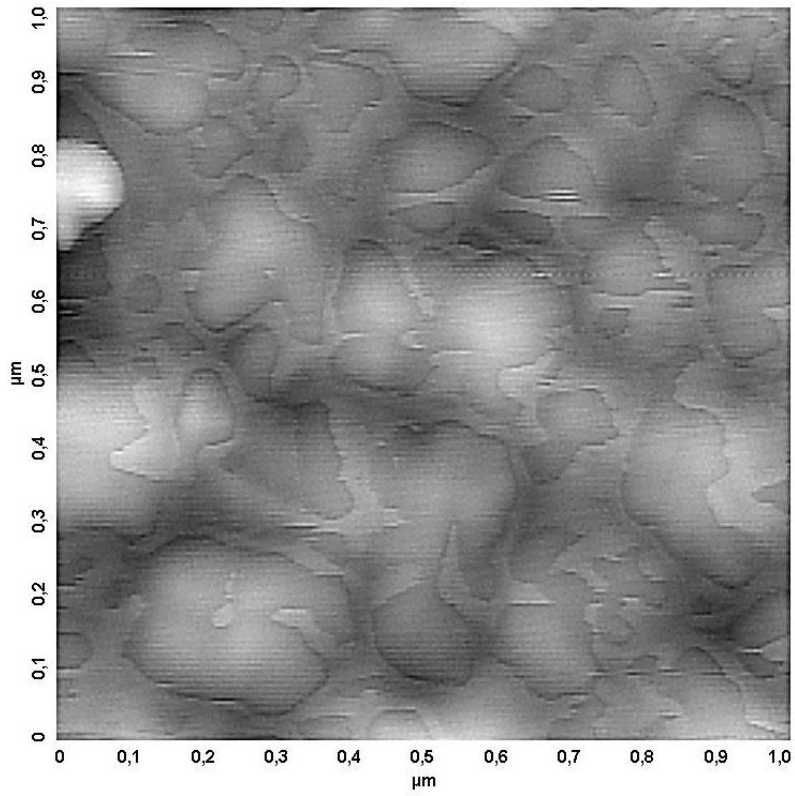
Şekil 4.119'daki kalibrasyon doğrusu, 404 nm'deki absorbans değişimlerinin 100 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.120'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.121'de gösterilen AgGSHZn²⁺BSA kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.119. Zn^{2+} bulunan ortamda artan BSA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



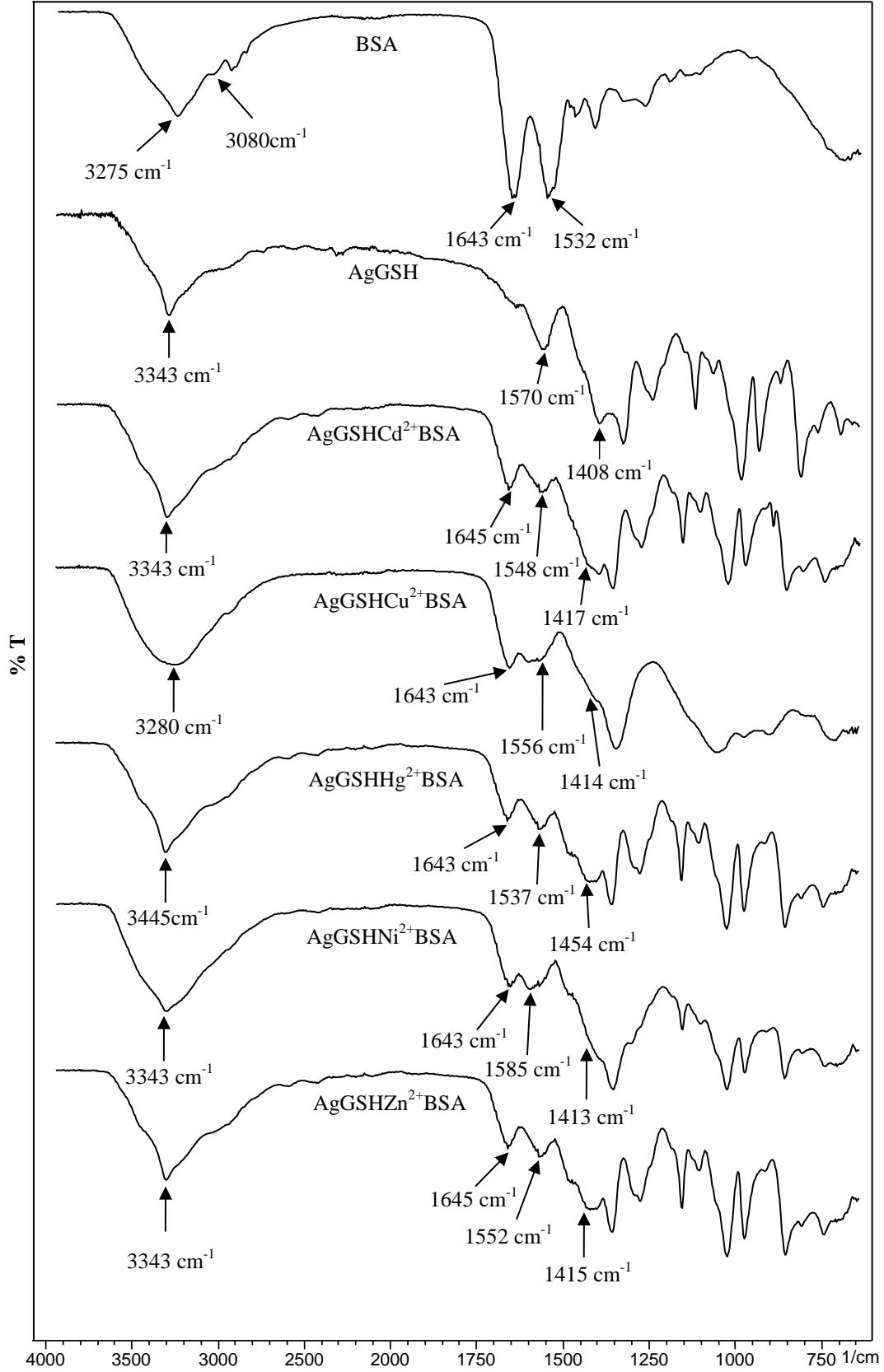
Şekil 4.120. Zamanla değişen AgGSHZn²⁺BSA absorbansları



Şekil 4.121. AgGSHZn²⁺BSA yapısının AFM görüntüsü (1x1 µm)

4.3.1.6. Sığır serum albumini için alınan FTIR spektrumları

Şekil 4.122'deki FTIR spektrumlarına bakıldığında BSA'nın hem gümüş nanoparçacığı hem de bağlı GSH ile etkileşim kurduğu gözlenmiştir. Bu etkileşim sonucunda AgGSH yapısının karakteristik piklerinin yanında BSA'nın karakteristik piklerinin de ortaya çıktığı görülmüştür. BSA'dan kaynaklanan bu piklerin spektrumlarda farklı yerlerde çıkması, bu piklerin ortamda reaksiyona girmeyen BSA'dan kaynaklanmadığı etkileşim nedeniyle ortaya çıktığını göstermektedir. Bu nedenle AgGSH-Metal iyonu-BSA çözelti karışımlarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları yorumlanırken AgGSH'in piklerinin yanında BSA piklerinin de şiddet değişimleri ve kaymalarının dikkate alınması zorunluluğu doğmuştur. Bu durum daha sonra bahsedilecek protein ve enzim tayinleri için alınan FTIR spektrumları için de geçerlidir ve tekrar bahsedilmeyecektir. BSA spektrumunda 3275 ve 3080 cm^{-1} 'de bulunan pikler -NH gerilme titreşimleri nedeniyle oluşan piklerdir. 1643 cm^{-1} 'de görülen pik -C=O gerilme titreşiminden oluşan amit I pikidir. 1532 cm^{-1} 'de görülen pik ise -NH eğilme ve -C-N gerilme titreşiminden kaynaklanan piklerin birleşmesi ile oluşmuştur. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 3343 cm^{-1} 'de çıkan pik -NH_3^+ titreşiminden kaynaklanmaktadır ve kayma görülmemiştir. Bu pikin $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ dışındaki diğer spektrumlarda da kaymadığı gözlenmiştir. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda ise -NH_3^+ piki kaybolmuş ve sadece -OH piki ortaya çıkmıştır. Bu sonuç diğer spektrumlardan farklı olarak $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ yapısında AgGSH'in -NH_3^+ grubunun da etkileşime girdiğini göstermektedir. BSA'dan kaynaklanan amin pikleri ise kayarak bu pikin içine gömülmüştür. AgGSH'in -NH_3^+ grubunun $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ dışındaki yapılarda etkileşime katılmadığı BSA'nın amin gruplarının ise katıldığı görülmektedir. $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 1645 ve 1548 cm^{-1} 'de görülen pikler ise BSA'nın amit I ve II pikleridir. Amit I ve amit II pikleri $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 1643 ve 1556 cm^{-1} 'de, $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 1643 ve 1537 cm^{-1} 'de, $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 1643 ve 1585 cm^{-1} 'de, $\text{AgGSHZn}^{2+}\text{BSA}$ spektrumunda 1645 ve 1552 cm^{-1} 'de çıkmıştır. Amit I pikinde kayda değer bir kayma gerçekleşmezken amit II pikinin tüm spektrumlarda kaydığı görülmüştür. Bu sonuç BSA'nın -NH grupları ile etkileşime girdiğinin kanıtıdır.



Şekil 4.122. BSA, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-BSA yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

AgGSHCd²⁺BSA spektrumunda 1417 cm⁻¹'de görülen pik ise AgGSH spektrumunda bulunan 1408 cm⁻¹'de pik veren karboksilat titreşim pikinin kayması ile oluşmuştur. Bu pik AgGSHCu²⁺BSA spektrumunda 1414 cm⁻¹'de, AgGSHHg²⁺BSA spektrumunda 1454 cm⁻¹'de, AgGSHNi²⁺BSA spektrumunda 1413 cm⁻¹'de, AgGSHZn²⁺BSA spektrumunda 1415 cm⁻¹'de çıkmıştır. Pik şiddetlerinin de azaldığı gözlenmiştir. AgGSH spektrumunda 1570 cm⁻¹'de bulunan asimetrik karboksilat piki ise kayarak amit pikleri ile örtüşmüştür. AgGSH'in karboksilat grupları da etkileşime girmektedir.

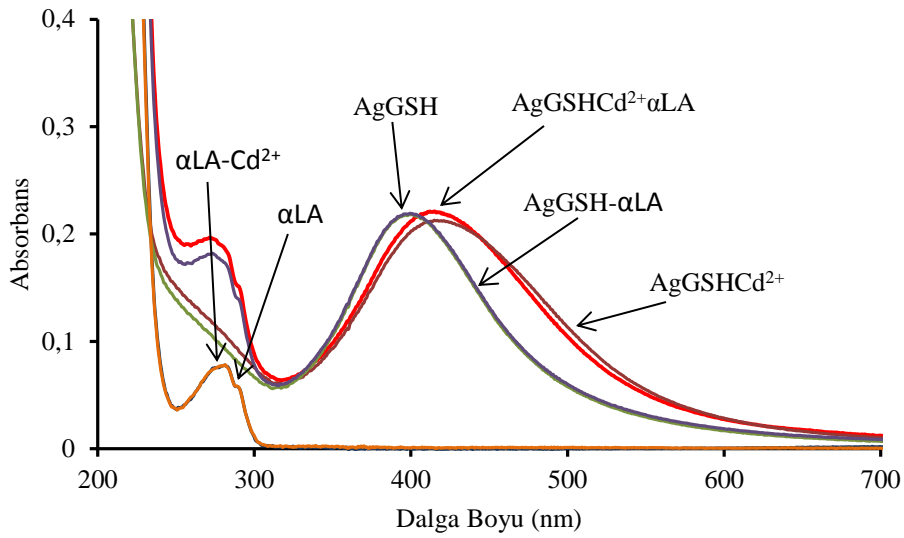
BSA pH 7 civarında çok kararlı bir şekilde yapısını koruyabilmektedir. pH 7'nin altına düştükçe özellikle çok asidik koşullarda (pH 2) yapısı agregasyon ve hidroliz nedeniyle bozulmaktadır. BSA'nın ikincil yapısına yüksek oranda α -sarmal yapısı hakimse de, β -tabaka, kıvrım ve rastgele sarmaldan oluşan pikler de FTIR spektrumlarında görülebilmektedir. Düşük pH'larda α -sarmal yapısı bozunarak β -tabaka yapısının daha baskın olduğu belirtilmiştir [496]. Bu yapı değişiklikleri normal konformasyon (N yapısı), hızlı konformasyonu (F yapısı) ve tamamıyla genişlemiş yapı (E yapısı) olarak isimlendirilmektedir. N yapısı pH 4,5 – 8 arası, F yapısı 4 – 4,5 arası, E yapısı ise pH 4'ün altında oluşmaktadır [497]. Elde edilen komplekslerin tümünün pH aralığı 7,00 – 8,30 olduğu için meydana gelen etkileşimlerin BSA'nın normal konformasyonu ile oluştuğu söylenebilir.

4.3.2. α -laktalbumin tayini

α -laktalbumin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Cd²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ ve Zn²⁺ iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları bölümün sonunda toplu bir şekilde verilecektir. Spektrumların yorumlanmasında literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [498, 499].

4.3.2.1. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda α -laktalbumin tayini

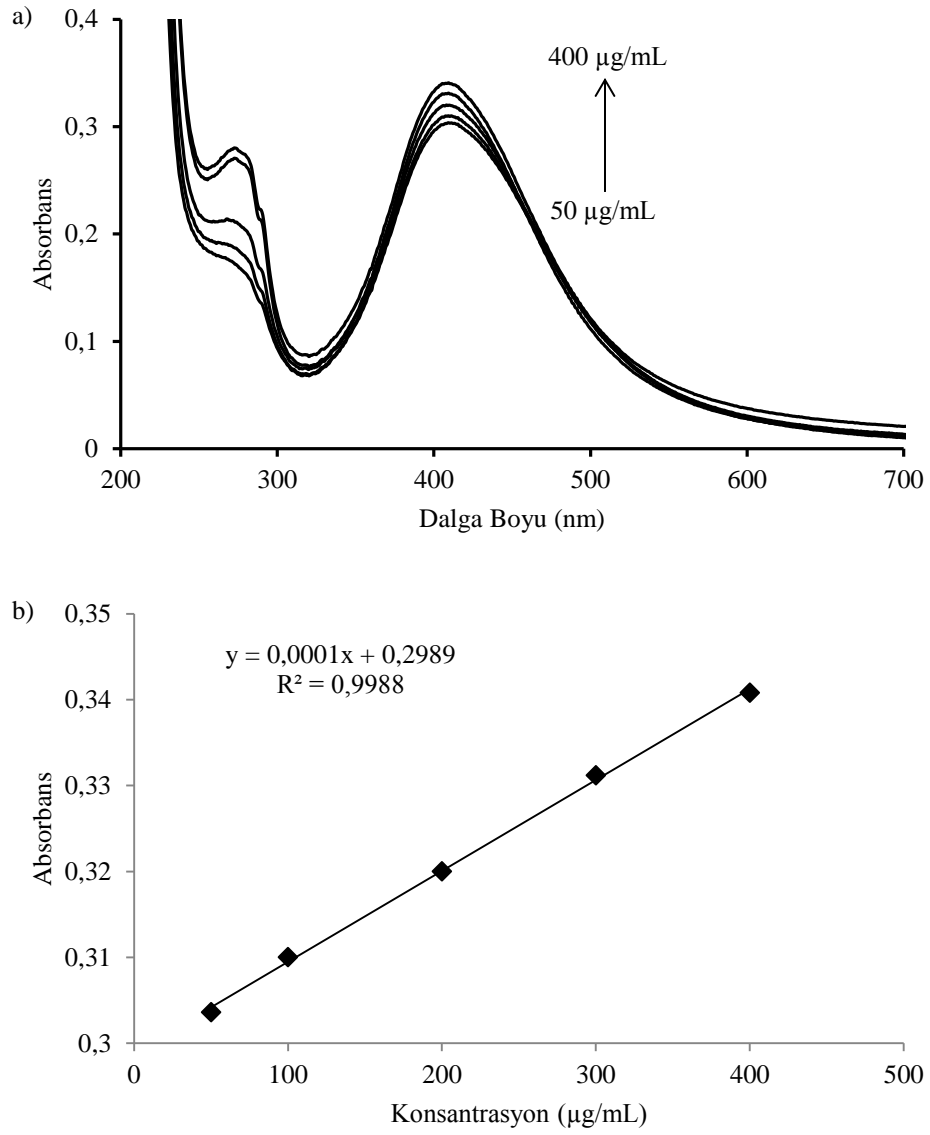
AgGSHCd²⁺ α LA, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve α LA, α LA, α LA ve Cd²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.123'de gösterilmektedir.



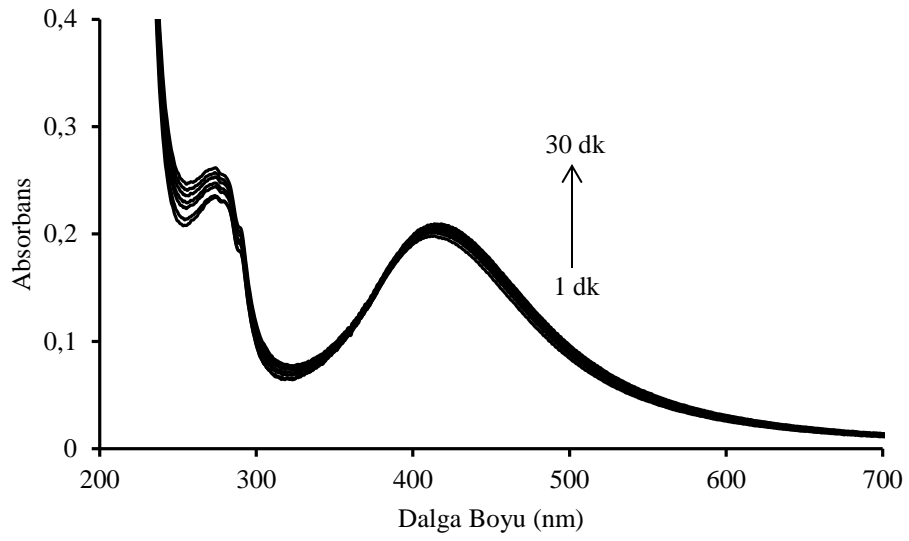
Şekil 4.123. AgGSHCd²⁺αLA, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve αLA, αLA, αLA ve Cd²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

Görünür bölgede AgGSH ve αLA çözelti karışımının absorpsiyon piki ile AgGSH'in absorpsiyon pikinin şiddeti arasında çok fazla bir fark görülmemiştir. UV bölgesinde ise 273,5 nm'de αLA'dan kaynaklanan pik oluşmuştur. AgGSH ile αLA arasında gerçekleşen etkileşim zayıftır. αLA ile αLA-Cd²⁺ spektrumları çakışmıştır. AgGSH ve Cd²⁺ iyonu çözeltilerinin karışım spektrumunda görülen genişlemiş pikin AgGSHCd²⁺αLA spektrumunda az da olsa daraldığı görülmektedir. AgGSHCd²⁺αLA çözeltisinin absorpsiyon maksimumu 409,5 nm'ya kaymıştır. AgGSHCd²⁺αLA çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,10'dur.

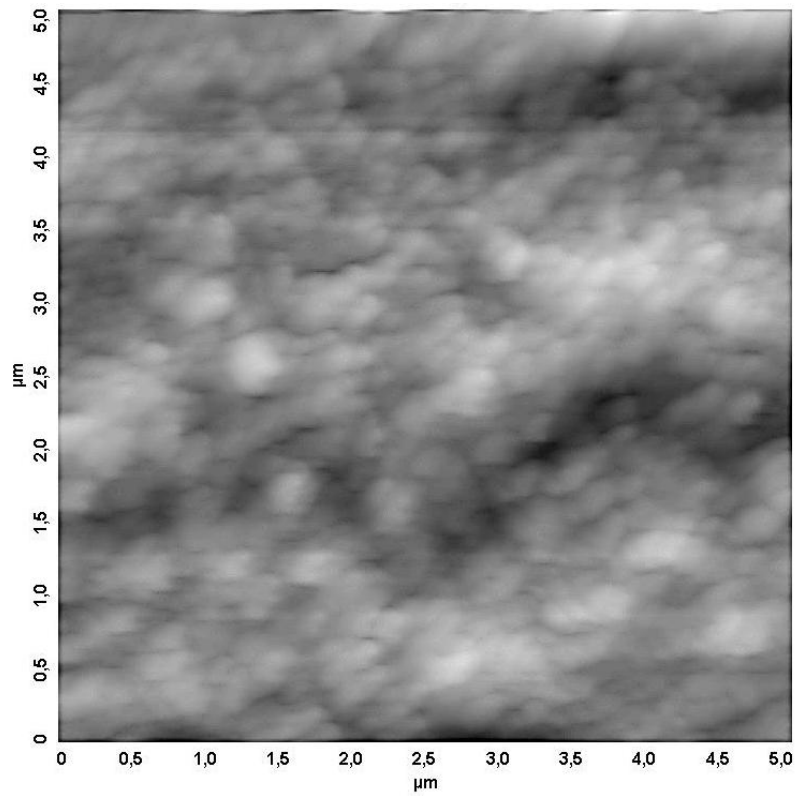
Şekil 4.124'deki kalibrasyon doğrusu, 409,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 50 – 400 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.125'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır. Kompleksleşmenin nispeten yavaş gerçekleştiği söylenebilir. AgGSHCd²⁺αLA kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.126'da gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.124. Cd^{2+} bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



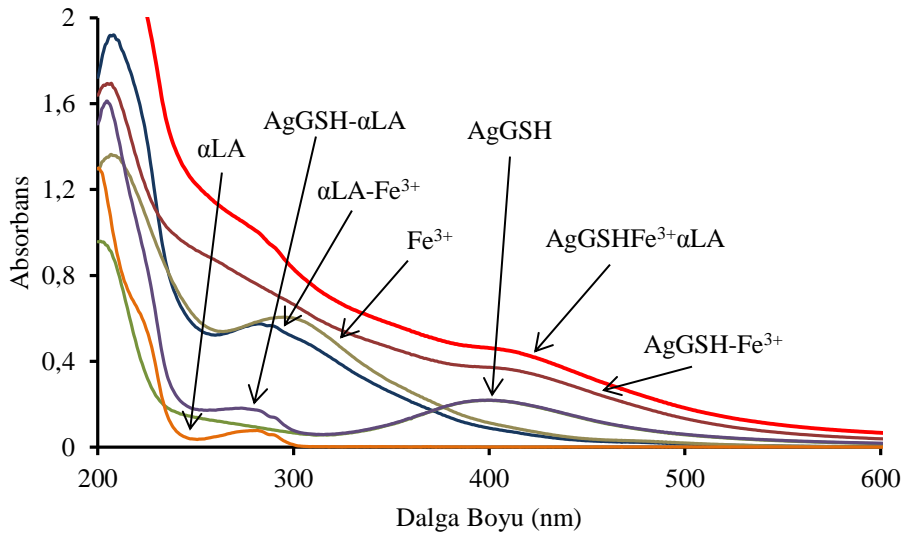
Şekil 4.125. Zamanla değişen AgGSHCd²⁺αLA absorbanları



Şekil 4.126. AgGSHCd²⁺αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

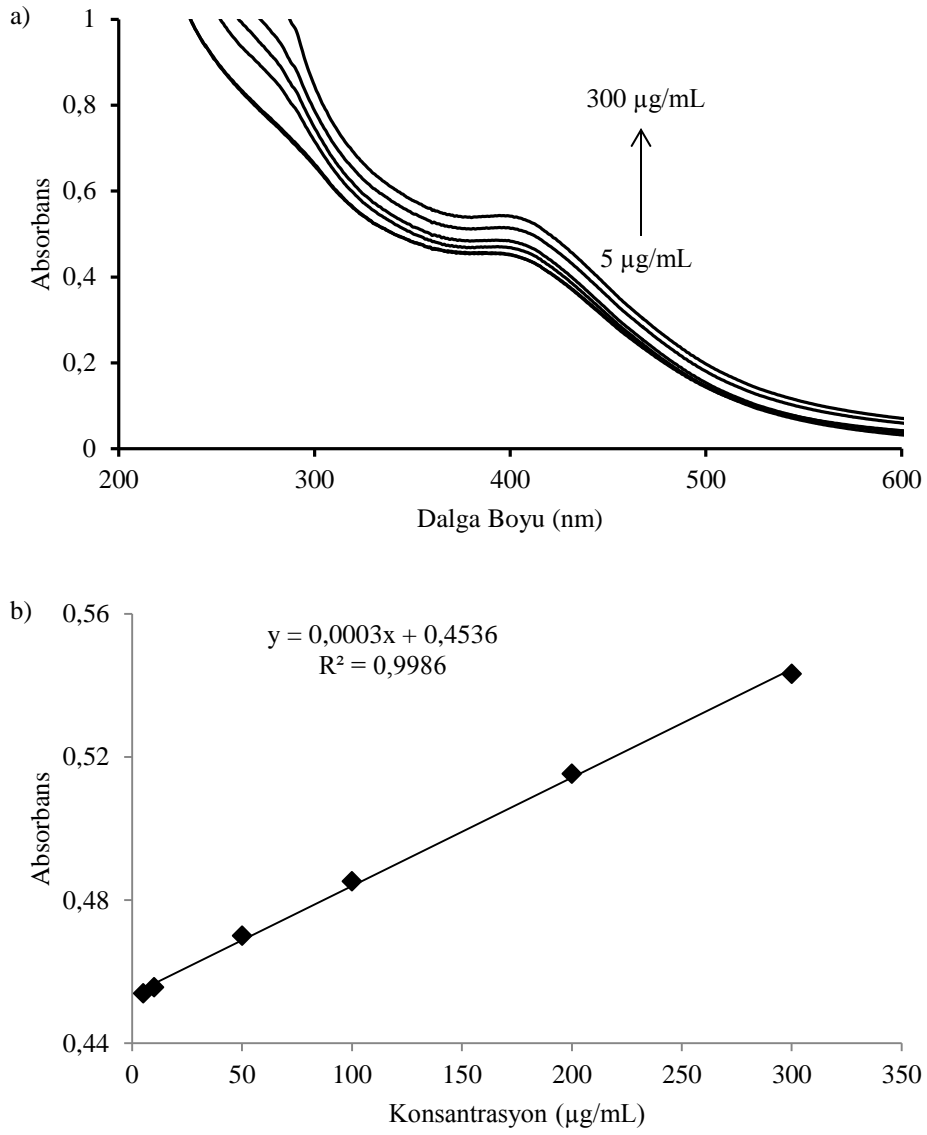
4.3.2.2. Fe³⁺ iyonu bulunan ortamda α -laktalbumin tayini

AgGSHFe³⁺ α LA, AgGSH, AgGSH ve Fe³⁺, AgGSH ve α LA, α LA, α LA ve Fe³⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.127'de gösterilmektedir. AgGSH ve Fe³⁺ iyon çözeltileri karışımının absorbans şiddetinin arttığı ve pikin genişlediği görülmektedir. Fe³⁺ iyon çözeltisinin spektrumunda, demirin oksitlenmesi nedeniyle 295 nm'de pik görülmüştür. α LA-Fe³⁺ spektrumunda ise 282,5 nm'de pik görülmüştür. α LA ile Fe³⁺ arasında gerçekleşen etkileşim, demirin oksitlenme oranını azaltmış ve pikin şiddeti düşmüştür. AgGSHFe³⁺ α LA çözelti absorbansı ise diğer tüm spektrumlardan daha fazla şiddette çıkmış olup 394,5 nm'de maksimum vermiştir. AgGSHFe³⁺ α LA çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,07'dir.

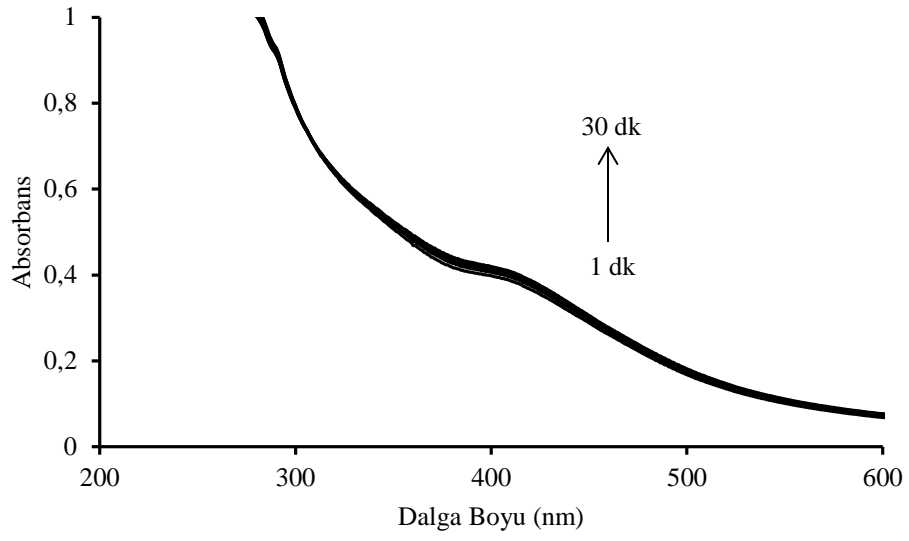


Şekil 4.127. AgGSHFe³⁺ α LA, AgGSH, AgGSH ve Fe³⁺, AgGSH ve α LA, α LA, α LA ve Fe³⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

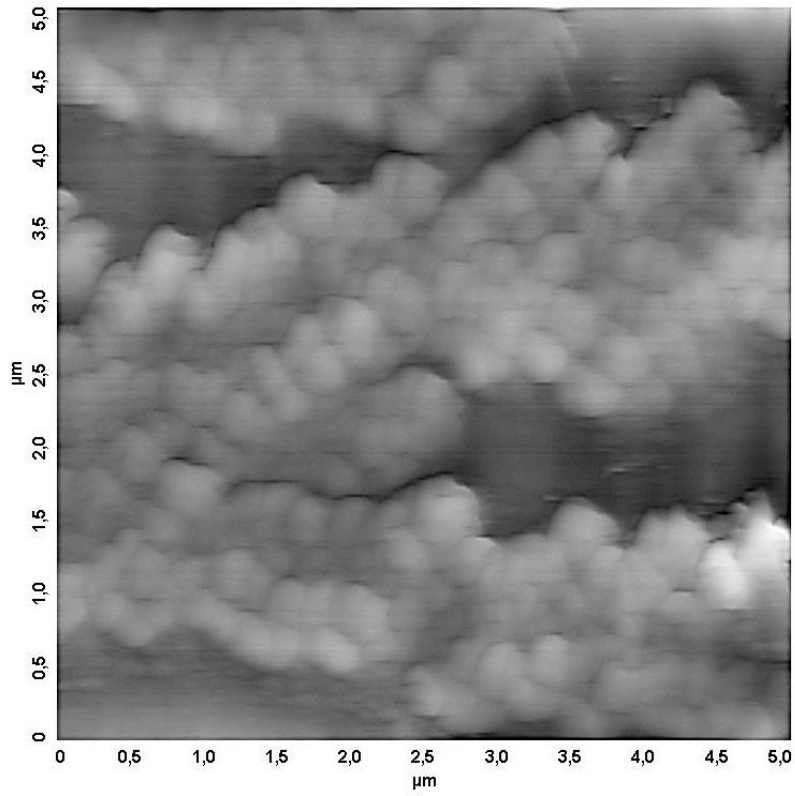
Şekil 4.128'deki kalibrasyon doğrusu, 394,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 5 – 300 μ g/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.129'da gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. AgGSHFe³⁺ α LA kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.130'da gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.128. Fe^{3+} bulunan ortamda artan α LA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



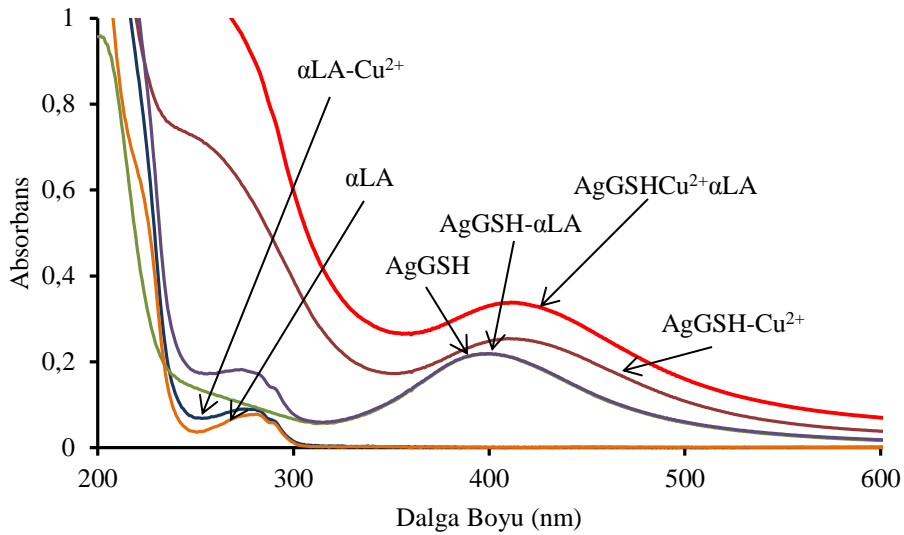
Şekil 4.129. Zamanla değişen AgGSHFe³⁺αLA absorbanları



Şekil 4.130. AgGSHFe³⁺αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 μm)

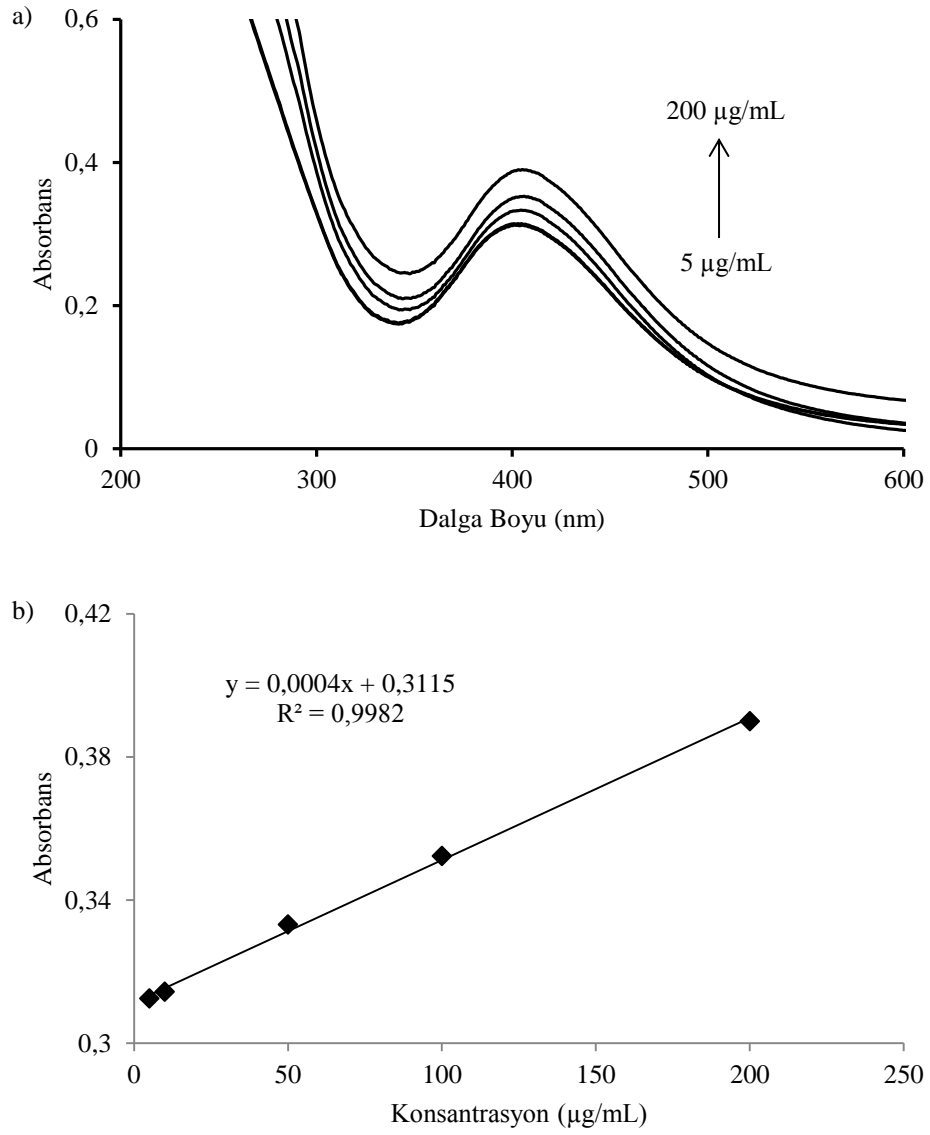
4.3.2.3. Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda α -laktalbumin tayini

$\text{AgGSHCu}^{2+}\alpha\text{LA}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve αLA , αLA , αLA ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.131'de gösterilmektedir. AgGSH-Cu^{2+} çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artmış ve maksimumda kayma gerçekleşmiştir. $\alpha\text{LA-Cu}^{2+}$ çözelti karışımının absorpsiyon şiddeti αLA 'dan az da olsa yüksek çıkmıştır. $\text{AgGSHCu}^{2+}\alpha\text{LA}$ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti diğer tüm spektrumlardan fazladır ve absorpsiyon maksimumu 405 nm'ye kaymıştır. $\text{AgGSHCu}^{2+}\alpha\text{LA}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,12'dir.

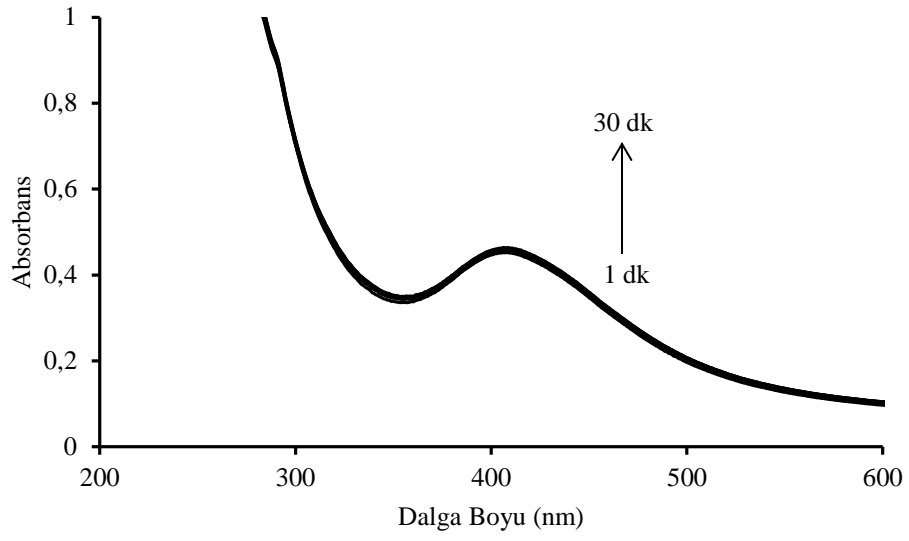


Şekil 4.131. $\text{AgGSHCu}^{2+}\alpha\text{LA}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve αLA , αLA , αLA ve Cu^{2+} çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

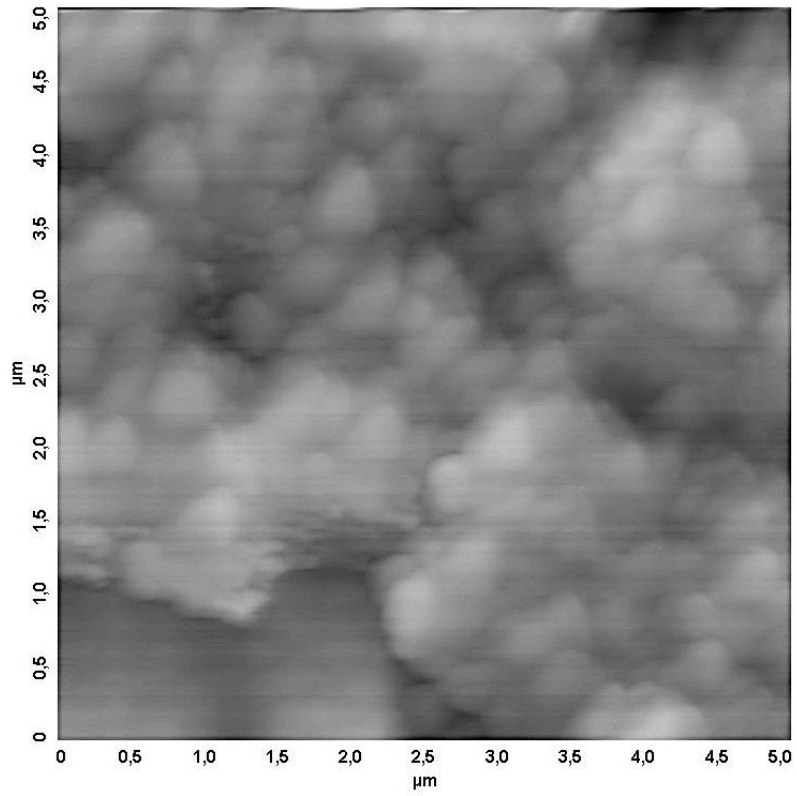
Kalibrasyon doğrusu oluşturmak için UV bölgedeki absorpsiyon farklarındansa görünür bölge tercih edilmiştir. Bunun nedeni UV bölgede girişim yapabilecek türler olan αLA ve $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$ 'in bulunmasıdır. Şekil 4.132'deki kalibrasyon doğrusu, 405 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 5 – 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyona etkisi Şekil 4.133'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.134'de gösterilen $\text{AgGSHCu}^{2+}\alpha\text{LA}$ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.132. Cu^{2+} bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



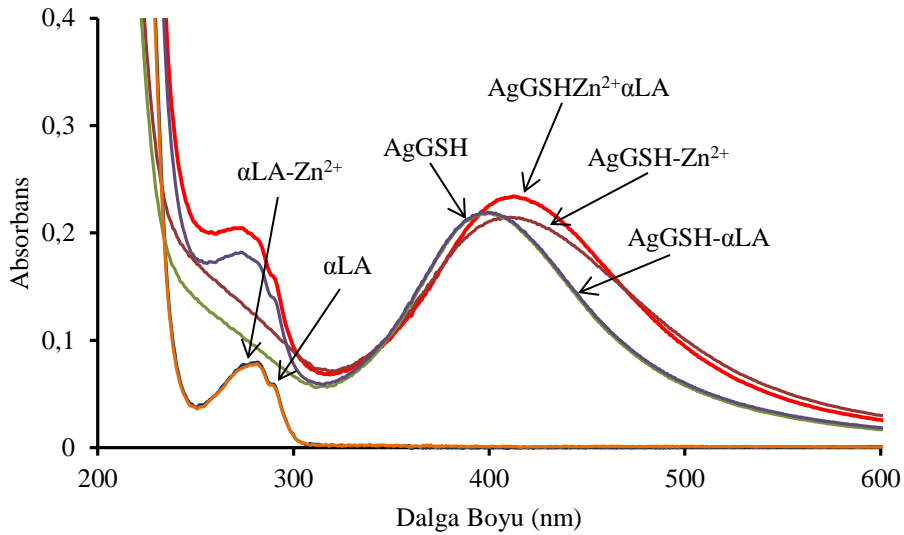
Şekil 4.133. Zamanla değişen AgGSHCu²⁺αLA absorbanları



Şekil 4.134. AgGSHCu²⁺αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

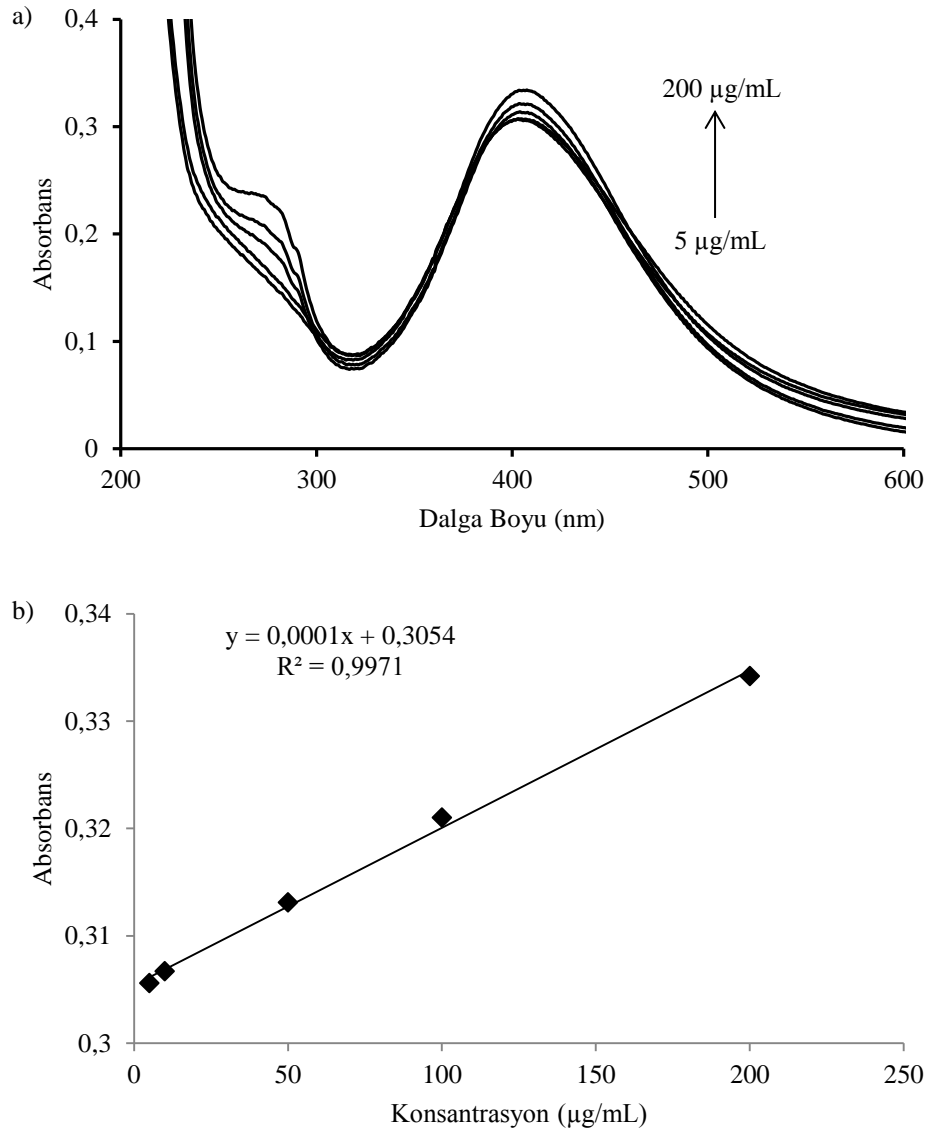
4.3.2.4. Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda α -laktalbumin tayini

AgGSHZn²⁺ α LA, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve α LA, α LA, α LA ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.135'de gösterilmektedir. AgGSH ve Zn²⁺ iyon çözelti karışımının spektrumunda absorpsiyon maksimumununun 400,5 nm'ye kaydığı ve pikin genişlediği görülmüştür. α LA-Zn²⁺ spektrumu α LA'nın spektrumu ile çakışmıştır. AgGSHZn²⁺ α LA çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artarak 407,5 nm'ye kaymıştır. AgGSHZn²⁺ α LA çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,58'dir.

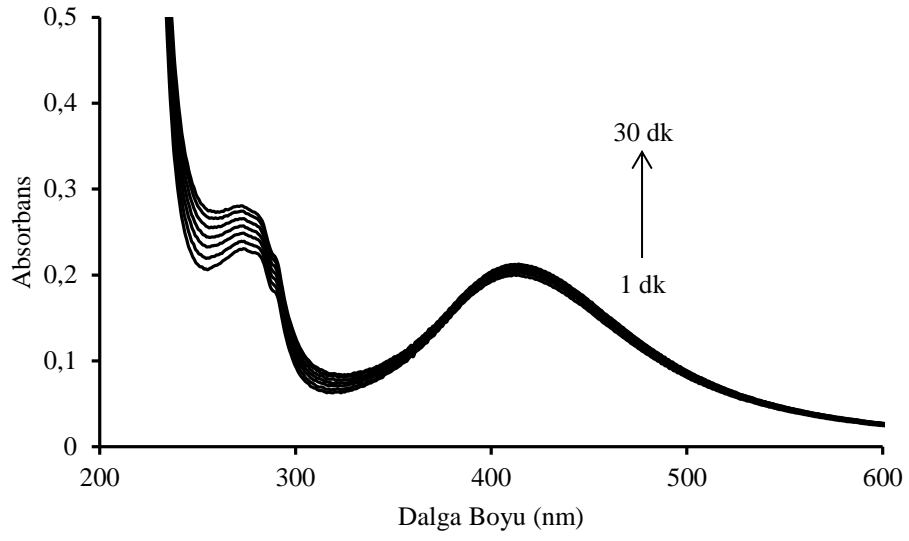


Şekil 4.135. AgGSHZn²⁺ α LA, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve α LA, α LA, α LA ve Zn²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

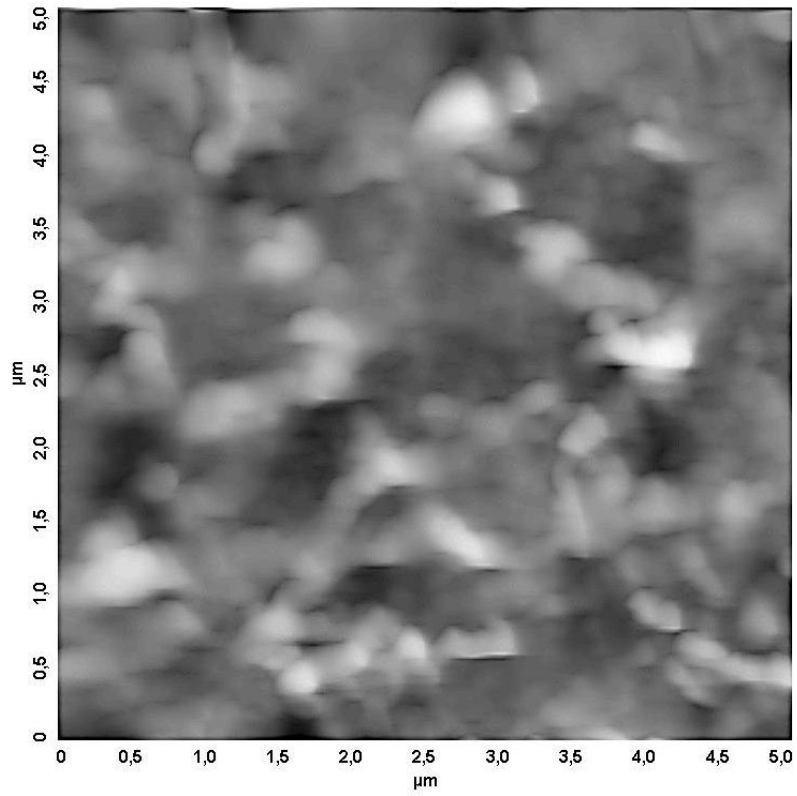
Şekil 4.136'daki kalibrasyon doğrusu, 407,5 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 5 – 200 μ g/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyona etkisi Şekil 4.137'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır. Kompleksleşmenin yavaş gerçekleştiği söylenebilir. AgGSHZn²⁺ α LA kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.138'de gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.136. Zn^{2+} bulunan ortamda artan αLA konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.137. Zamanla değişen AgGSHZn²⁺αLA absorbanları

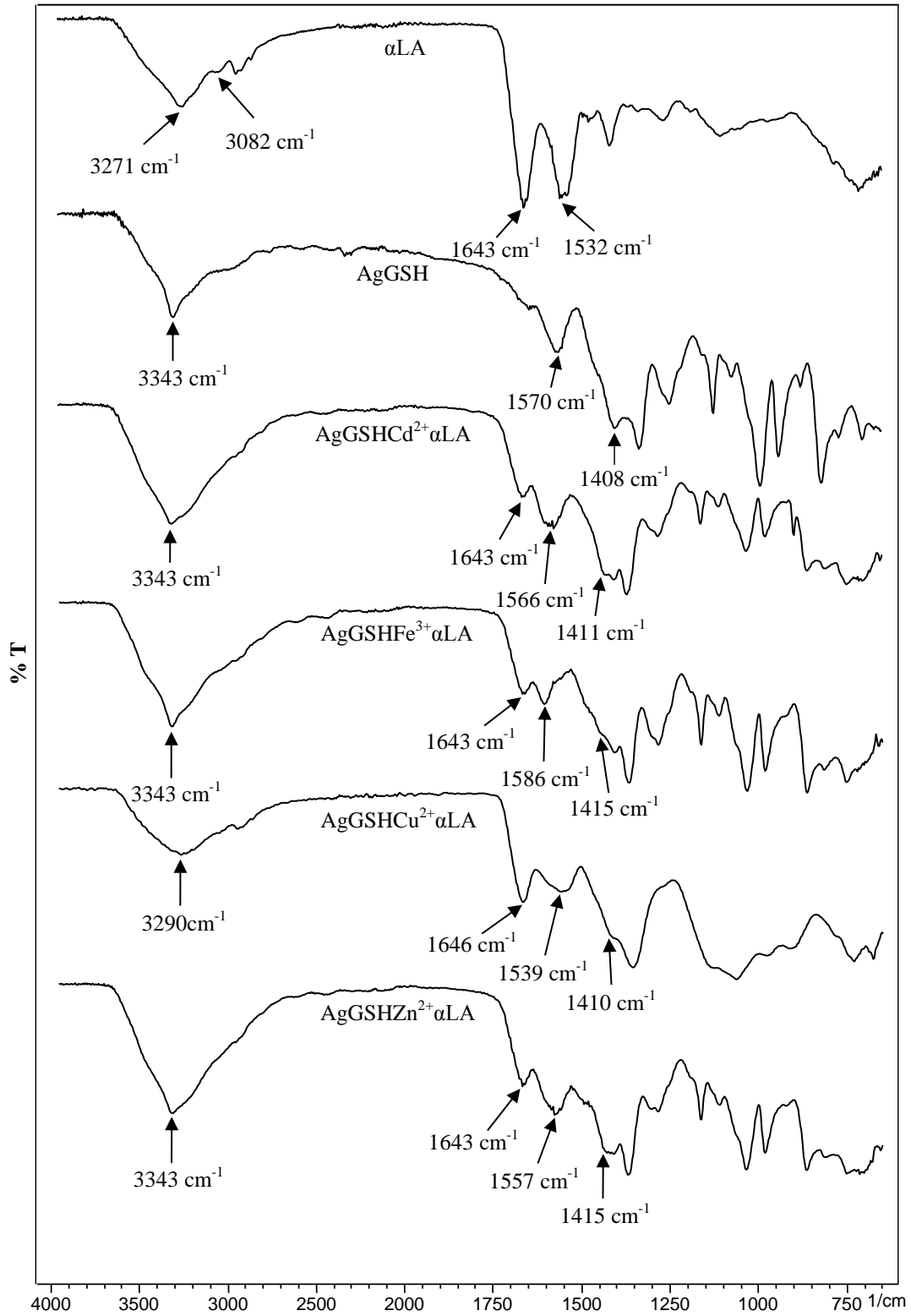


Şekil 4.138. AgGSHZn²⁺αLA yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.3.2.5. α -laktalbumin için alınan FTIR spektrumları

Şekil 4.139'da gösterilen α LA spektrumunda 3271 ve 3082 cm^{-1} 'de bulunan pikler –NH gerilme titreşimleri nedeniyle oluşan piklerdir. 1643 cm^{-1} 'de görülen pik –C=O gerilme titreşiminden oluşan amit I pikidir. 1532 cm^{-1} 'de görülen pik ise –NH eğilme ve –C-N gerilme titreşiminden kaynaklanan piklerin birleşmesi ile oluşmuştur. AgGSH spektrumunda $-\text{NH}_3^+$ grubundan kaynaklanan pikinin AgGSHCu²⁺ α LA dışındaki spektrumlarda herhangi bir kaymaya maruz kalmadan 3343 cm^{-1} 'de çıktığı görülmüştür. AgGSHCu²⁺ α LA spektrumunda ise bu pikin kaybolduğu sadece –OH'dan kaynaklanan pikin 3290 cm^{-1} 'de ortaya çıktığı görülmüştür. α LA yapısında bulunan amin titreşim pikleri ise kayarak bahsi geçen pik içine gömülmüştür. AgGSH'in $-\text{NH}_3^+$ grubunun AgGSHCu²⁺ α LA kompleksi dışında etkileşime katılmadığı, α LA yapısında bulunan amin gruplarının ise katıldığı görülmektedir. Amit I ve II pikleri AgGSHCd²⁺ α LA spektrumunda 1643 ve 1566 cm^{-1} , AgGSHFe³⁺ α LA spektrumunda 1649 ve 1539 cm^{-1} , AgGSHCu²⁺ α LA spektrumunda 1643 ve 1586 cm^{-1} , AgGSHZn²⁺ α LA spektrumunda 1643 ve 1557 cm^{-1} 'de çıkmıştır. Amit I pikinde kayda değer bir kayma gerçekleşmezken amit II pikinin tüm spektrumlarda kaydığı gözlenmiştir. Bu sonuç α LA'nın –NH grupları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1408 cm^{-1} 'de görülen karboksilat pikinin AgGSHCd²⁺ α LA spektrumunda 1511 cm^{-1} , AgGSHFe³⁺ α LA spektrumunda 1515 cm^{-1} , AgGSHCu²⁺ α LA spektrumunda 1510 cm^{-1} , AgGSHZn²⁺ α LA spektrumunda 1515 cm^{-1} 'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1570 cm^{-1} 'de bulunan asimetric karboksilat piki ise kayarak amit pikleri ile örtüşmüştür. AgGSH'in karboksilat gruplarının da etkileşime katıldığı görülmektedir.

α LA nötral pH'larda (pH 6-8) normal yapı (N yapısı), asidik pH'larda (pH 2-4) ise asit denatüre yapısı (A yapısı) halinde bulunmaktadır. Bir de bu iki durum arasında eriyik kürecik (molten globule, MG yapısı) yapısında olduğu belirtilmektedir. Normal formunda bulunan α LA'nın alfa sarmal yapısı beta tabaka yapısına göre baskın halde bulunmaktadır [500-502]. Elde edilen komplekslerin tümünün pH aralığı 7,07 – 8,10 olduğu için meydana gelen etkileşimlerin α LA'nın normal konformasyonu ile oluştuğu söylenebilir.



Şekil 4.139. α LA, AgGSH, AgGSH-metal iyonu- α LA yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

4.4. Enzim Tayinleri

Bu bölümde değişik metal iyonları bulunan ortamlarda tayinleri gerçekleştirilen kreatin kinaz, tripsin ve lizozim enzimlerinin tayin sınırları, FTIR spektrumları ve AFM görüntüleri tartışılacaktır.

4.4.1. Kreatin kinaz tayini

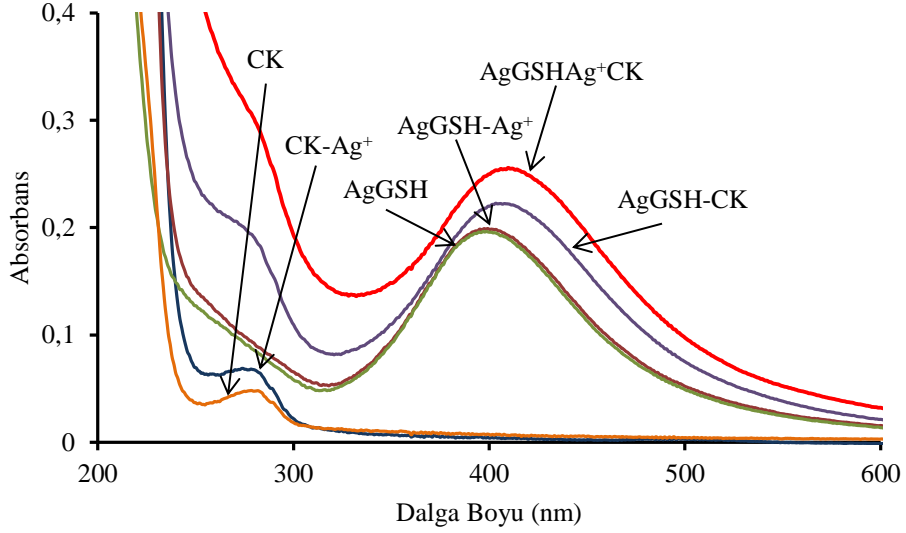
Kreatin kinaz tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları bölümün sonunda toplu bir şekilde verilecektir. Spektrumların yorumlanmasında literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [503, 504].

4.4.1.1. Ag^+ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini

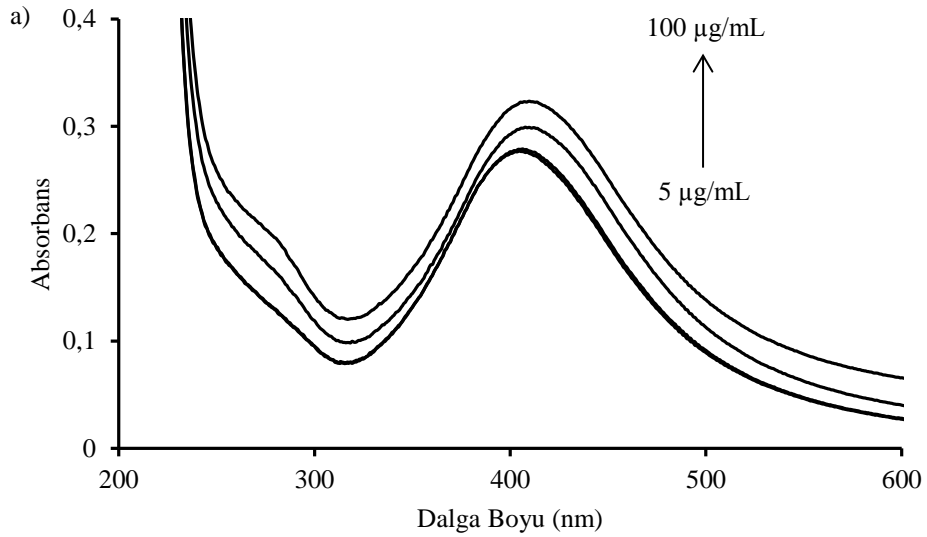
$AgGSHAg^+CK$, $AgGSH$, $AgGSH$ ve Ag^+ , $AgGSH$ ve CK , CK , CK ve Ag^+ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.140'da gösterilmektedir. $AgGSH$ ve CK çözelti karışımının absorpsiyon şiddeti artarak 403,5 nm'ye kaymıştır. Absorpsiyon şiddetinde azalmanın değil de artmanın baskın olması, CK 'nın gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminin, bağlı GSH molekülleri ile etkileşiminden daha zayıf olduğunu göstermektedir. $CK-Ag^+$ spektrumunun absorpsiyon şiddeti etkileşimden dolayı CK 'dan (278,5 nm) fazla çıkmıştır. $AgGSH$ ve Ag^+ etkileşimi ise absorpsiyon şiddetini az da olsa arttırmıştır. $AgGSHAg^+LA$ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti diğer spektrumlardan fazla çıkmış ve 410,5 nm'ye kaymıştır. $AgGSHAg^+CK$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,30'dur.

Şekil 4.141'deki kalibrasyon doğrusu, 410,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 5 – 100 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. CK konsantrasyonu arttıkça kompleksleşme miktarının artmasından dolayı absorpsiyon maksimumu hafifçe kırmızıya kayma göstermiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.142'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. $AgGSHAg^+CK$

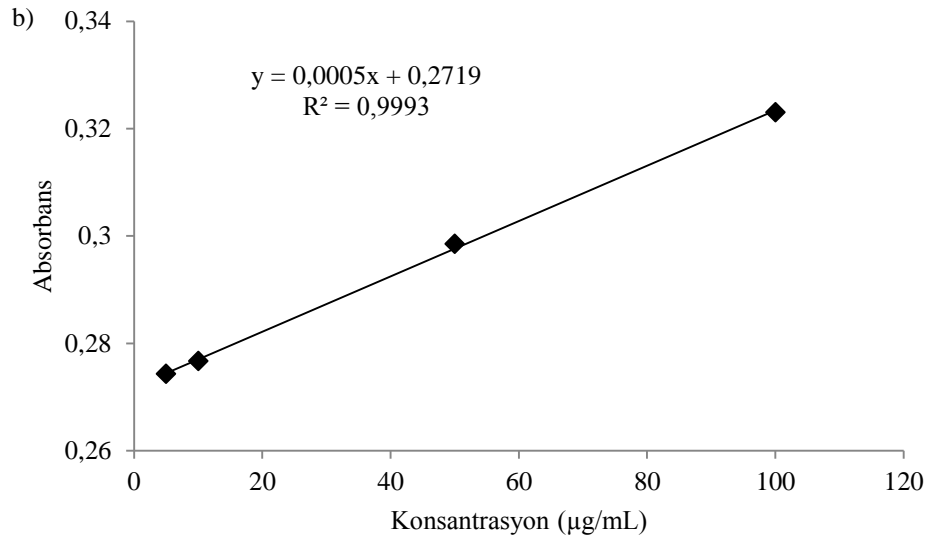
kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.143’de gösterilmiştir. Agregasyon sonucu oluşan yapıların yanında kompleksleşmeye katılmamış taneciklerin de var olduğu görülmektedir.



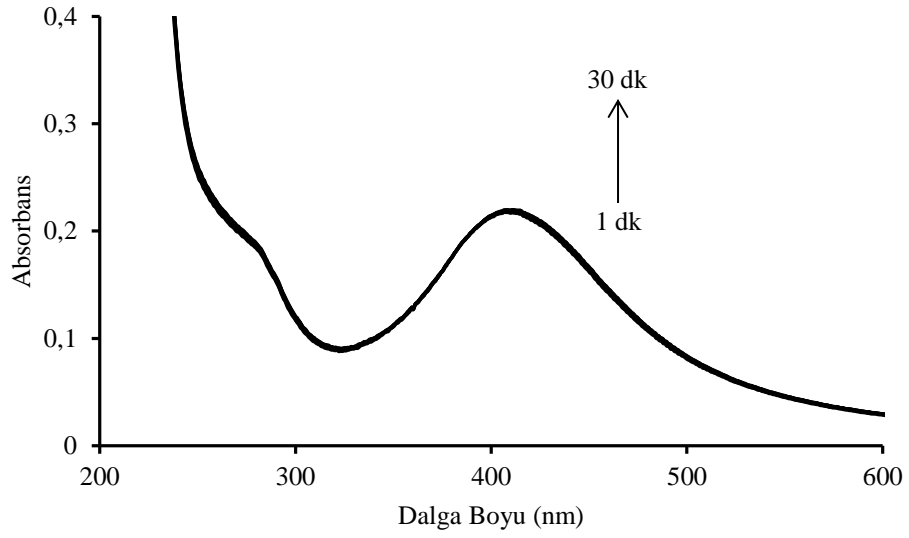
Şekil 4.140. $\text{AgGSHAg}^+\text{CK}$, AgGSH , AgGSH ve Ag^+ , AgGSH ve CK , CK , CK ve Ag^+ çözeltileri karışımlarının absorpsiyon spektrumları



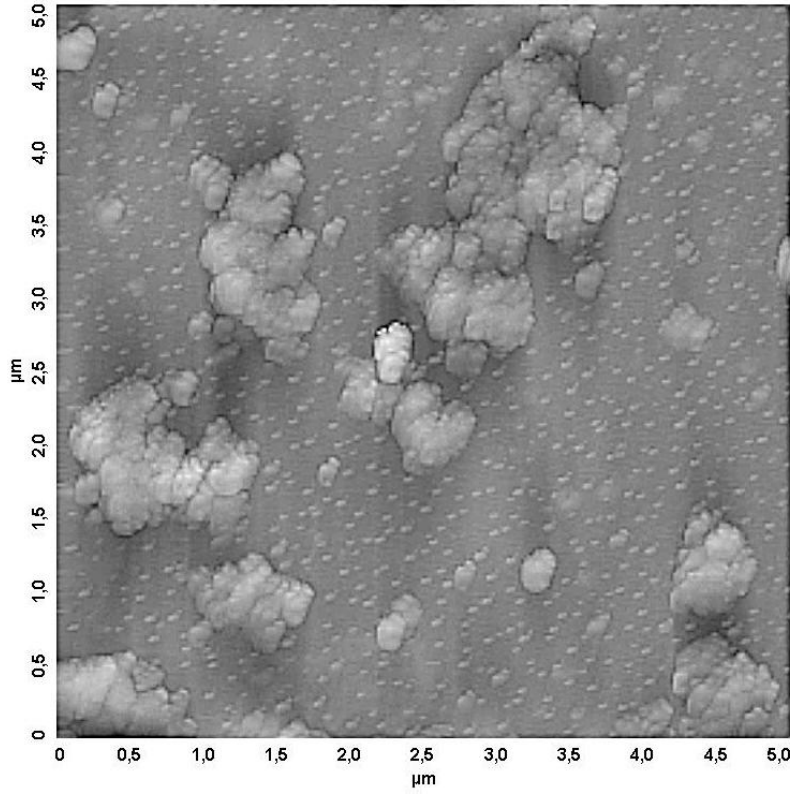
Şekil 4.141. Ag^+ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.141(Devam). Ag^+ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.142. Zamanla değişen $\text{AgGSHAg}^+\text{CK}$ absorbansları



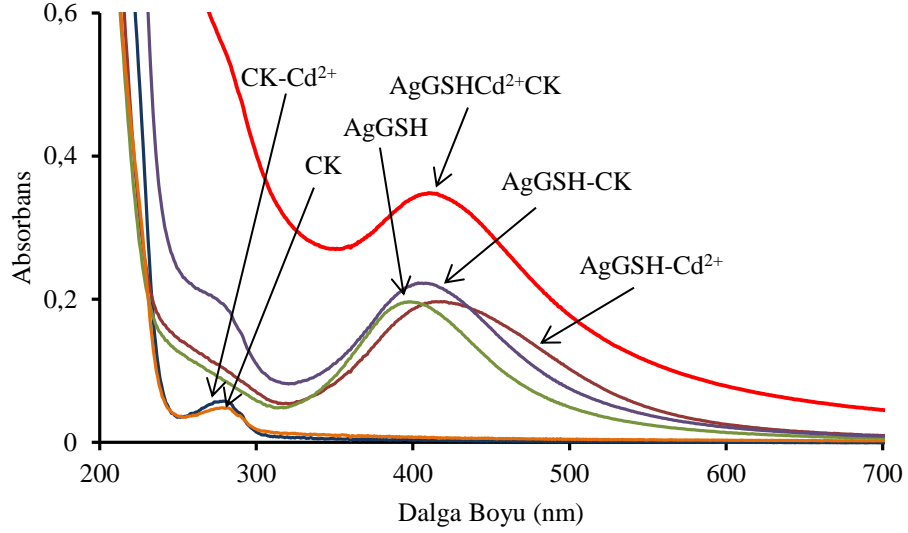
Şekil 4.143. AgGSHAg⁺CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.1.2. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini

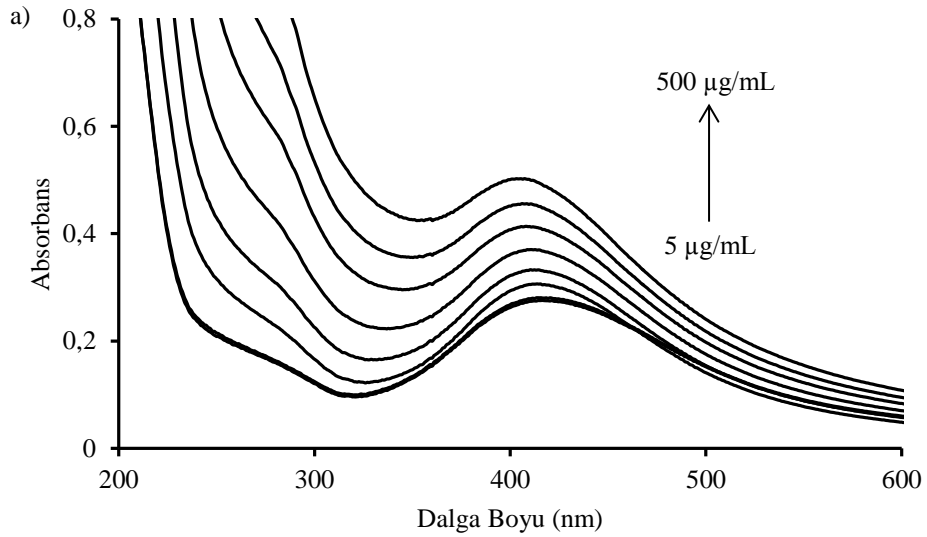
AgGSHCd²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Cd²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.144'de gösterilmektedir. AgGSH ve Cd²⁺ iyon çözeltisi karışımının absorbans spektrumunun genişlediği görülmektedir. CK-Cd²⁺ spektrumunun absorpsiyon şiddeti CK'dan az da olsa fazla çıkmıştır. AgGSHCd²⁺CK çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artarak 407,5 nm'de çıkmıştır. AgGSHCd²⁺CK çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,93'dür.

Şekil 4.145'deki kalibrasyon doğrusu, 407,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 5 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. CK konsantrasyonu arttıkça AgGSH ve Cd²⁺ arasındaki etkileşim oranı ve dolayısıyla pik genişlemesi azalmaktadır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.146'da gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması

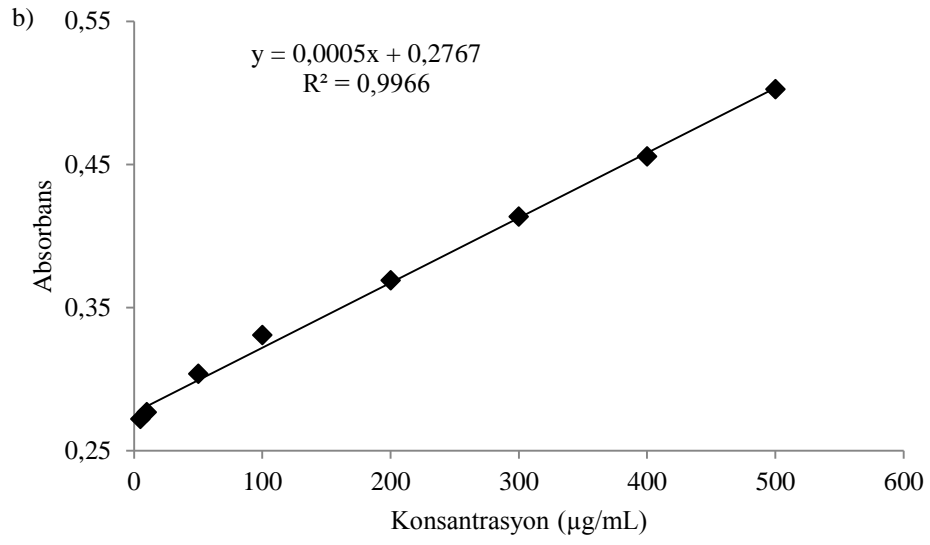
nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır. AgGSHCd²⁺CK kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.147'de gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak büyüdüğü görülmektedir.



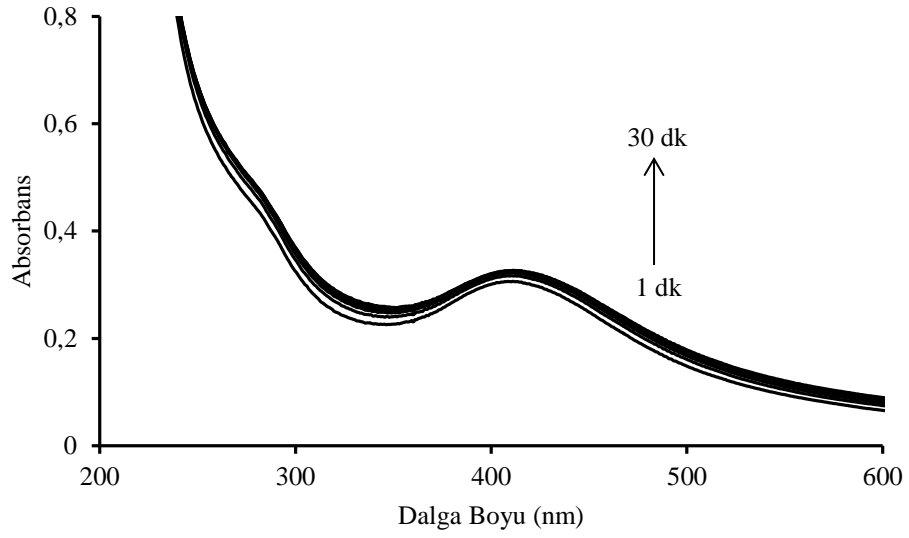
Şekil 4.144. AgGSHCd²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Cd²⁺ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



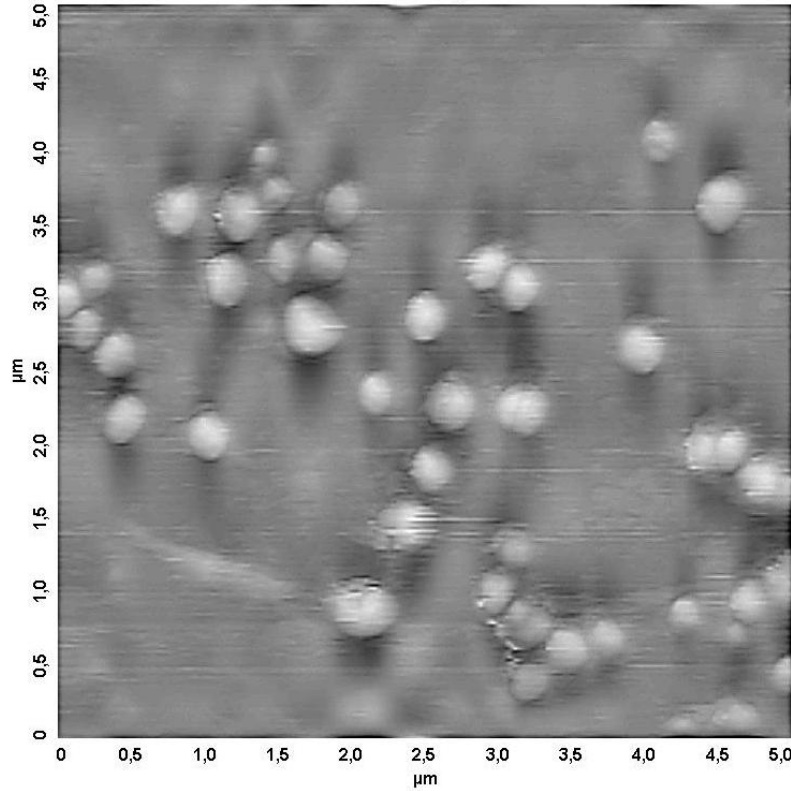
Şekil 4.145. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.145(Devam). Cd^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.146. Zamanla değişen $\text{AgGSHCd}^{2+}\text{CK}$ absorbansları



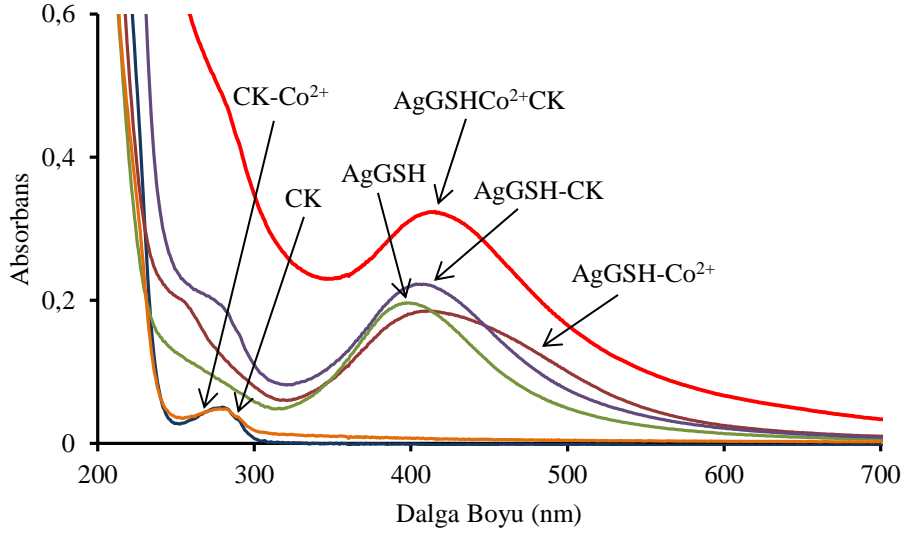
Şekil 4.147. AgGSHCo²⁺CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.1.3. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini

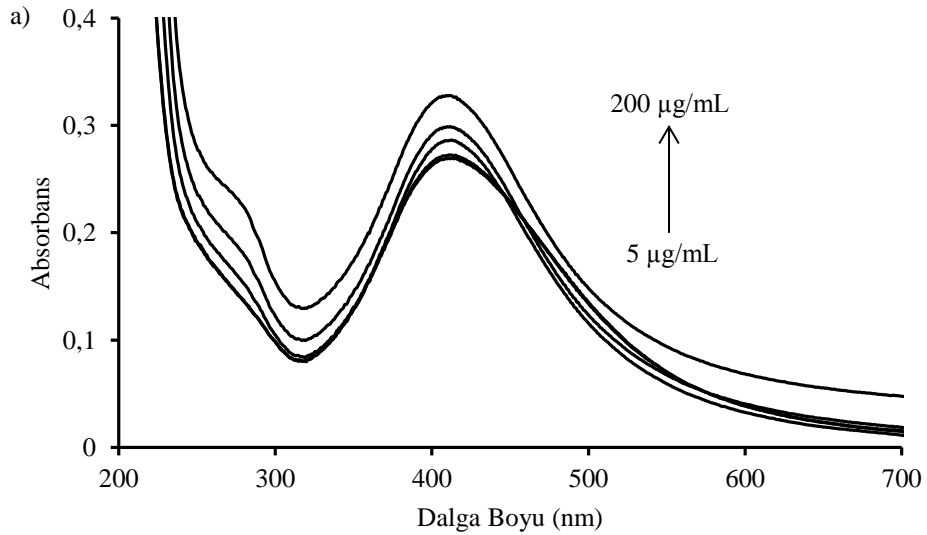
AgGSHCo²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Co²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.148’de gösterilmektedir. AgGSH ve Co²⁺ iyonu çözelti karışımının absorpsiyon piki genişlemiştir. CK ve CK-Co²⁺ spektrumları çakışmıştır. AgGSHCo²⁺CK çözeltisinin absorpsiyon pik şiddeti artarak 408 nm’ye kaymıştır. AgGSHCo²⁺CK çözeltisinin ölçülen pH’ı 8,18’dir.

Şekil 4.149’daki kalibrasyon doğrusu, 408 nm’deki absorbans değişimlerinin 5 – 200 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. CK konsantrasyonu arttıkça üçlü etkileşim miktarının artması ile AgGSH ve Co²⁺ arasındaki etkileşim nedeniyle oluşan pik genişlemesi azalmaktadır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.150’de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır.

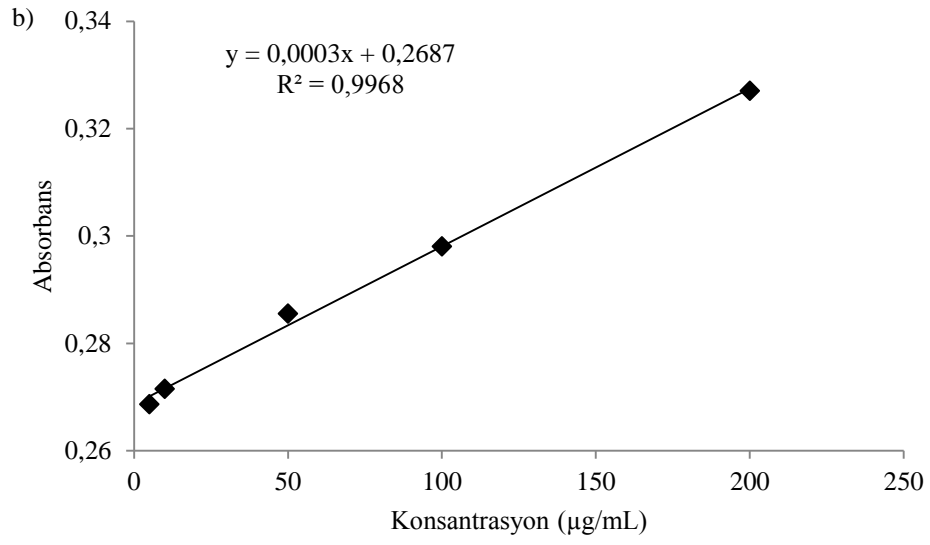
Kompleksleşme reaksiyonunun yavaş gerçekleştiği söylenebilir. Absorpsiyon şiddeti 10 dk geçtikten sonra yavaş yavaş dengeye gelmektedir. Şekil 4.151'de gösterilen $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{CK}$ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülmektedir.



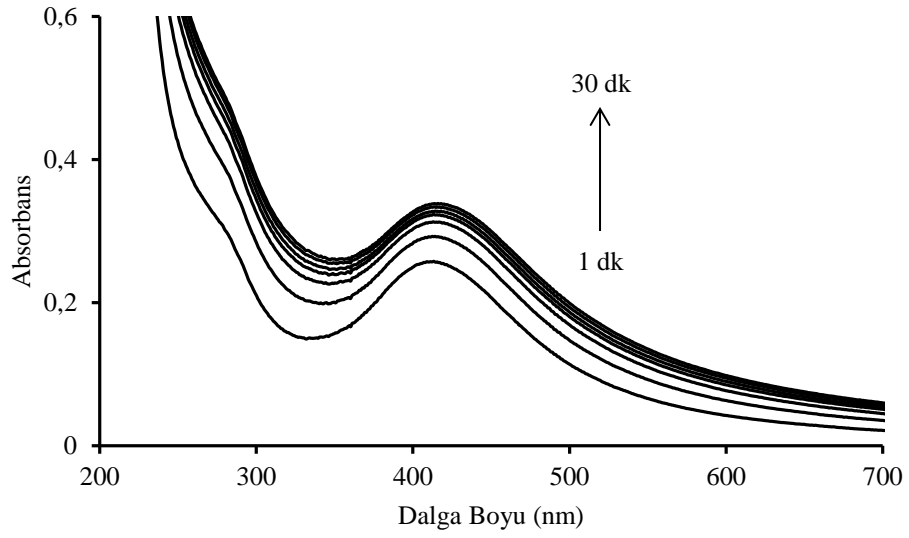
Şekil 4.148. $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{CK}$, AgGSH , AgGSH ve Co^{2+} , AgGSH ve CK , CK , CK ve Co^{2+} çözeltileri karışımlarının absorpsiyon spektrumları



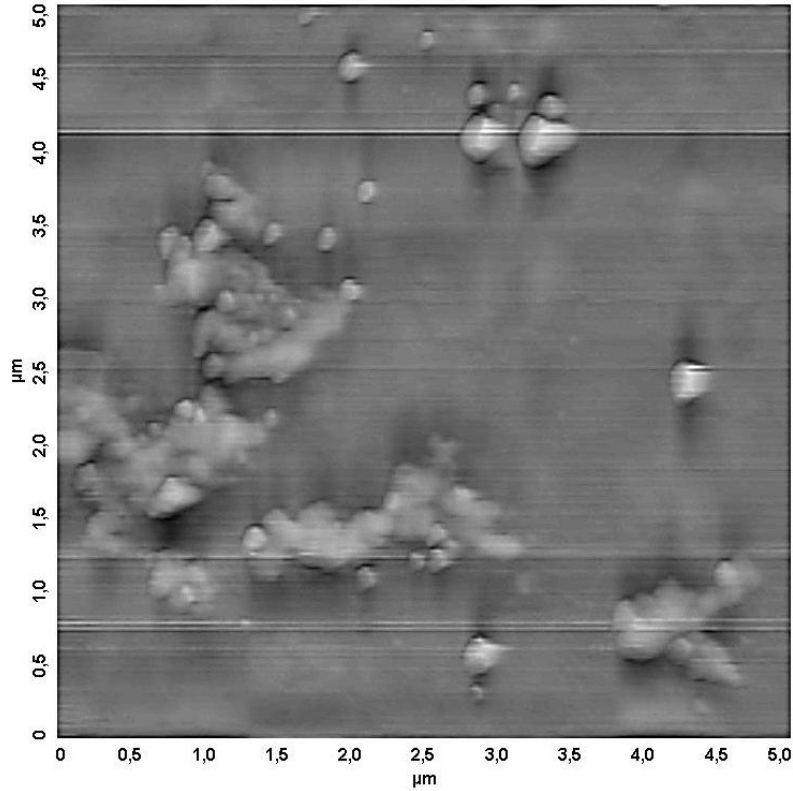
Şekil 4.149. Co^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.149(Devam). Co^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.150. Zamanla değişen $\text{AgGSHCo}^{2+}\text{CK}$ absorbansları



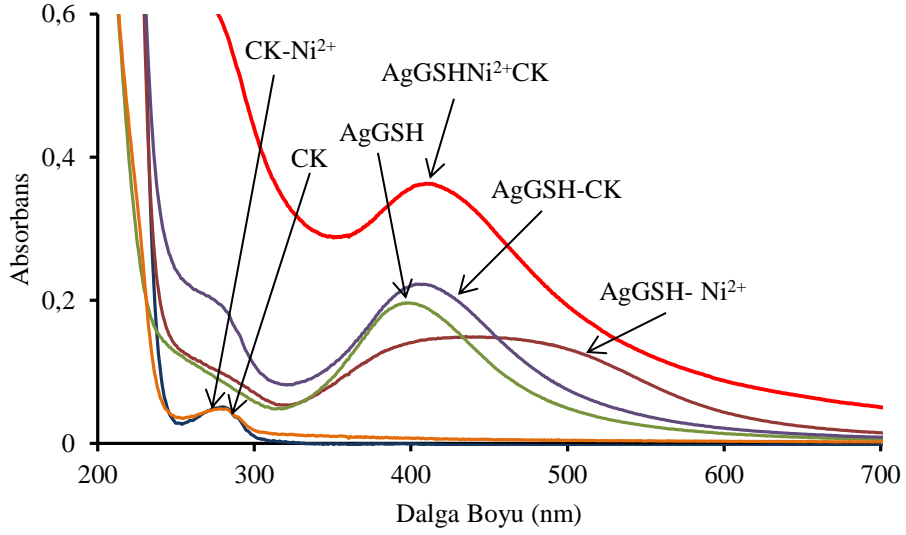
Şekil 4.151. AgGSHCo²⁺CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.1.4. Ni²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini

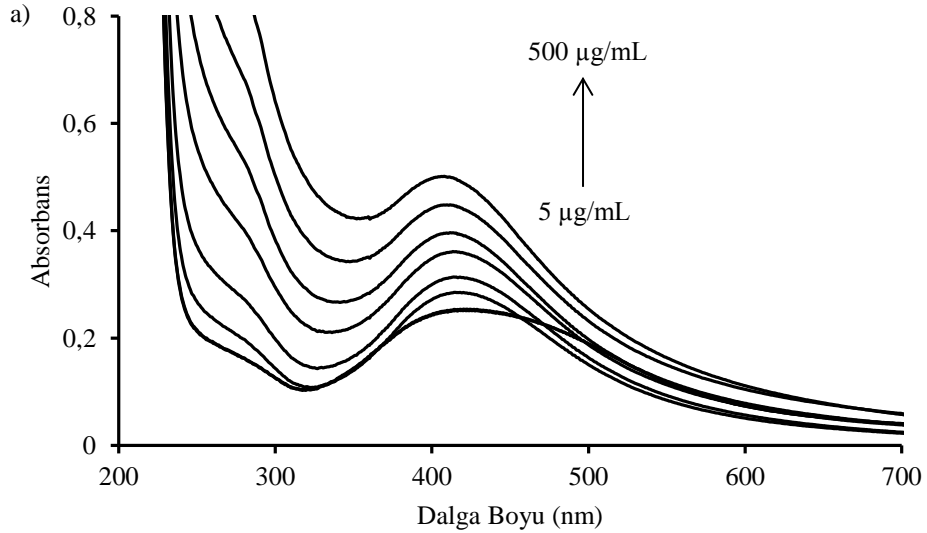
AgGSHNi²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Ni²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.152’de gösterilmektedir. AgGSH ve Ni²⁺ iyon çözelti karışımının absorpsiyon piki genişlemiştir. CK ve CK-Ni²⁺ spektrumları çakışmıştır. AgGSHNi²⁺CK çözeltisinin absorpsiyon pik şiddeti artarak 411,5 nm’ye kaymıştır. AgGSHNi²⁺CK çözeltisinin ölçülen pH’ı 8,05’dir.

Şekil 4.153’deki kalibrasyon doğrusu, 411,5 nm’deki absorbans değişimlerinin 5 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Co²⁺ ve Cd²⁺ denemelerinde olduğu gibi CK konsantrasyonu arttıkça AgGSH-Ni²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi azalmaktadır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.154’de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti artmıştır. Kompleksleşme

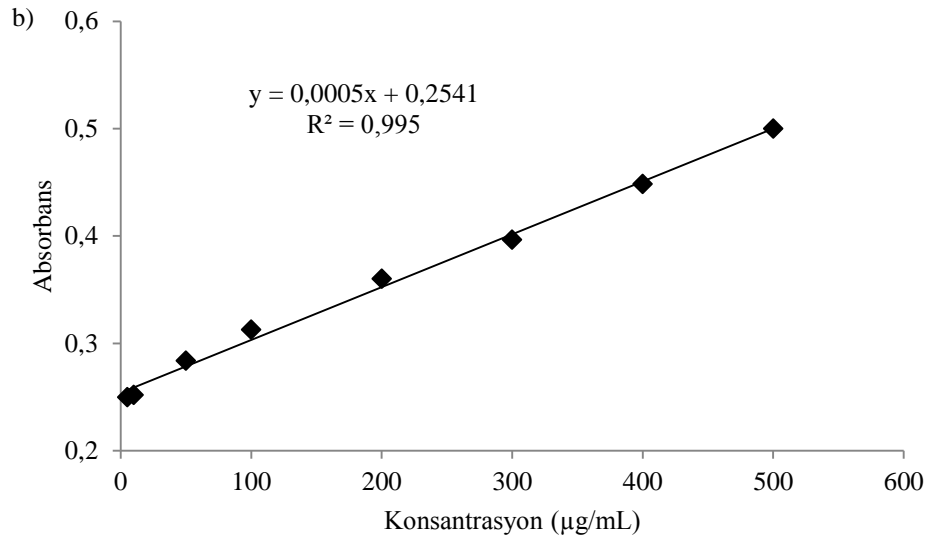
reaksiyonunun yavaş gerçekleştiği söylenebilir. Absorpsiyon şiddetinin artış ivmesi 10 dk geçtikten sonra yavaşlamaya başlamıştır. Şekil 4.155’de gösterilen $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{CK}$ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülmektedir.



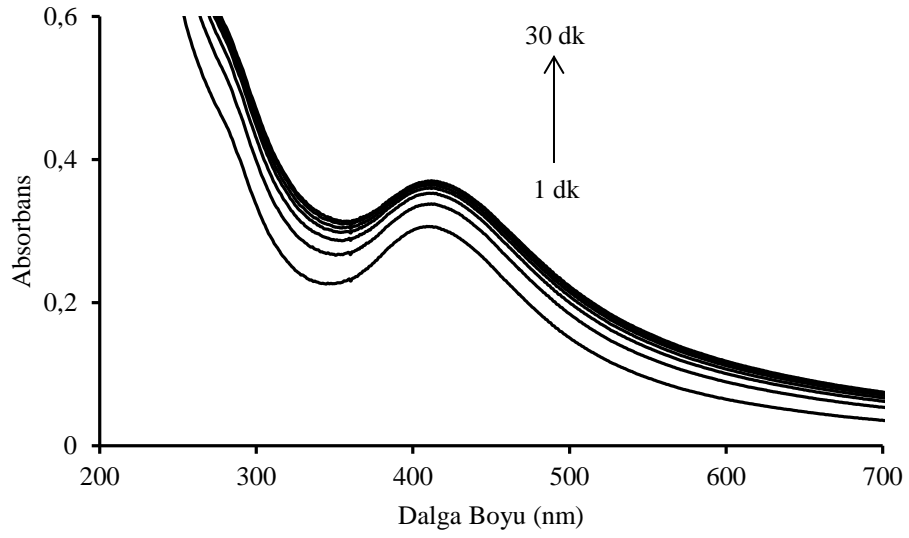
Şekil 4.152. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{CK}$, AgGSH , AgGSH ve Ni^{2+} , AgGSH ve CK , CK , CK ve Ni^{2+} çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



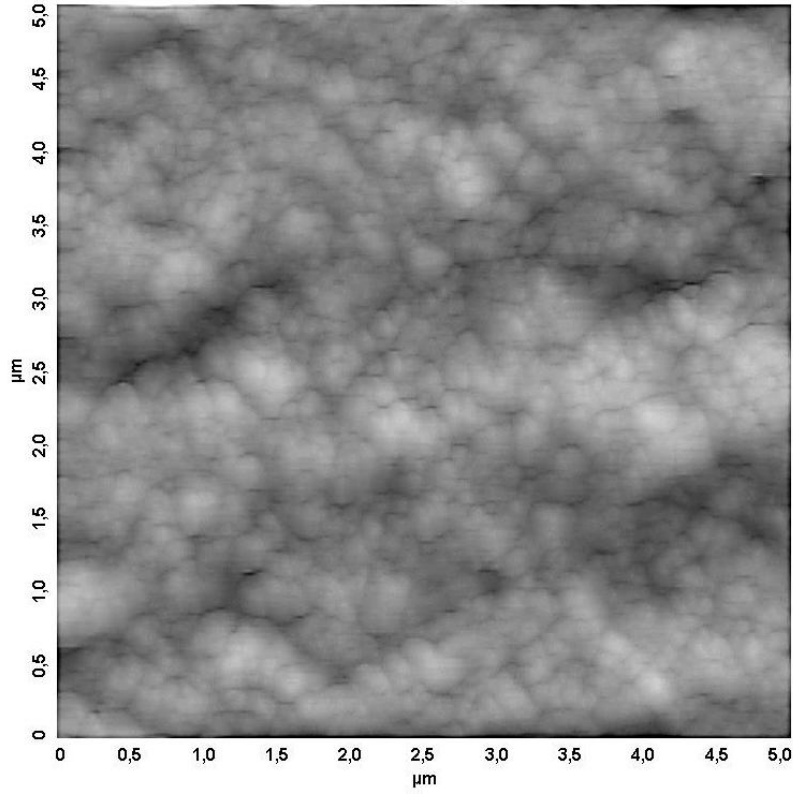
Şekil 4.153. Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.153(Devam). Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.154. Zamanla değişen $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{CK}$ absorbansları



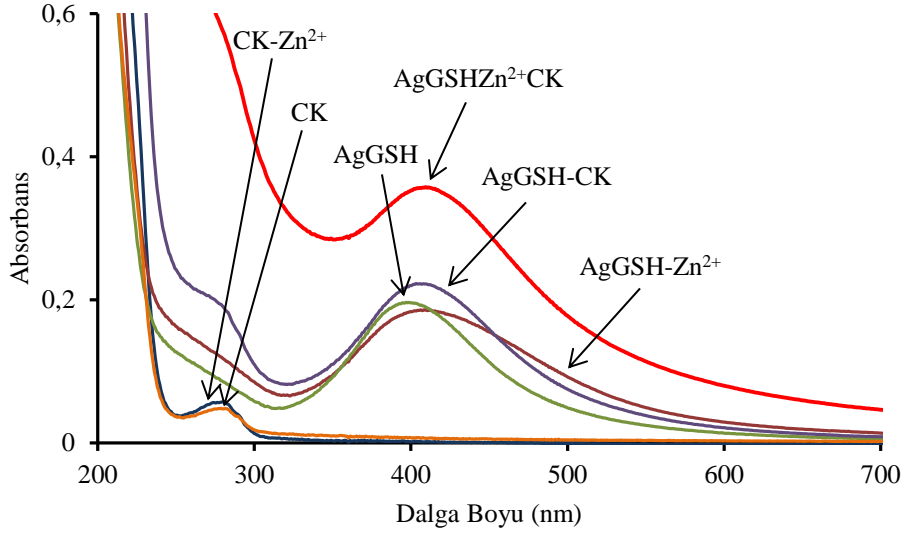
Şekil 4.155. AgGSHNi²⁺CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 μm)

4.4.1.5. Zn²⁺ iyonu bulunan ortamda kreatin kinaz tayini

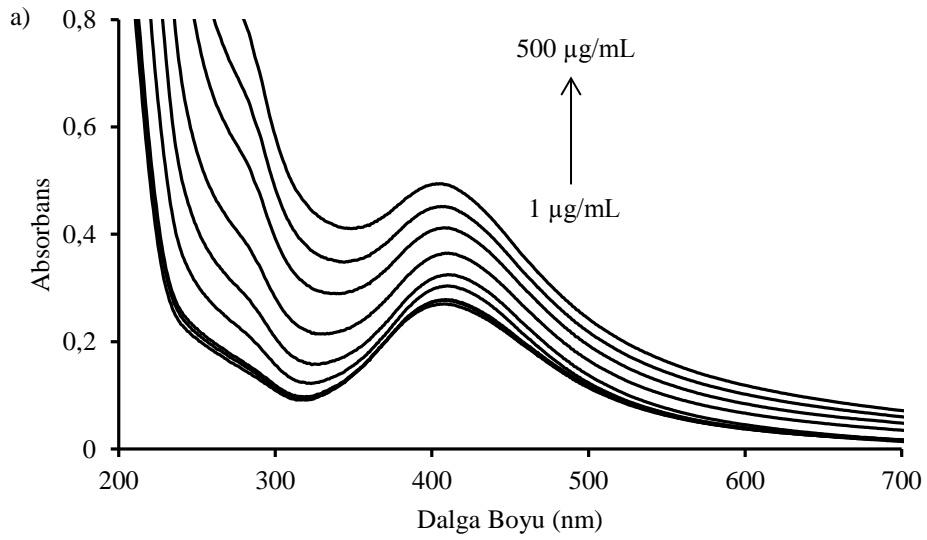
AgGSHZn²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.156'da gösterilmektedir. AgGSH ve Zn²⁺ iyon çözelti karışımlarının absorbans piki genişlemiştir. CK-Zn²⁺ spektrumunun absorpsiyon pikinin şiddeti CK'dan az da olsa fazla çıkmıştır. AgGSHZn²⁺CK çözeltisinin absorpsiyon pikinin şiddeti artarak 406 nm'ye kaymıştır. AgGSHZn²⁺CK çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,58'dir.

Şekil 4.157'deki kalibrasyon doğrusu, 406 nm'deki absorbans değişimlerinin 1 – 500 μg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.157). Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.158'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. AgGSHZn²⁺CK kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil

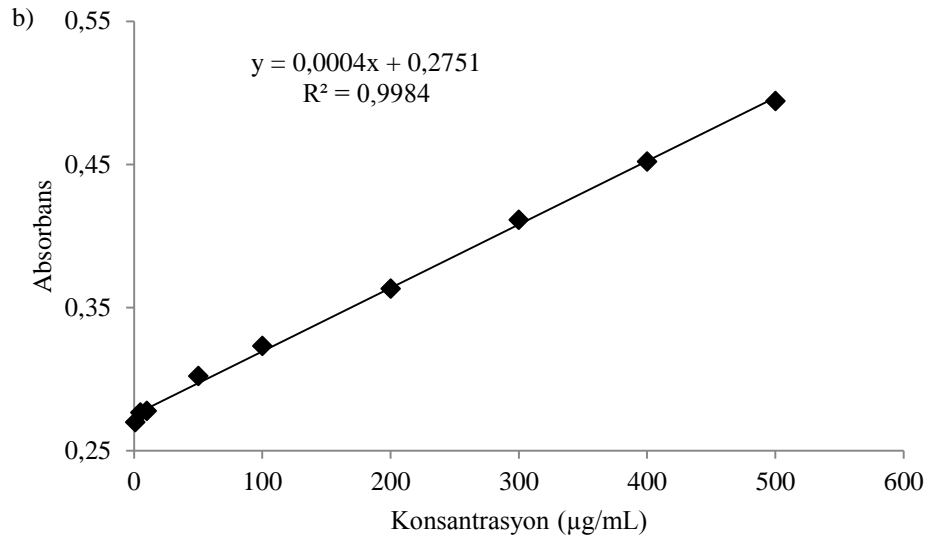
4.159’da gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



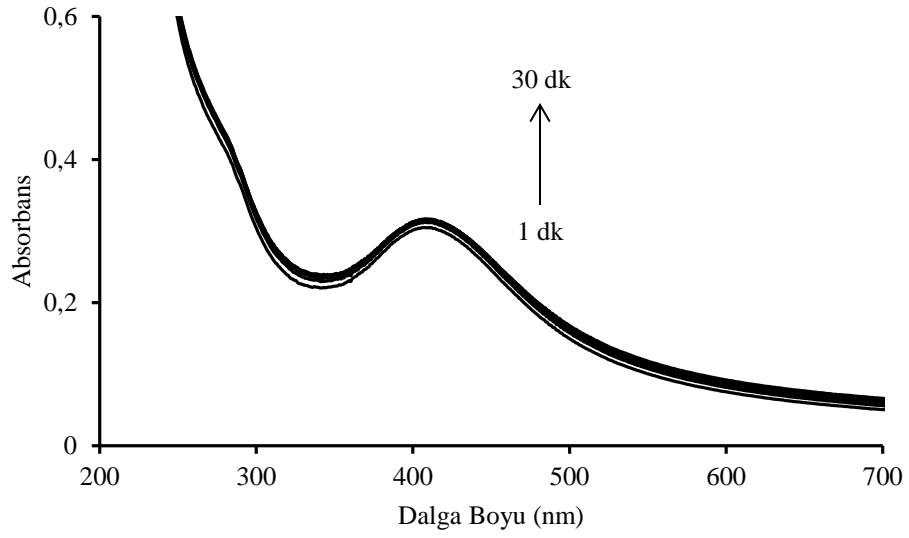
Şekil 4.156 AgGSHZn²⁺CK, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve CK, CK, CK ve Zn²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



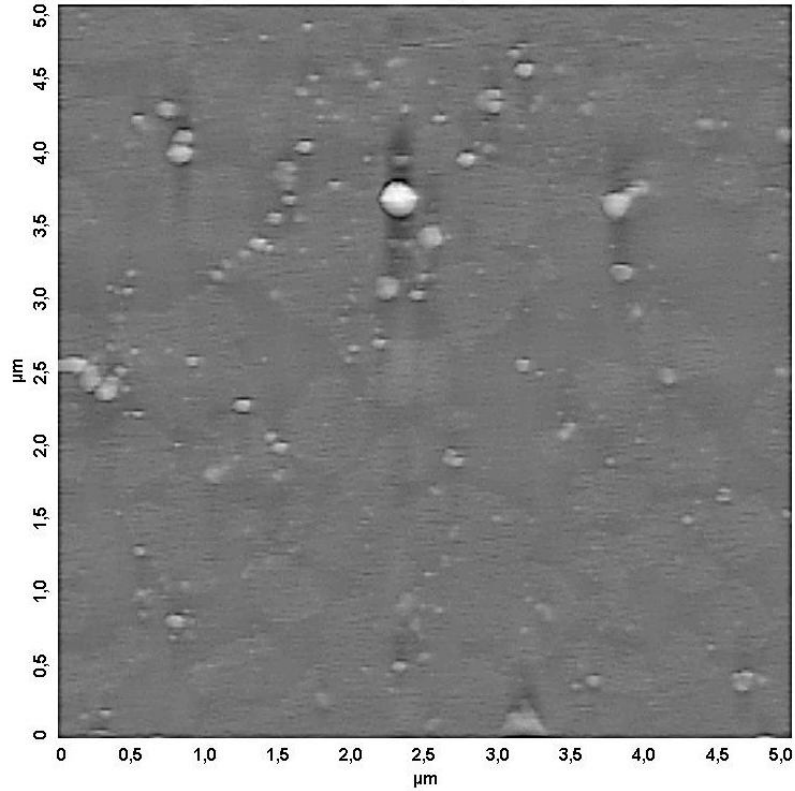
Şekil 4.157. Zn²⁺ iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.157(Devam). Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda artan CK konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



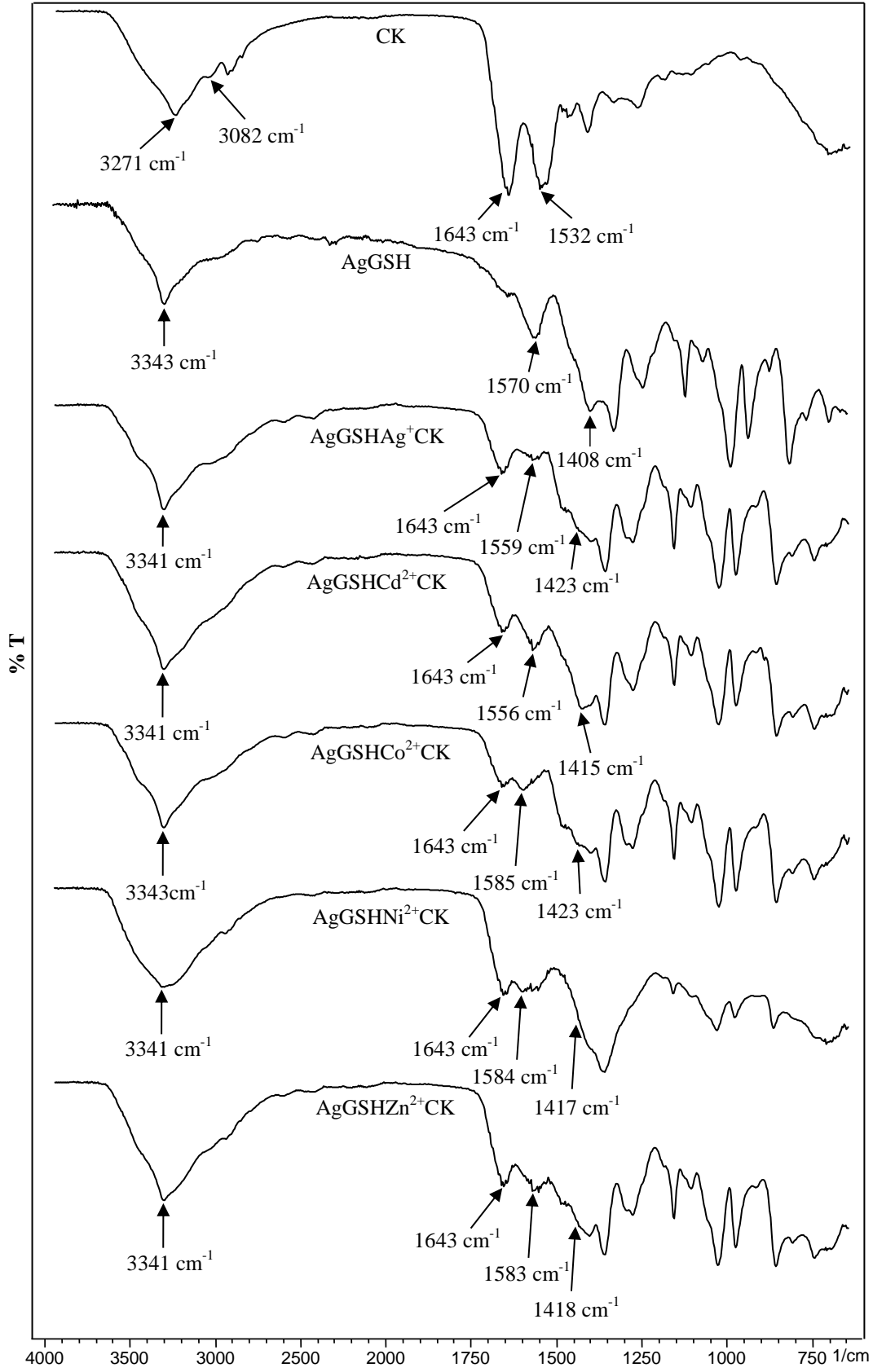
Şekil 4.158. Zamanla değişen $\text{AgGSHZn}^{2+}\text{CK}$ absorbansları



Şekil 4.159. AgGSHZn²⁺CK yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.1.6. Kreatin kinaz için alınan FTIR spektrumları

CK, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-CK'nın FTIR spektrumları Şekil 4.160'da gösterilmiştir. CK spektrumunda 3271 ve 3082 cm⁻¹'de bulunan pikler –NH gerilme titreşimleri nedeniyle oluşan piklerdir. 1643 cm⁻¹'de görülen pik –C=O gerilme titreşiminden oluşan amit I pikidir. 1532 cm⁻¹'de görülen pik ise –NH eğilme ve –C-N gerilme titreşiminden kaynaklanan piklerin birleşmesi ile oluşmuştur. AgGSH spektrumunda –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹'deki pikin, spektrumlarda kayda değer kaymaya maruz kalmadığı görülmüştür. CK yapısında bulunan amin titreşim pikleri ise kayarak –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan pikin içine gömülmüştür. AgGSH'in –NH₃⁺ grubunun etkileşime katılmadığı, CK yapısında bulunan amin gruplarının ise katıldığı görülmektedir. CK yapısında 1643 cm⁻¹'de bulunan Amit I pikinin diğer spektrumlarda herhangi bir kaymaya uğramadığı görülmüştür.



Şekil 4.160. CK, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-CK yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

Amit II piki ise AgGSHAg⁺CK spektrumunda 1559 cm⁻¹, AgGSHCd²⁺CK spektrumunda 1556 cm⁻¹, AgGSHCo²⁺CK spektrumunda 1585 cm⁻¹, AgGSHNi²⁺CK spektrumunda 1584 cm⁻¹'de, AgGSHZn²⁺CK spektrumunda 1583 cm⁻¹'de çıkmıştır. Amit II pikinin tüm spektrumlarda kaydığı gözlenmiştir. Bu sonuç CK'nın -NH grupları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1408 cm⁻¹'de görülen karboksilat pikinin AgGSHAg⁺CK spektrumunda 1423 cm⁻¹, AgGSHCd²⁺CK spektrumunda 1415 cm⁻¹, AgGSHCo²⁺CK spektrumunda 1423 cm⁻¹, AgGSHNi²⁺CK spektrumunda 1417 cm⁻¹, AgGSHZn²⁺CK spektrumunda 1418 cm⁻¹'e kayması bu grubun etkileşime katıldığını göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1570 cm⁻¹'de bulunan asimetrik karboksilat piki ise kayarak amit pikleri ile örtüşmüştür. AgGSH'in karboksilat gruplarının da etkileşime katıldığı meydana gelen kaymalardan anlaşılmaktadır.

CK yapısında bulunan alfa sarmal yapısı nötral pH'lardan uzaklaştıkça azalmaktadır. pH 3-5 arasında beta tabaka yapısının daha fazla olduğu görülmüştür. CK nötral pH'larda (pH 6-9) normal yapısını korurken, pH 3-5 değerleri arasında tersinir bir şekilde denatüre haldedir ve agregasyona uğramıştır. Asidik pH'larda (pH 3'ün altı) ise tamamen denatüre ve agrege halde bulunmaktadır. [505, 506]. Çalışılan pH aralığında (7,58 – 8,30) meydana gelen etkileşimlerin CK'nın normal konformasyonu ile oluştuğu söylenebilir.

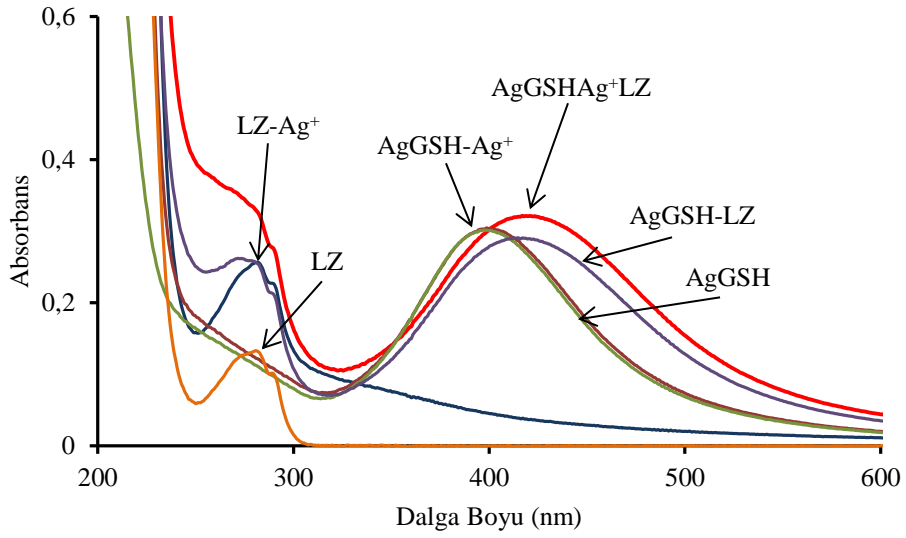
4.4.2. Lizozim tayini

Lizozim tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Ag⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ ve Zn²⁺ iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları bölümün sonunda toplu bir şekilde verilecektir. Spektrumların yorumlanmasında literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [507, 508].

4.4.2.1. Ag⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

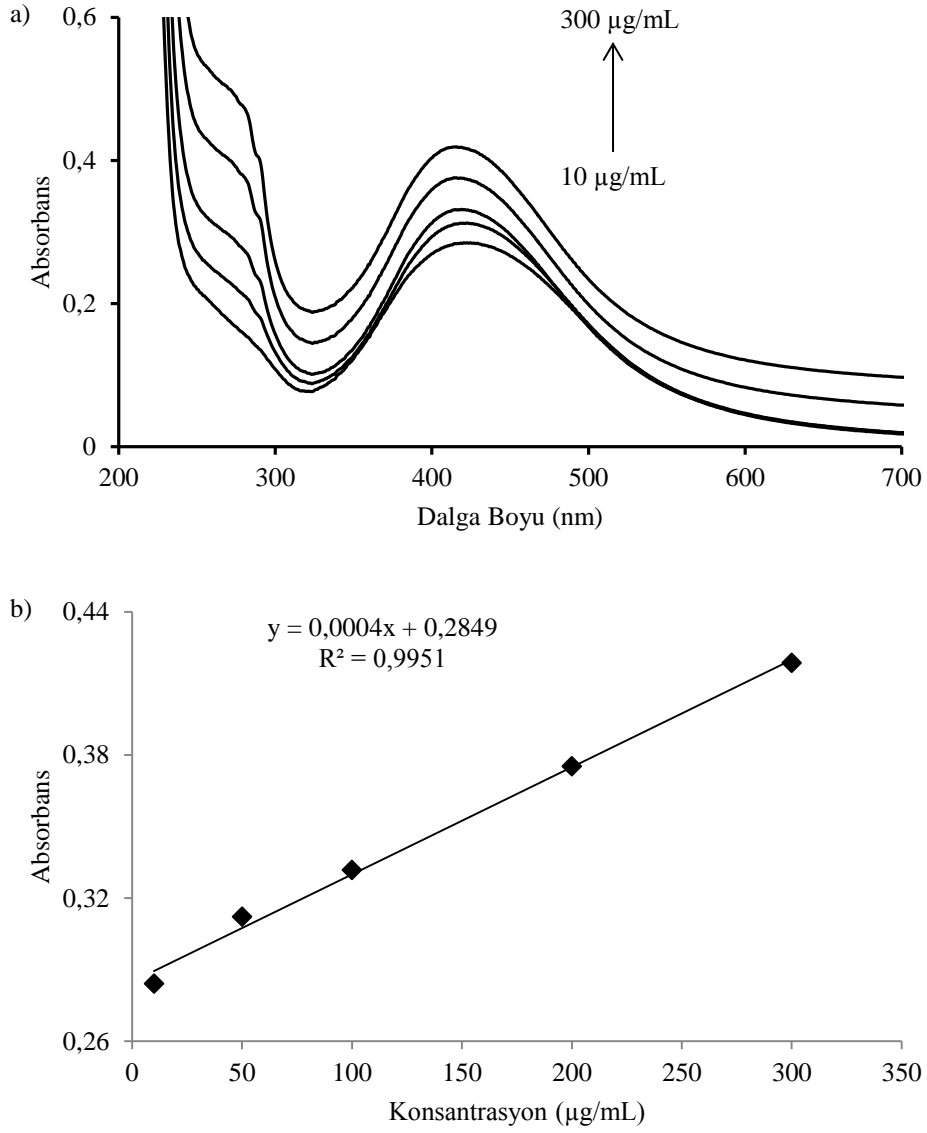
AgGSHAg⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Ag⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ag⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.161'de gösterilmektedir. AgGSH ve LZ etkileşimi sonucu absorpsiyon piki 414,5 nm'ye kaymıştır. Aynı

zamanda pikin agregasyondan dolayı genişlediği görülmektedir. AgGSH ve Ag⁺ etkileşimi ise absorpsiyon şiddetini az da olsa arttırmıştır. LZ-Ag⁺ etkileşimi LZ'nin 281 nm'deki pikinin şiddetinin artmasına neden olmuştur. AgGSHAg⁺LZ'nin absorpsiyon piki ise AgGSH-LZ'nin absorpsiyon pikine göre biraz daha kırmızıya kayarak ve şiddeti artarak 419 nm'de çıkmıştır. AgGSHAg⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,48'dir.



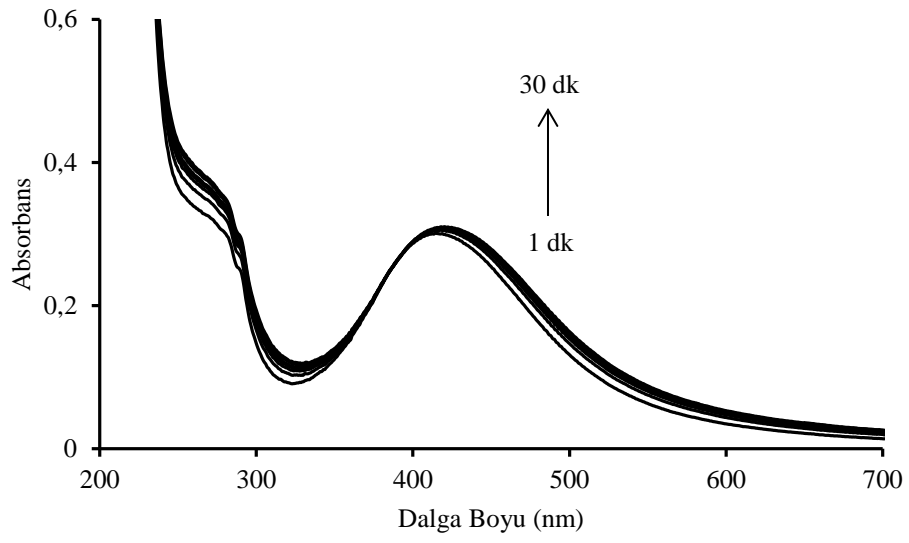
Şekil 4.161. AgGSHAg⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Ag⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ag⁺ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.162'deki kalibrasyon doğrusu, 419 nm'deki absorpsiyon değışimlerinin 10 – 300 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir.

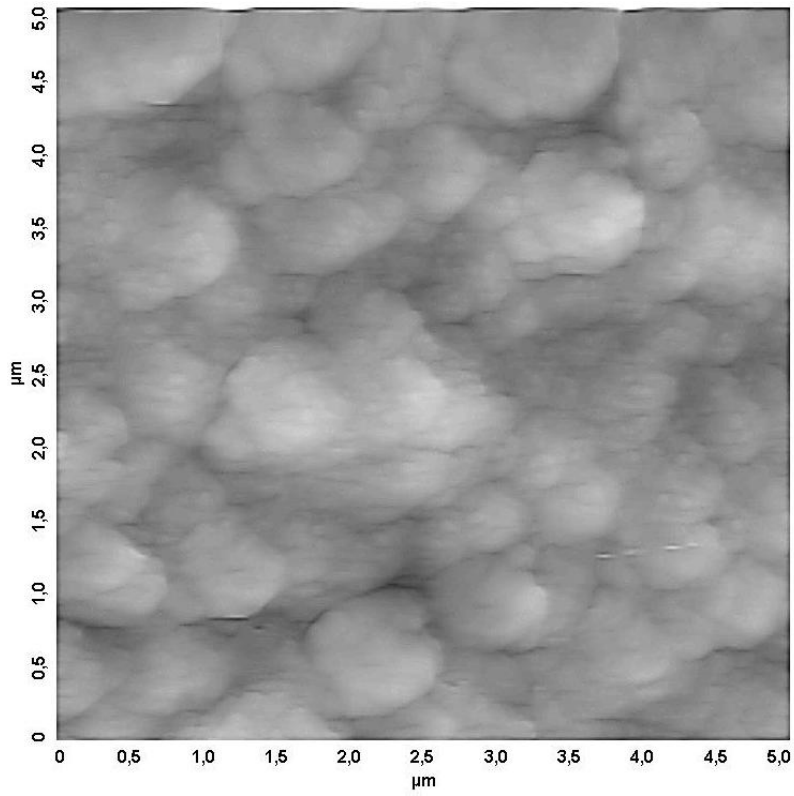


Şekil 4.162. Ag^+ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorban değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)

Zamanın etkileşim hızına ve absorbanı etkisi Şekil 4.163’de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Ayrıca yine kompleks miktarına bağlı olarak pik maksimumunun kırmızıya kaydığı görülmektedir. $AgGSHAg^+LZ$ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.164’de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.163. Zamanla değişen AgGSHAg⁺LZ absorbansları

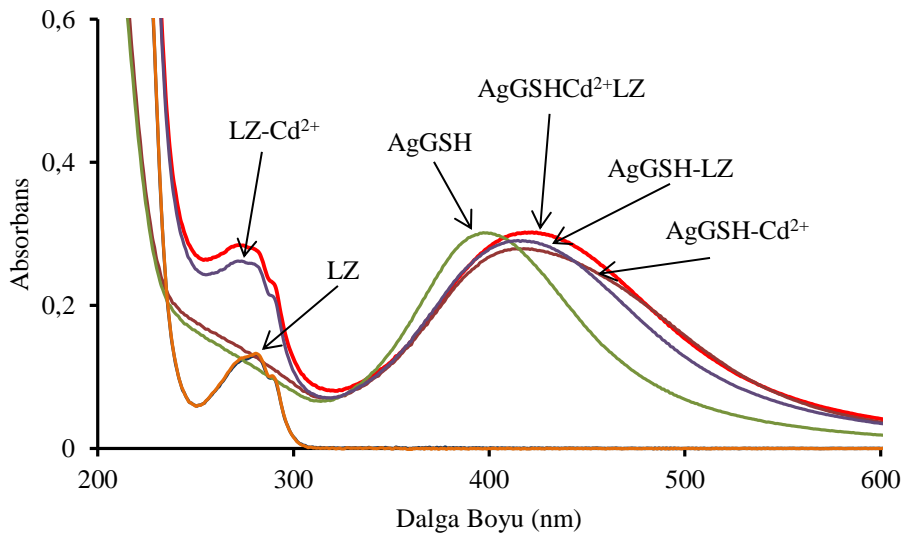


Şekil 4.164. AgGSHAg⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

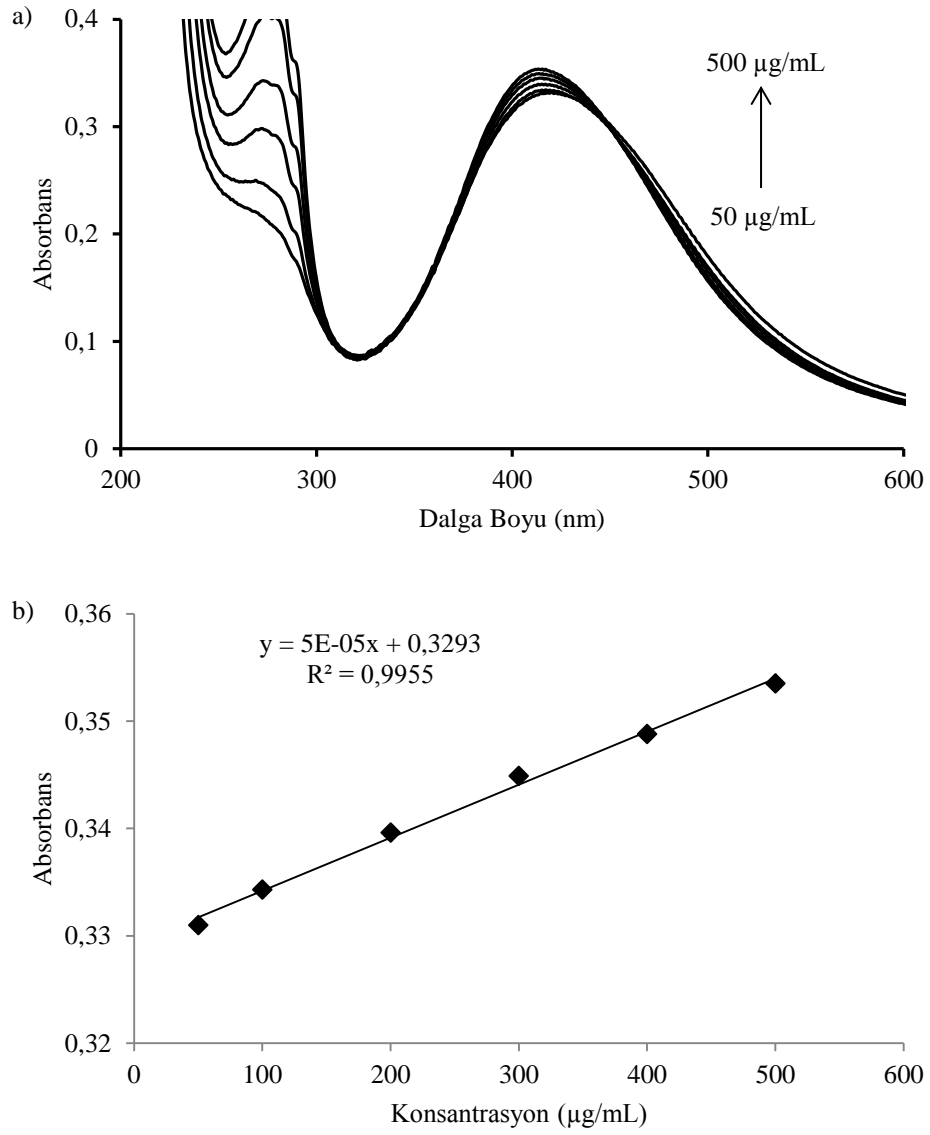
4.4.2.2. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

AgGSHCd²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Cd²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.165’de gösterilmektedir. AgGSH-Cd²⁺ çözelti karışımının absorpsiyon piki agregasyondan dolayı genişlemiştir. LZ-Cd²⁺ çözeltisinin absorpsiyon pikinin şiddeti ise etkileşimden dolayı artmıştır. AgGSHCd²⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon pikinin şiddeti ise artarak 417 nm’ye kaymıştır. AgGSHCd²⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH’ı 8,00’dır.

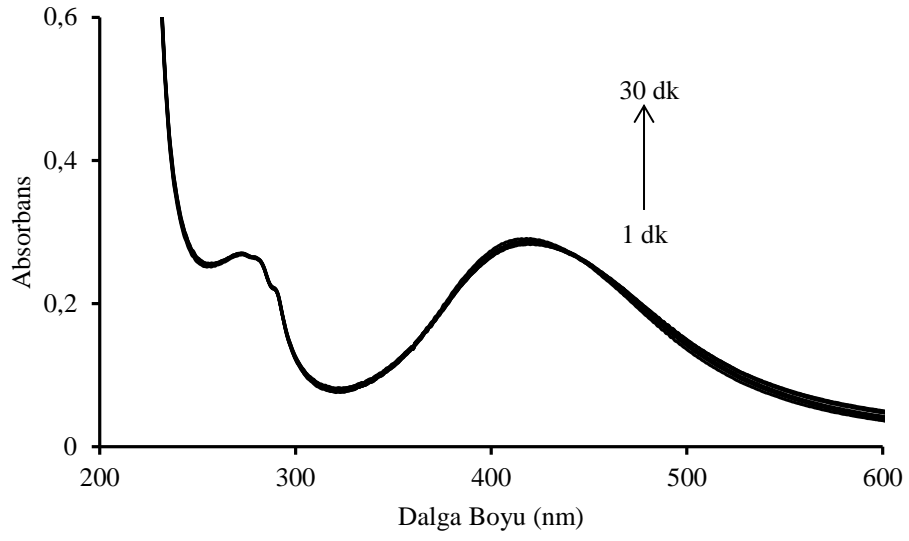
Şekil 4.166’daki kalibrasyon doğrusu, 417 nm’deki absorbans değişimlerinin 5 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Kompleks miktarına bağlı olarak AgGSH-Cd²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.167’de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. AgGSHCd²⁺LZ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.168’de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



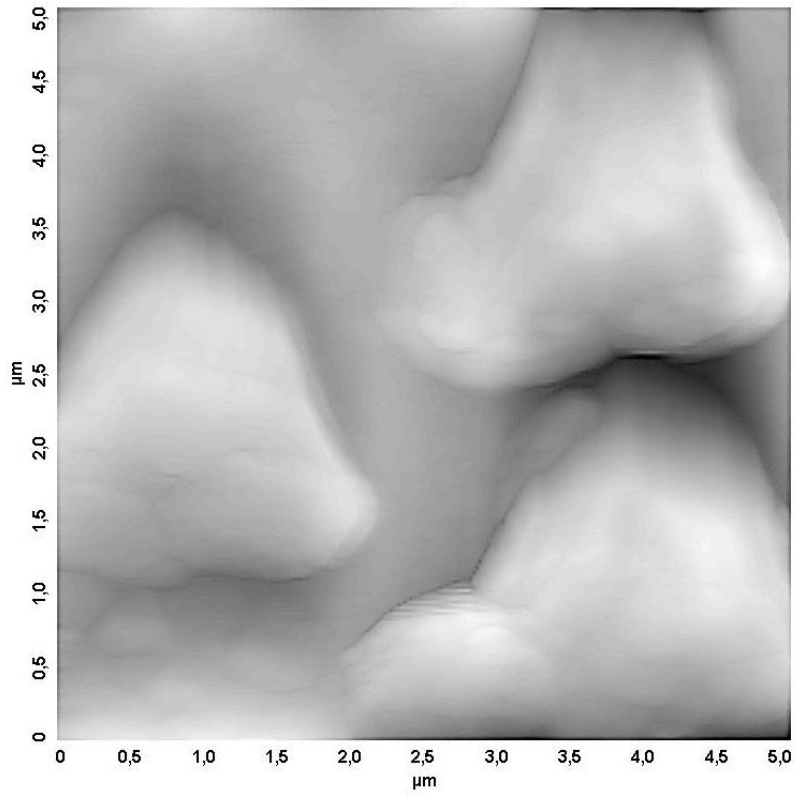
Şekil 4.165. AgGSHCd²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Cd²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Cd²⁺ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları



Şekil 4.166. Cd²⁺ iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



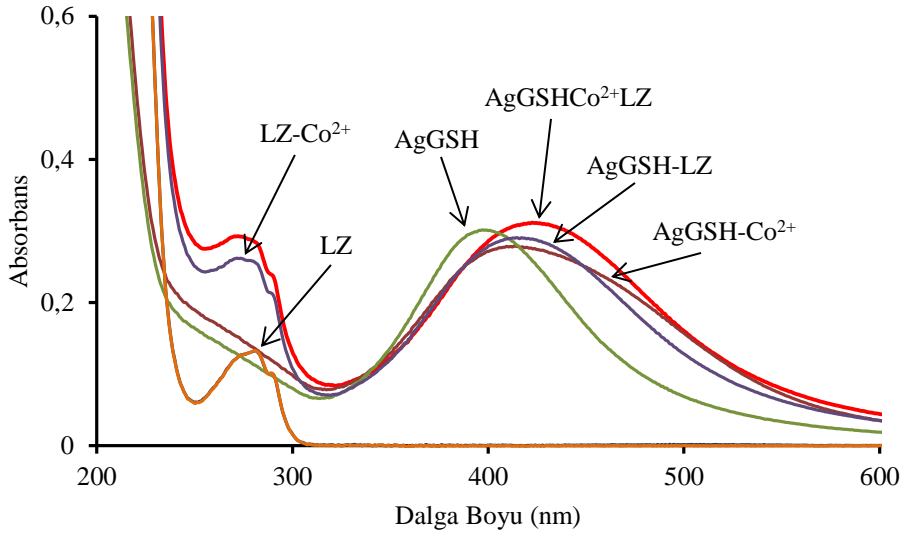
Şekil 4.167. Zamanla değişen AgGSHCd²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.168. AgGSHCd²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

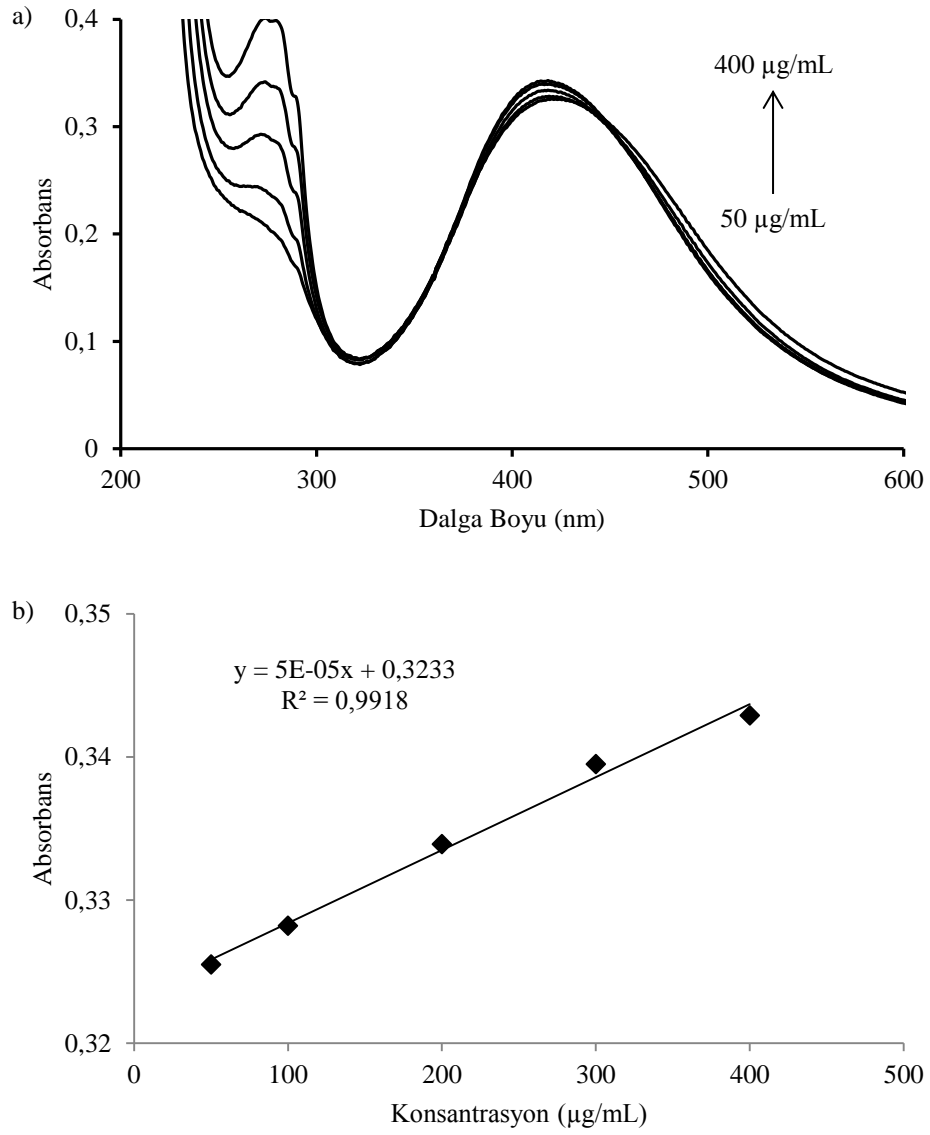
4.4.2.3. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

AgGSHCo²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Co²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.169'da gösterilmektedir. AgGSH ve Co²⁺ iyon çözeltilerinin karışımının absorpsiyon pikinin genişlediği görülmektedir. LZ-Co²⁺ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti etkileşimden dolayı artmıştır. AgGSHCo²⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon piki Cd²⁺ ve Ag⁺ iyon denemelerine benzer şekilde şiddetini artırarak 418,5 nm'ye kaymıştır. AgGSHCo²⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,40'dır.

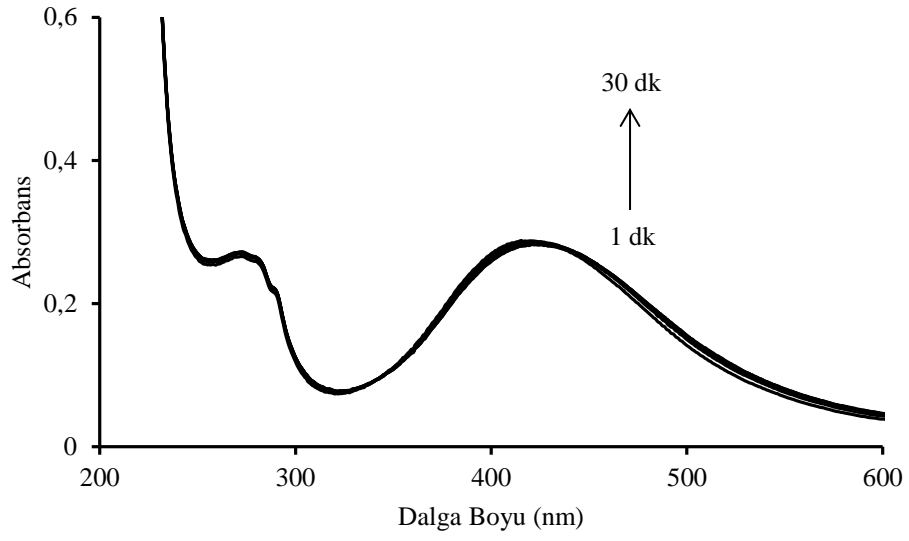


Şekil 4.169. AgGSHCo²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Co²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Co²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

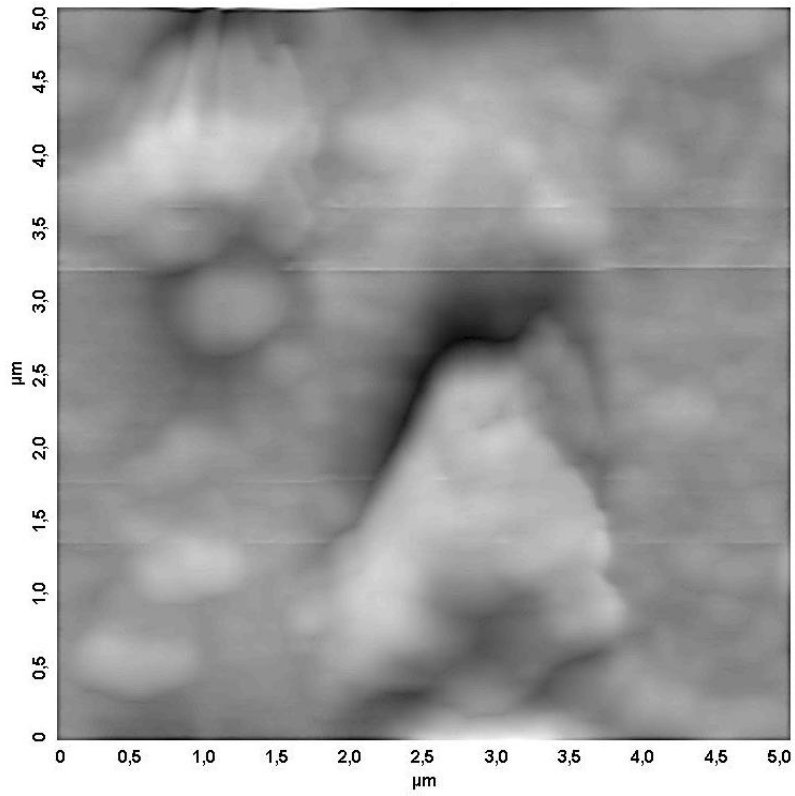
Şekil 4.170'deki kalibrasyon doğrusu, 418,5 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 50 – 400 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Kompleks miktarına bağlı olarak AgGSH-Co²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyon etkisi Şekil 4.171'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.172'de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.170. Co^{2+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



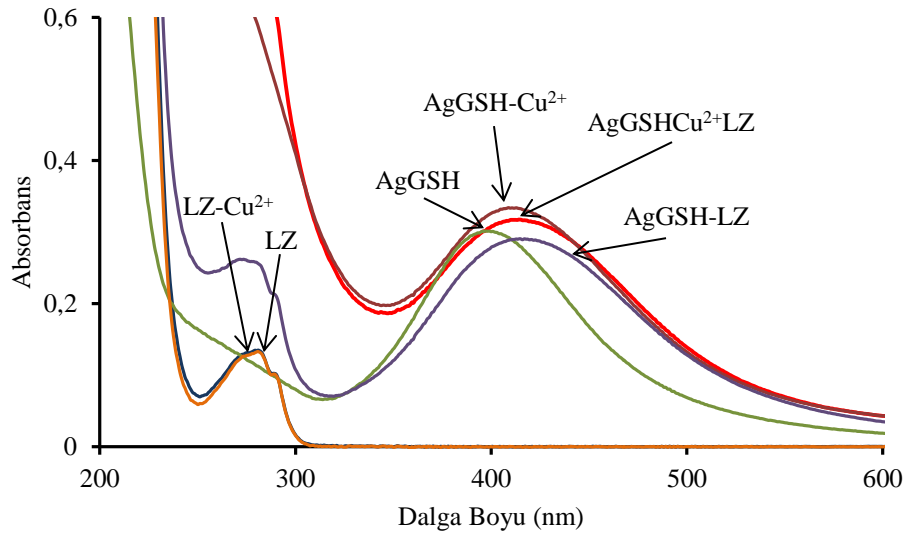
Şekil 4.171. Zamanla değişen AgGSHCo²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.172. AgGSHCo²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

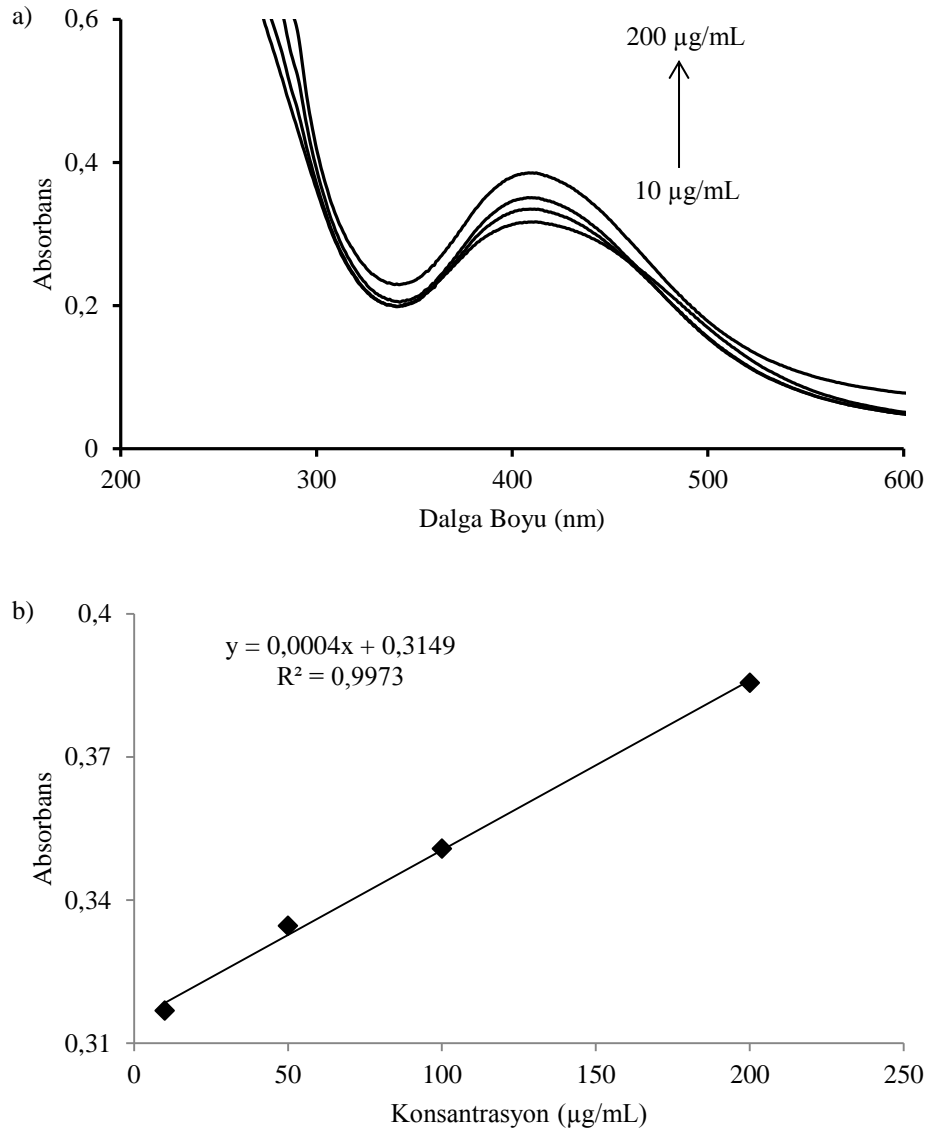
4.4.2.4. Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

$\text{AgGSHCu}^{2+}\text{LZ}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve LZ , LZ , LZ ve Cu^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.173'de gösterilmektedir. LZ-Cu^{2+} ve LZ çözeltilerinin absorpsiyon şiddetleri arasında çok fazla bir fark gözlenmemiştir. AgSH ve Cu^{2+} iyon çözeltisi karışımının absorbansı şiddeti artarak $403,5 \text{ nm}$ 'de çıkmıştır. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{LZ}$ çözeltisinin absorbans piki ise AgGSH ve Cu^{2+} arasında gerçekleşen etkileşimin azalması nedeniyle AgGSH-Cu^{2+} çözeltisinin absorbans şiddetinden daha düşük çıkararak $408,5 \text{ nm}$ 'ye kaymıştır. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{LZ}$ çözeltisinin ölçülen pH'ı $7,33$ 'tür.

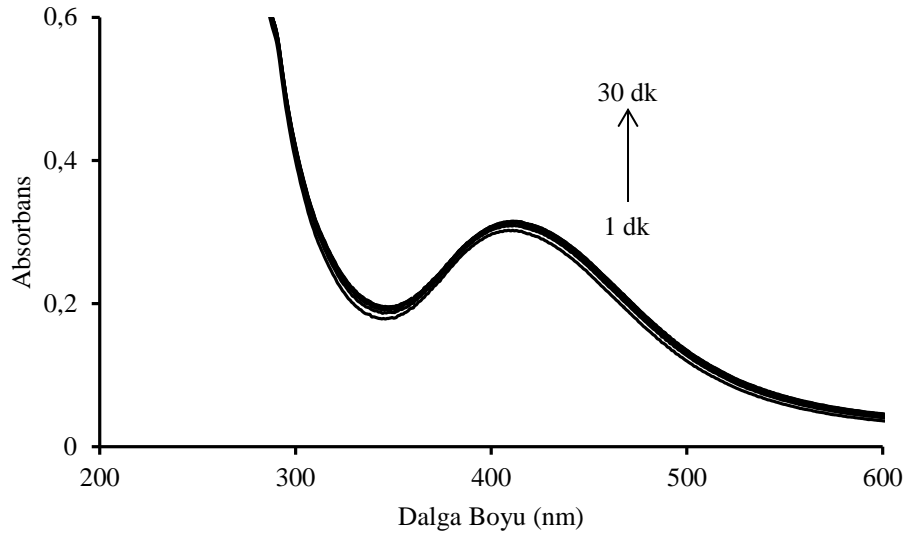


Şekil 4.173. $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{LZ}$, AgGSH , AgGSH ve Cu^{2+} , AgGSH ve LZ , LZ , LZ ve Cu^{2+} çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları

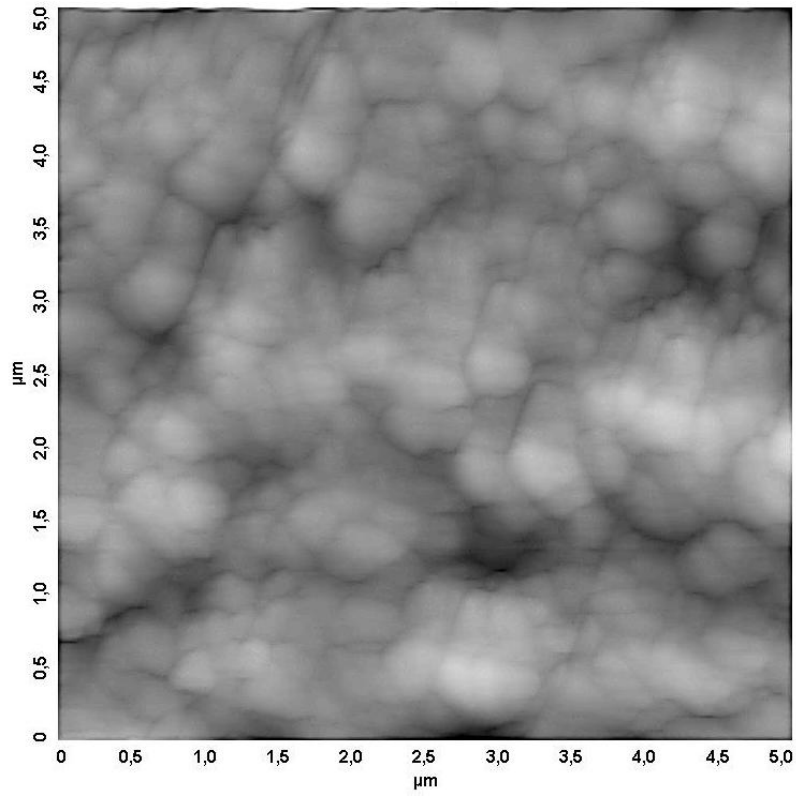
Şekil 4.174'deki kalibrasyon doğrusu, $408,5 \text{ nm}$ 'deki absorbans değişimlerinin $10 - 200 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Cu^{2+} etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.175'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.176'da gösterilen $\text{AgGSHCu}^{2+}\text{LZ}$ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülmektedir.



Şekil 4.174. Cu^{2+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



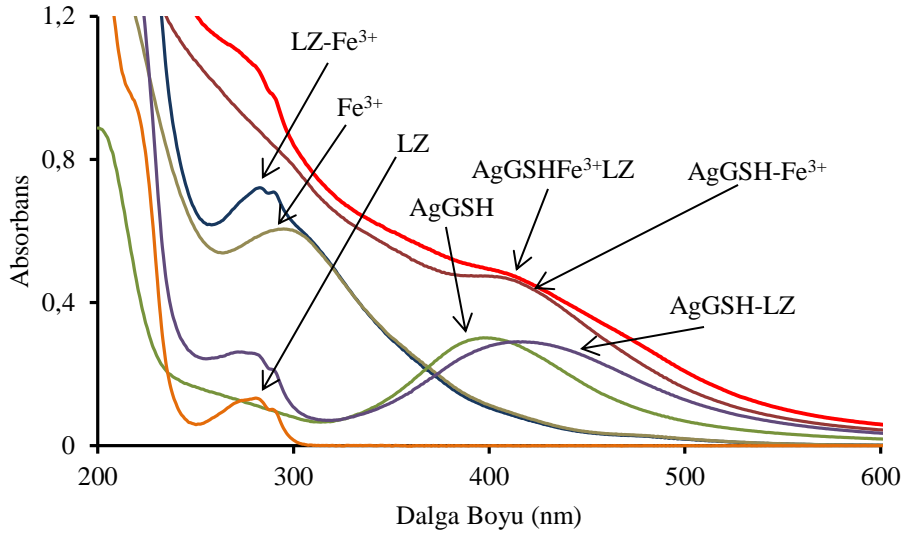
Şekil 4.175. Zamanla değişen AgGSHCu²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.176. AgGSHCu²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

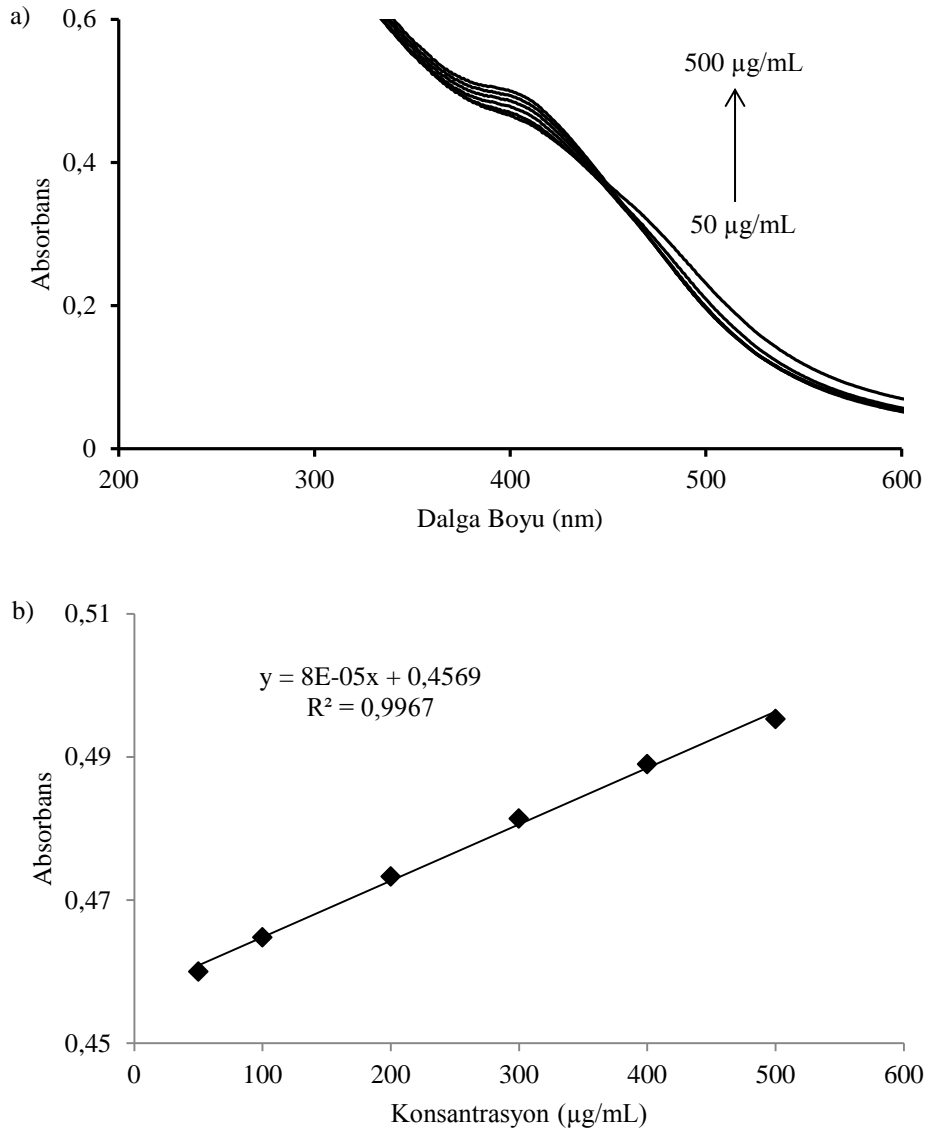
4.4.2.5. Fe³⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

AgGSHFe³⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Fe³⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Fe³⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.177'de gösterilmektedir. LZ-Fe³⁺ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti, Fe³⁺'nin oksitlenmesiyle oluşan oksit yapısının ve LZ'nin absorpsiyon şiddetinden fazla çıkmıştır. AgGSH-Fe³⁺ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artarak 404,5 nm'de çıkmıştır. Agregasyondan dolayı pikte genişleme görülmüştür. AgGSHFe³⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti AgGSH-Fe³⁺ çözeltisinden fazla çıkmıştır. AgGSHFe³⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,13'tür.

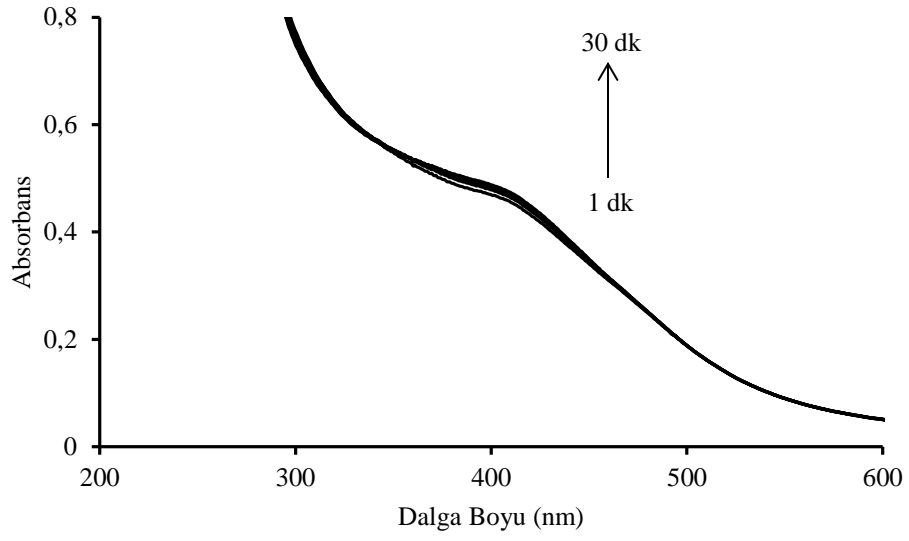


Şekil 4.177. AgGSHFe³⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Fe³⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Fe³⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

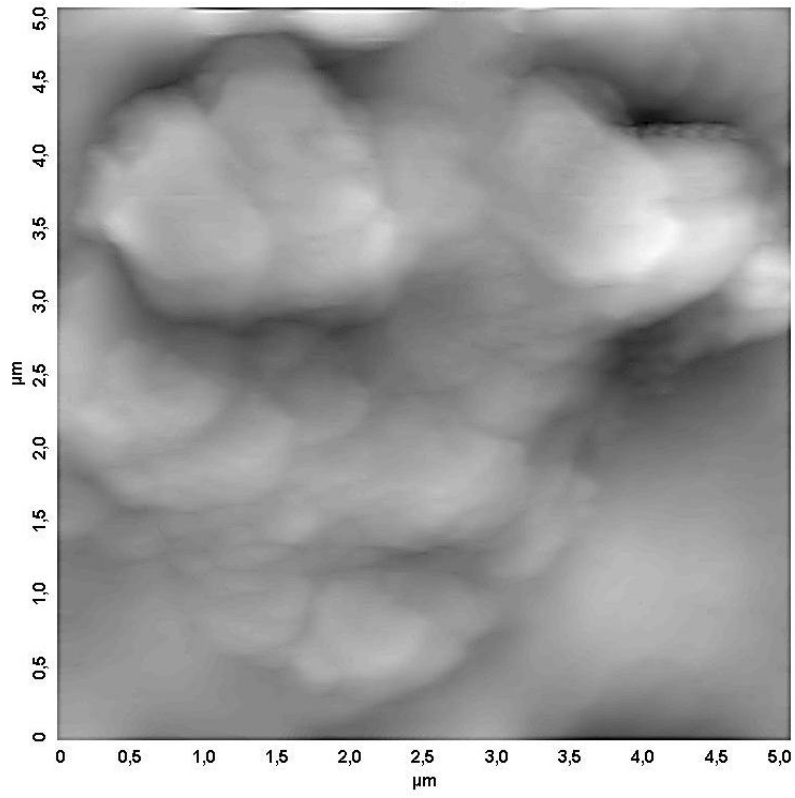
Şekil 4.178'deki kalibrasyon doğrusu, 404,5 nm'deki absorpsiyon değişimlerinin 5 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Fe³⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyon etkisi Şekil 4.179'da gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.180'de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.178. Fe^{3+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



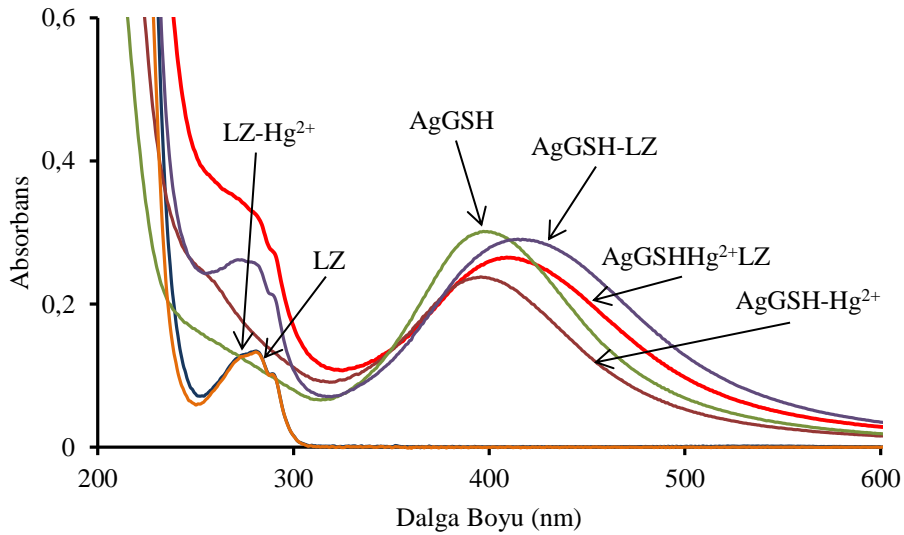
Şekil 4.179. Zamanla değişen AgGSHFe³⁺LZ absorbansları



Şekil 4.180. AgGSHFe³⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.2.6. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

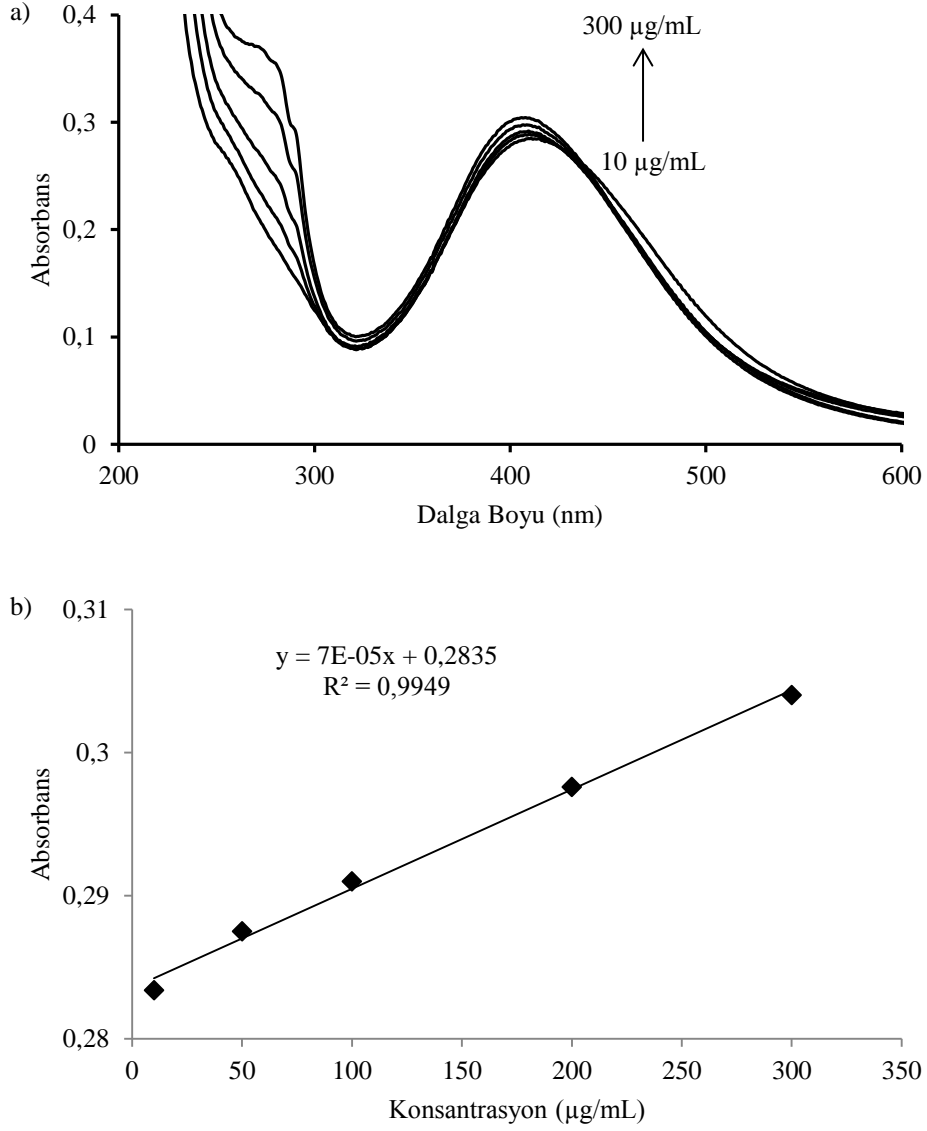
AgGSHHg²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.181’de gösterilmektedir. LZ-Hg²⁺ ve LZ çözeltilerinin absorpsiyon şiddetleri arasında fazla bir fark gözlenmemiştir. AgGSH ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon şiddeti, Hg²⁺ iyonunun gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminden dolayı düşük çıkmıştır. AgGSHHg²⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti, AgGSH-Hg²⁺ çözeltisinden fazla çıksa da AgGSH-LZ çözeltisinden düşük çıkmıştır. Bu durum, AgGSHHg²⁺LZ çözeltisinde komplekse katılmayan Hg²⁺ iyonlarının gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminin devam ettiğini göstermektedir. AgGSHHg²⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH’ı 7,44’tür.



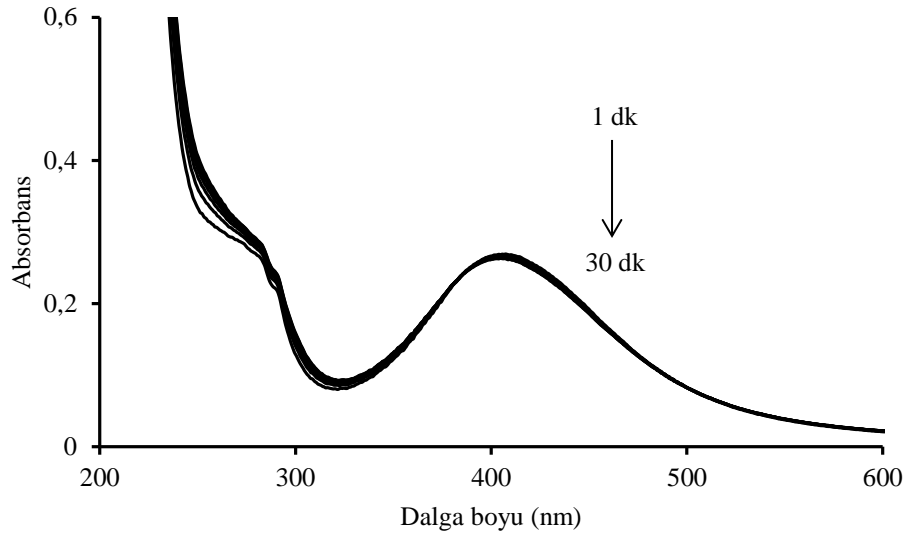
Şekil 4.181. AgGSHHg²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Hg²⁺ çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.182’deki kalibrasyon doğrusu, 406,5 nm’deki absorpsiyon değışimlerinin 10 – 300 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Hg²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorpsiyon etkisi Şekil 4.183’de gösterilmiştir. Hg²⁺ iyonunun gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminin zaman içerisinde de devam ettiği ve absorpsiyon şiddetinin küçük miktarlarda azaldığı

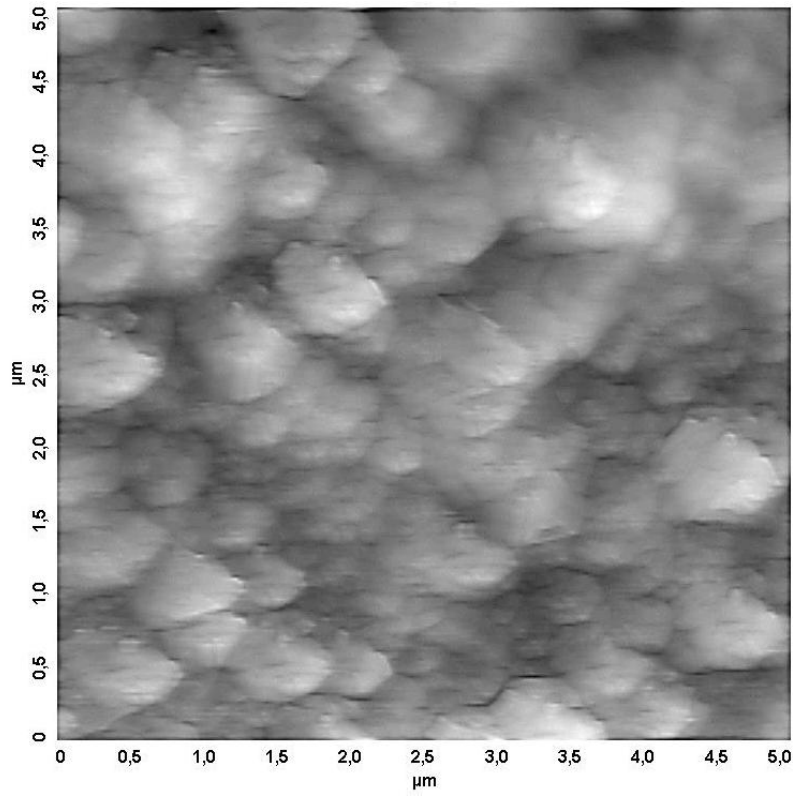
görülmüştür. $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{LZ}$ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.184'de gösterilmiştir. Taneciklerin agrege olarak mikron boyutunda yapılar oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.182. Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



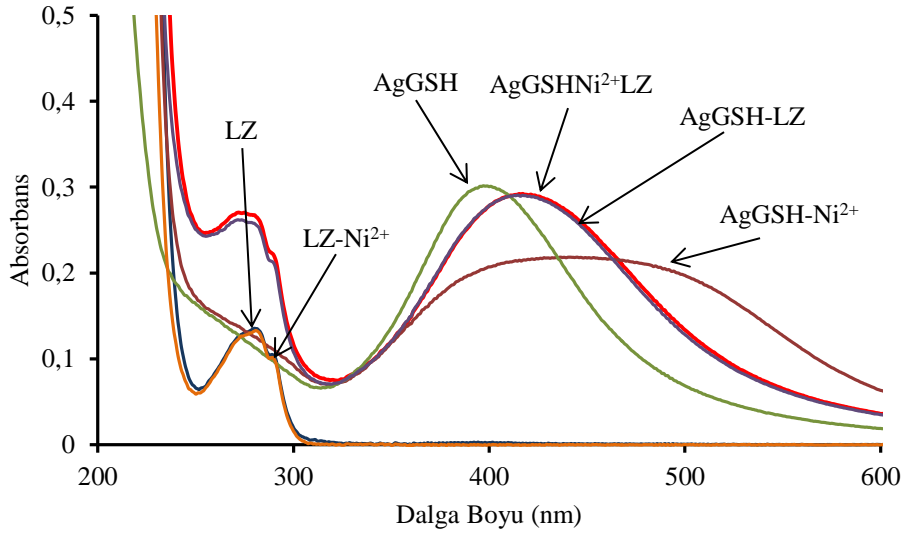
Şekil 4.183. Zamanla değişen AgGSHHg²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.184. AgGSHHg²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

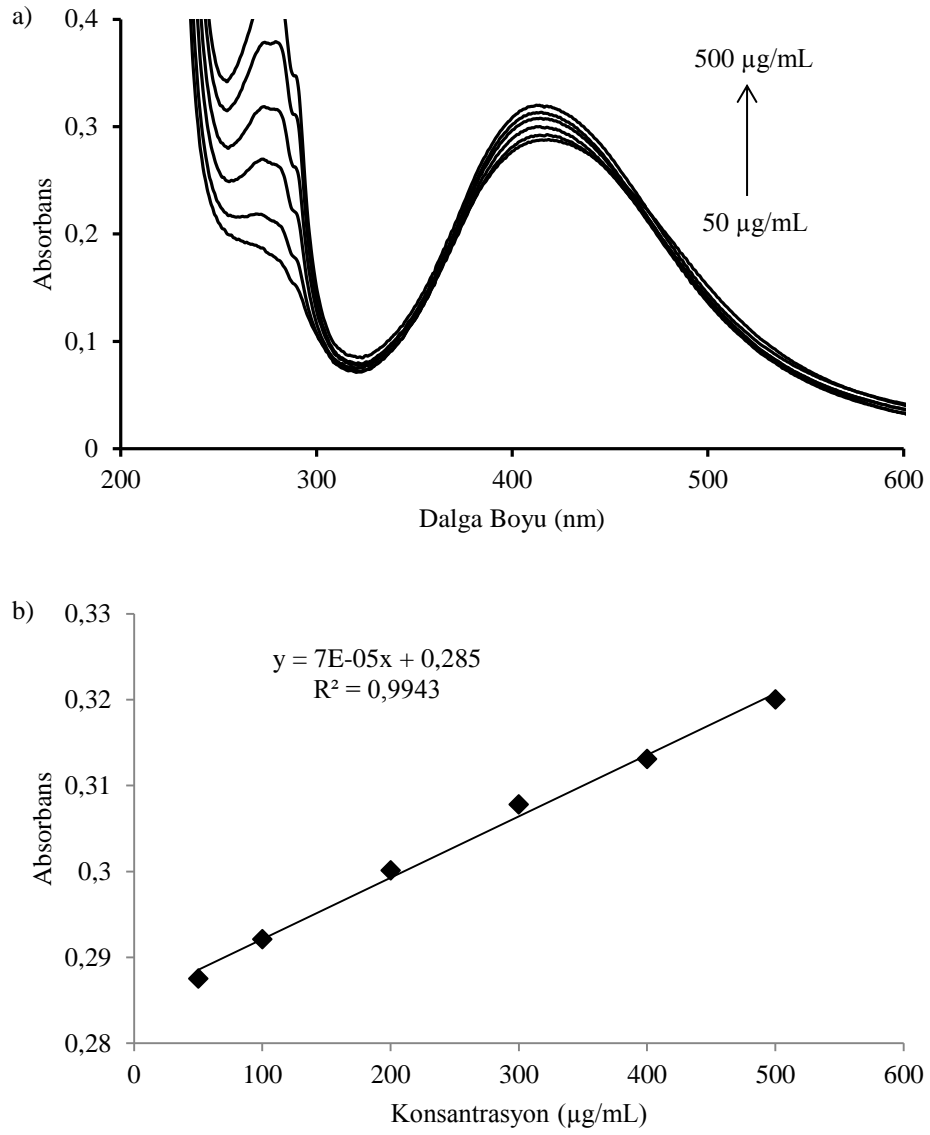
4.4.2.7. Ni²⁺ iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

AgGSHNi²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ni²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.185’de gösterilmektedir. AgGSH ve Ni²⁺ iyonu etkileşimi nedeniyle çözelti karışımlarının absorbansı piki genişlemiştir. LZ-Ni²⁺ ve LZ çözeltilerinin absorbans şiddetleri birbirlerine yakındır. AgGSHNi²⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti, AgGSH-LZ çözelti karışımının 414,5 nm’de çıkan pikine yakın şiddette çıkmıştır ve absorpsiyon maksimumu 414 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuç AgGSHNi²⁺LZ etkileşiminin nispeten zayıf olduğunu göstermektedir. AgGSHNi²⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH’ı 8,10’ dur.

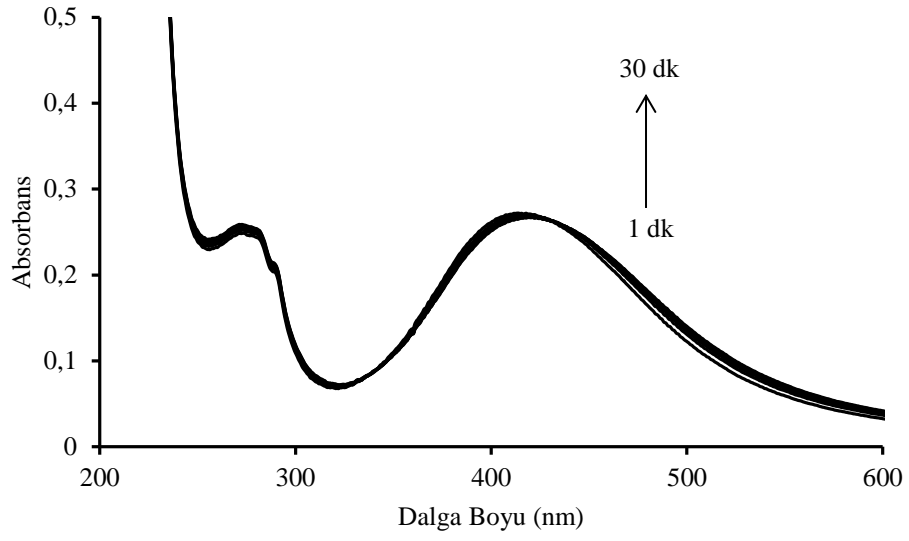


Şekil 4.185. AgGSHNi²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Ni²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

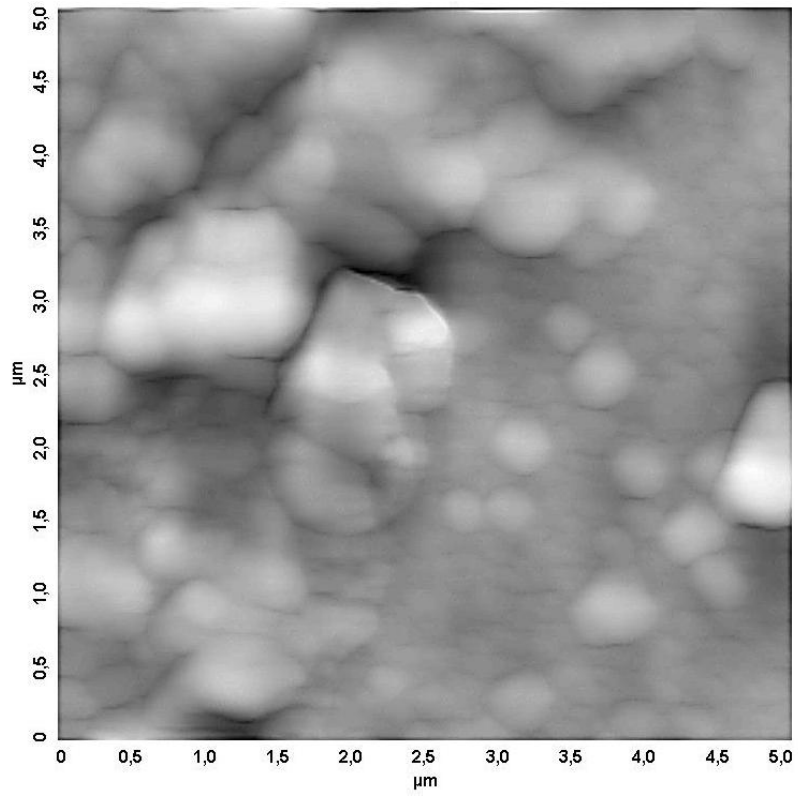
Şekil 4.186’deki kalibrasyon doğrusu, 414 nm’deki absorbans değişimlerinin 50 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Ni²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.187’de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.188’de gösterilen AgGSHNi²⁺LZ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülmektedir.



Şekil 4.186. Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



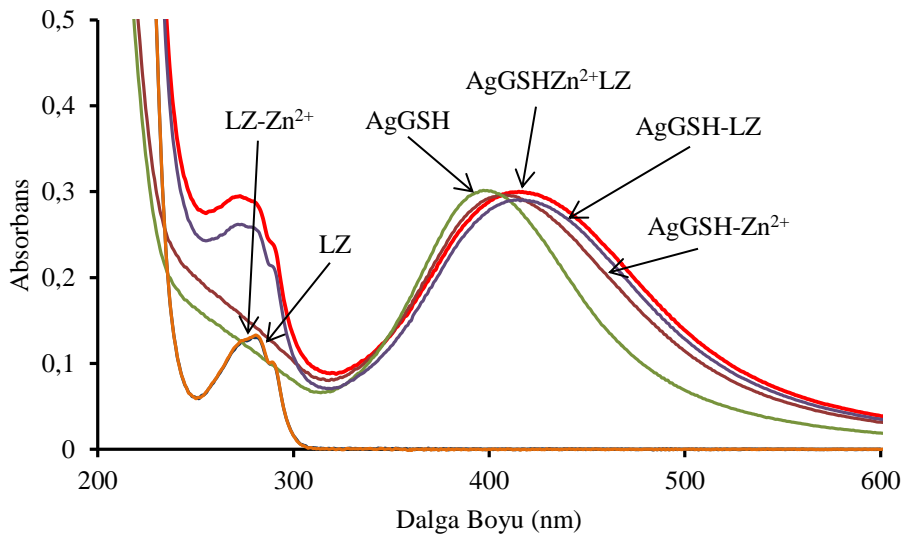
Şekil 4.187. Zamanla değişen AgGSHNi²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.188. AgGSHNi²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

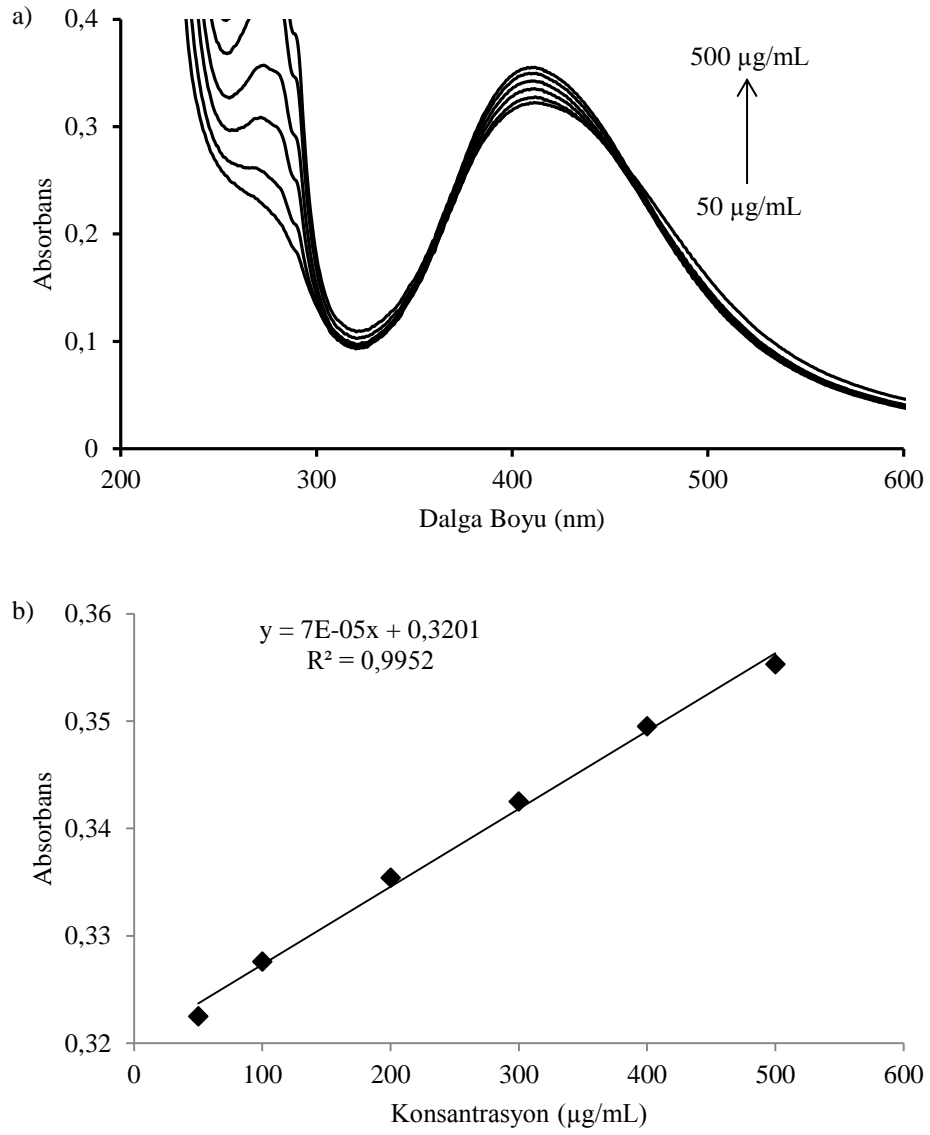
4.4.2.8. Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda lizozim tayini

AgGSHZn²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.189'da gösterilmektedir. AgGSH ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon piki genişleyerek kırmızıya kaymıştır. LZ-Zn²⁺ ve LZ çözeltilerinin absorpsiyon spektrumları çakışmıştır. AgGSHZn²⁺LZ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artarak 411,5 nm'de çıkmıştır. AgGSHZn²⁺LZ çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,67'dir.

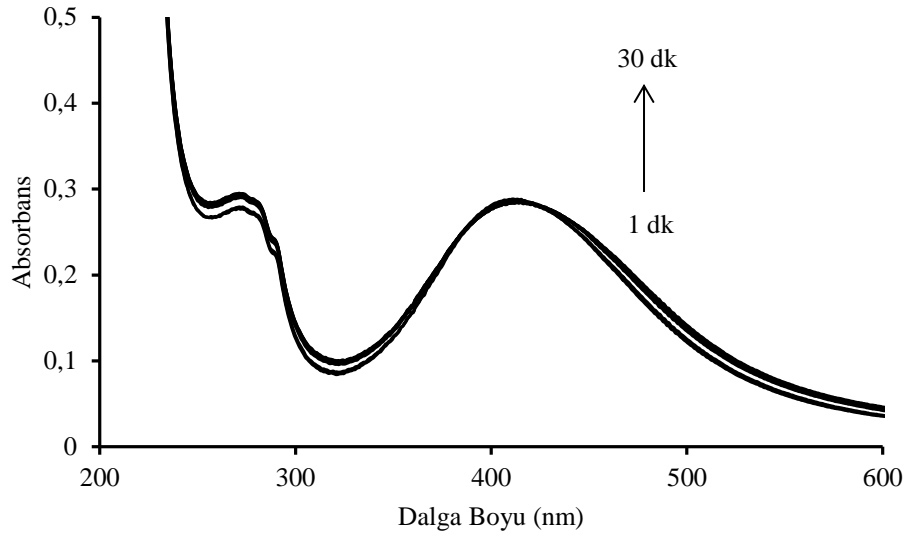


Şekil 4.189. AgGSHZn²⁺LZ, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve LZ, LZ, LZ ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları

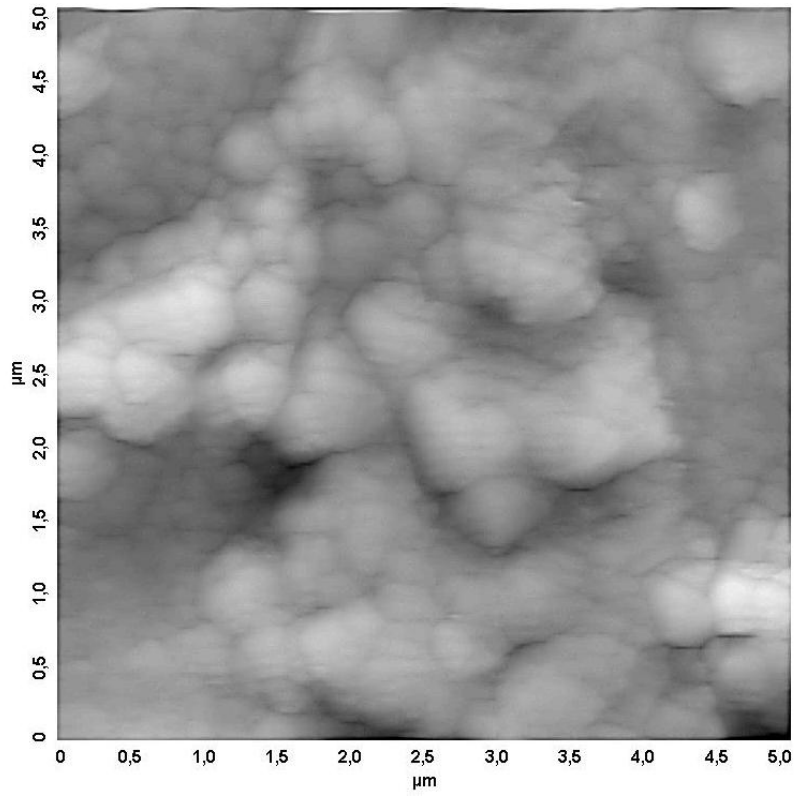
Şekil 4.190'daki kalibrasyon doğrusu, 411,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 50 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Zn²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.191'de gösterilmiştir. Şekil 4.192'de gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



Şekil 4.190. Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda artan LZ konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



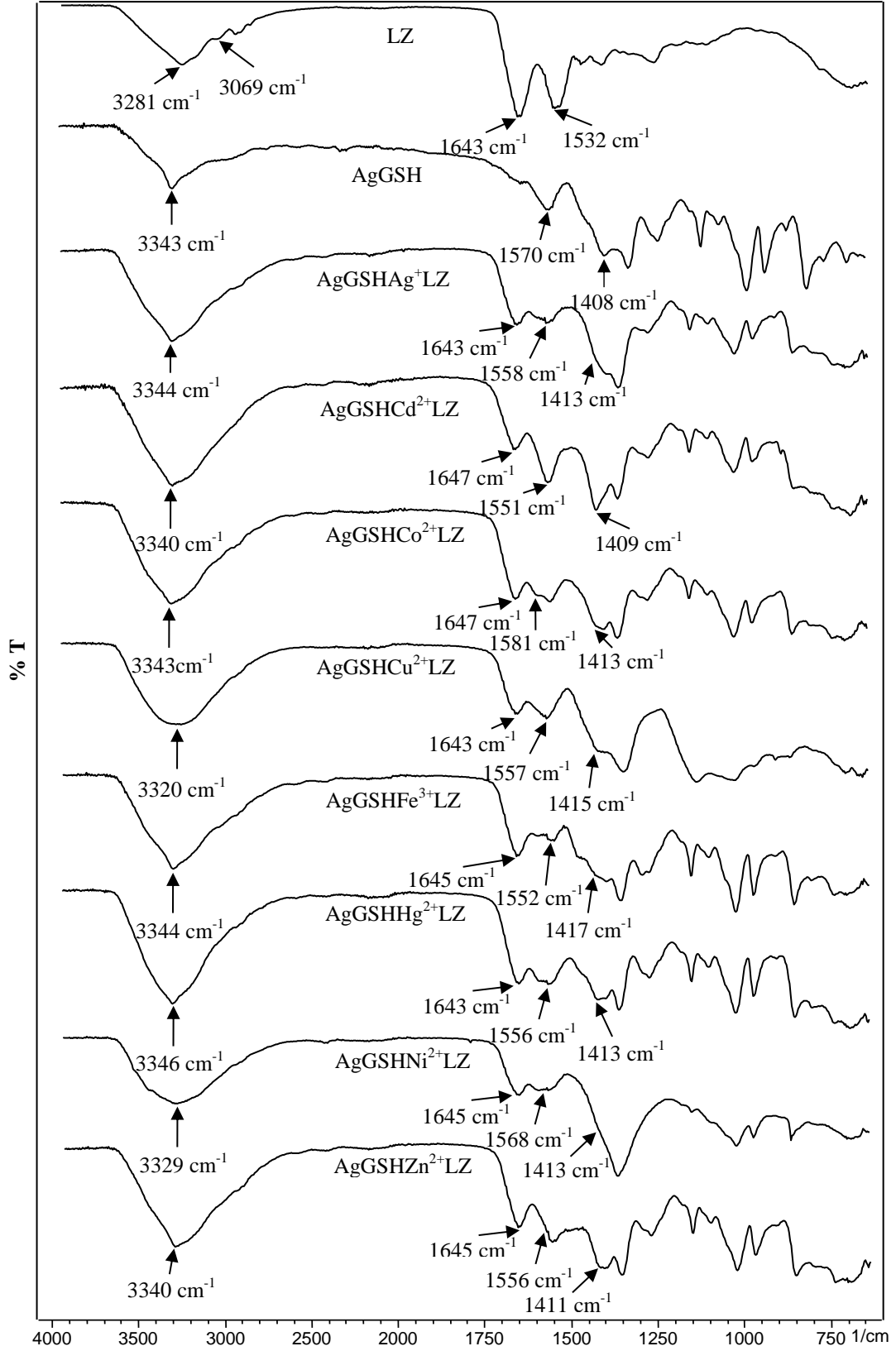
Şekil 4.191. Zamanla değişen AgGSHZn²⁺LZ absorbansları



Şekil 4.192. AgGSHZn²⁺LZ yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.2.9. Lizozim için alınan FTIR spektrumları

Şekil 4.193'de gösterilen LZ spektrumunda 3281 ve 3069 cm^{-1} 'de bulunan pikler –NH gerilme titreşimleri nedeniyle oluşan piklerdir. 1643 cm^{-1} 'de görülen pik –C=O gerilme titreşiminden oluşan amit I pikidir. 1532 cm^{-1} 'de görülen pik ise –NH eğilme ve –C-N gerilme titreşiminden kaynaklanan piklerin birleşmesi ile oluşmuştur. AgGSH spektrumunda $-\text{NH}_3^+$ grubundan kaynaklanan 3343 cm^{-1} 'deki pikin, AgGSHCu²⁺LZ ve AgGSHNi²⁺LZ spektrumları haricindeki spektrumlarda kayda değer bir kaymaya maruz kalmadığı gözlenmiştir. AgGSHCu²⁺LZ ve AgGSHNi²⁺LZ spektrumlarında ise pikin kaybolarak –OH'dan kaynaklanan 3320 ve 3329 cm^{-1} 'deki piklerin ortaya çıktığı görülmektedir. LZ yapısında bulunan amin titreşim pikleri ise kayarak $-\text{NH}_3^+$ grubundan kaynaklanan pikin içine gömülmüştür. AgGSH'in $-\text{NH}_3^+$ grubunun AgGSHCu²⁺LZ ve AgGSHNi²⁺LZ kompleksleri dışındaki komplekslerde etkileşime katılmadığı, LZ yapısında bulunan amin gruplarının ise katıldığı görülmektedir. LZ yapısında 1643 cm^{-1} 'de bulunan amit I pikinin diğer spektrumlarda kayda değer bir kaymaya uğramadığı görülmüştür. Amit II piki ise AgGSHAg⁺LZ spektrumunda 1558 cm^{-1} , AgGSHCd²⁺LZ spektrumunda 1551 cm^{-1} , AgGSHCo²⁺LZ spektrumunda 1581 cm^{-1} , AgGSHCu²⁺LZ spektrumunda 1557 cm^{-1} , AgGSHFe³⁺LZ spektrumunda 1552 cm^{-1} , AgGSHHg²⁺LZ spektrumunda 1556 cm^{-1} 'de AgGSHNi²⁺LZ spektrumunda 1568 cm^{-1} 'de, AgGSHZn²⁺LZ spektrumunda 1556 cm^{-1} 'de çıkmıştır. Amit II pikinin tüm spektrumlarda kaydığı görülmüştür. Bu sonuç LZ'nin –NH grupları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1408 cm^{-1} 'de görülen karboksilat pikinin tüm spektrumlarda 1 – 5 cm^{-1} arasında kaymaya uğraması bu grubun zayıf etkileşimlere girdiğini veya hiç girmediğini göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1570 cm^{-1} 'de bulunan asimetric karboksilat piki ise kayarak amit pikleri ile örtüşmüştür.



Şekil 4.193. LZ, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-LZ yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

LZ yapısında alfa sarmal yapısı beta tabaka yapısından daha fazla bulunmaktadır. LZ nötral pH'larda (pH 6-10) normal yapısını korurken, asidik pH'larda (pH 4'ün altı) denatüre olarak fibril halde bulunmaktadır. Yüksek pH'larda (pH 10'un üstü) ise agregasyona uğradığı belirtilmektedir [509-511]. Çalışılan pH aralığında (7,13 – 8,48) meydana gelen etkileşimlerin LZ'nın normal konformasyonu ile oluştuğu söylenebilir.

4.4.3. Tripsin tayini

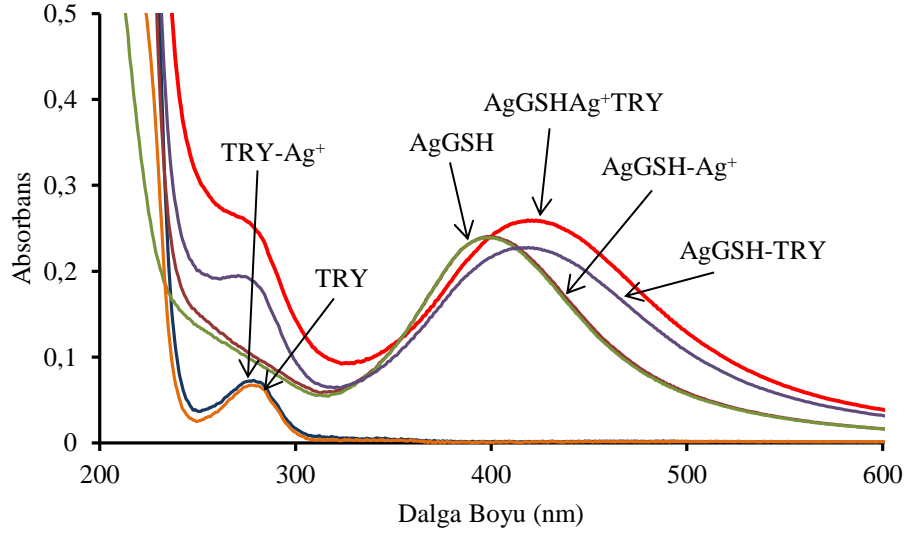
Tripsin tayini, denemesi yapılan metal iyonları içerisinde Ag^+ , Hg^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları bulunan ortamlarda gerçekleştirilmiştir. FTIR spektrumları bölümün sonunda toplu bir şekilde verilecektir. Spektrumların yorumlanmasında literatür çalışmalarından faydalanılmıştır [512, 513].

4.4.3.1. Ag^+ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini

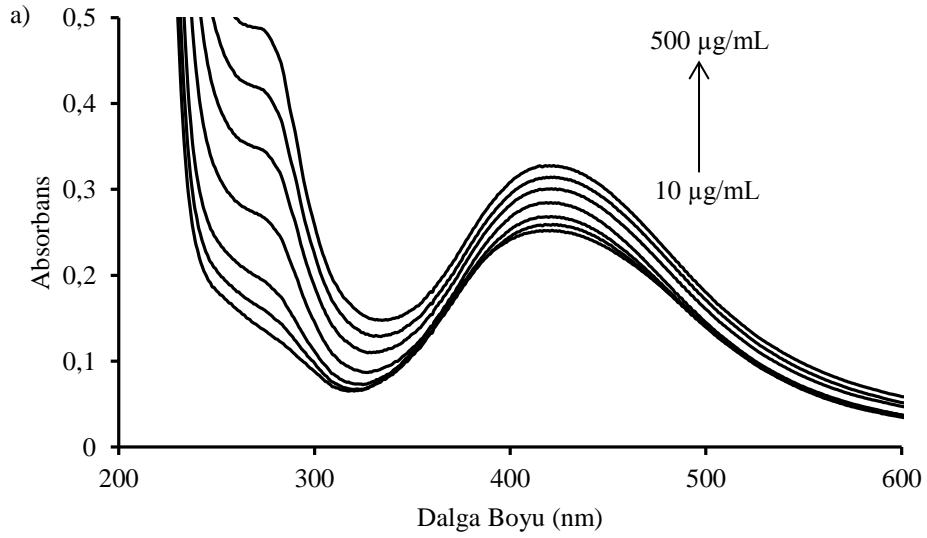
$AgGSHAg^+TRY$, $AgGSH$, $AgGSH$ ve Ag^+ , $AgGSH$ ve TRY , TRY , TRY ve Ag^+ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.194'de gösterilmektedir. $AgGSH$ ve TRY arasında gerçekleşen etkileşim nedeniyle absorpsiyon piki genişleyerek 419 nm'ye kaymıştır. $AgGSH$ ve Ag^+ etkileşimi ise absorpsiyon şiddetini az da olsa arttırmıştır. TRY 'nin 277,5 nm'deki pikinin $TRY-Ag^+$ etkileşimi sonrası şiddetini az da olsa arttırdığı görülmüştür. $AgGSHAg^+TRY$ çözeltisinin absorpsiyon pikinin şiddeti ise diğer absorpsiyon piklerinden daha fazla çıkmıştır ve 420,5 nm'ye kaymıştır. $AgGSHAg^+TRY$ çözeltisinin ölçülen pH'ı 8,25'dir.

Şekil 4.195'deki kalibrasyon doğrusu, 420,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 10 – 500 $\mu g/mL$ konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.196'da gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarı arttıkça absorpsiyon şiddetinin belirgin bir şekilde artması kompleksleşmenin yavaş gerçekleştiğini göstermektedir.

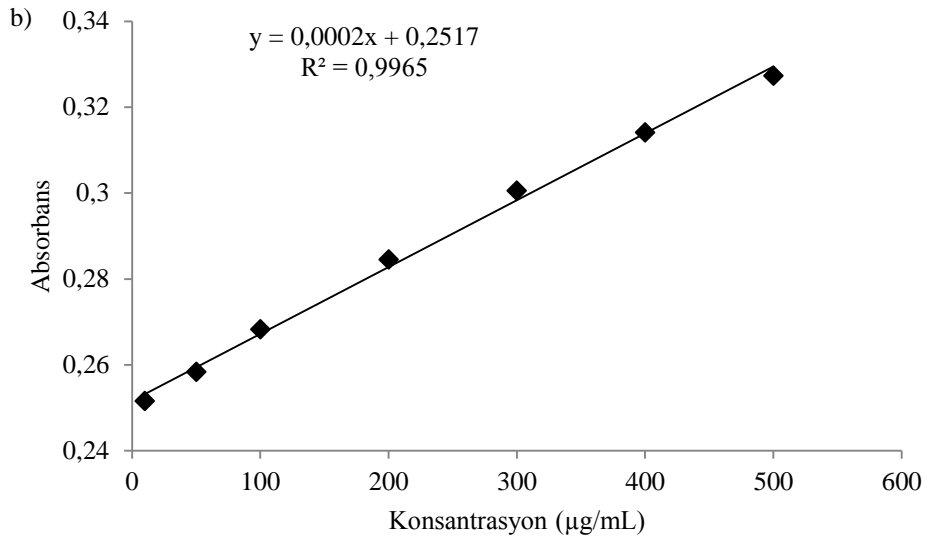
AgGSHAg⁺TRY kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.197'de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



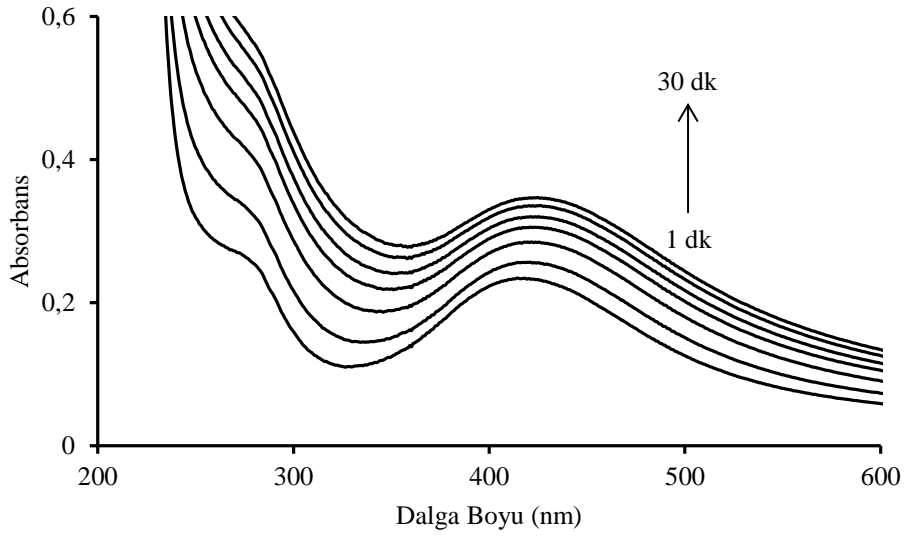
Şekil 4.194. AgGSHAg⁺TRY, AgGSH, AgGSH ve Ag⁺, AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Ag⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



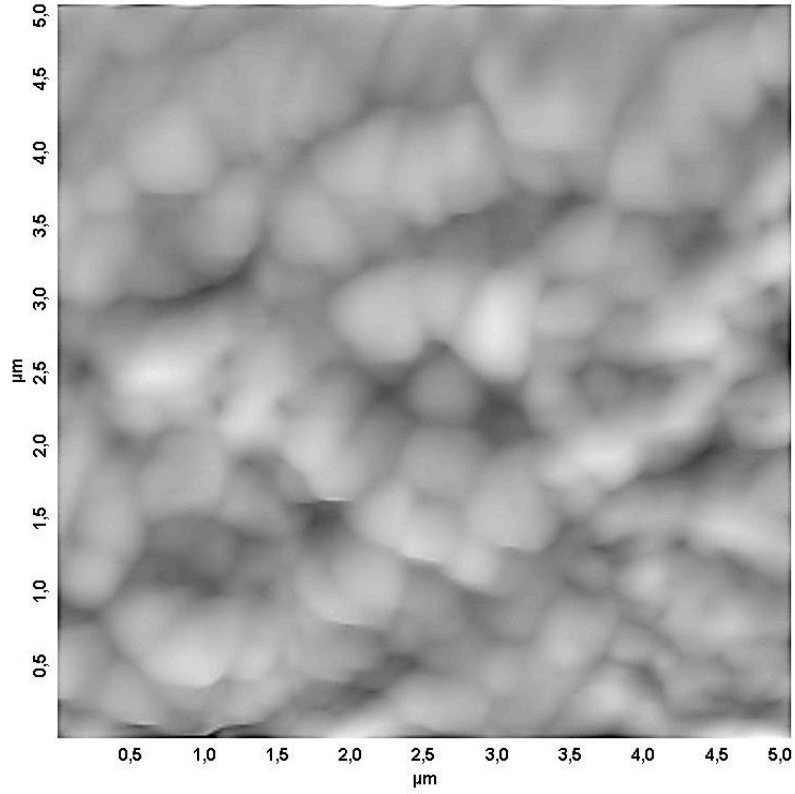
Şekil 4.195. Ag⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.195(Devam). Ag^+ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.196. Zamanla değişen $\text{AgGSHAg}^+\text{TRY}$ absorbansları



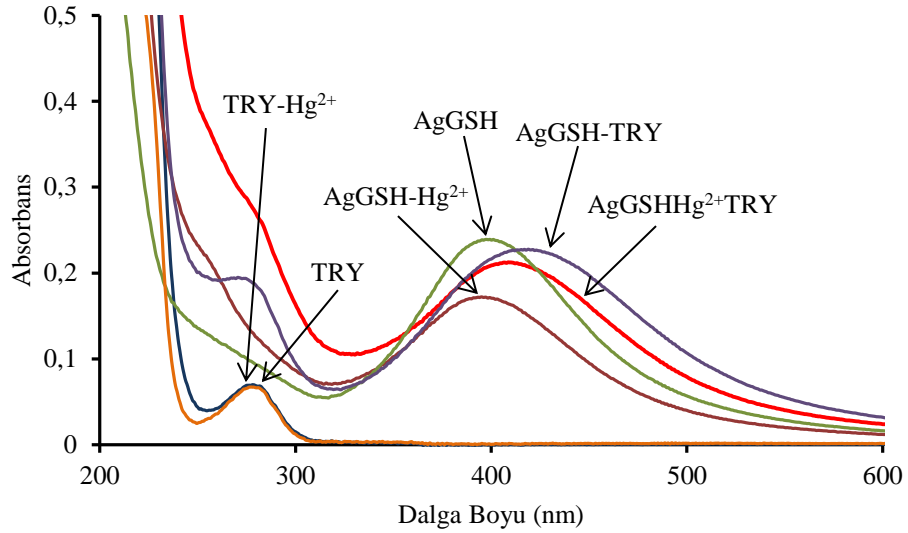
Şekil 4.197. AgGSHAg⁺TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.3.2. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini

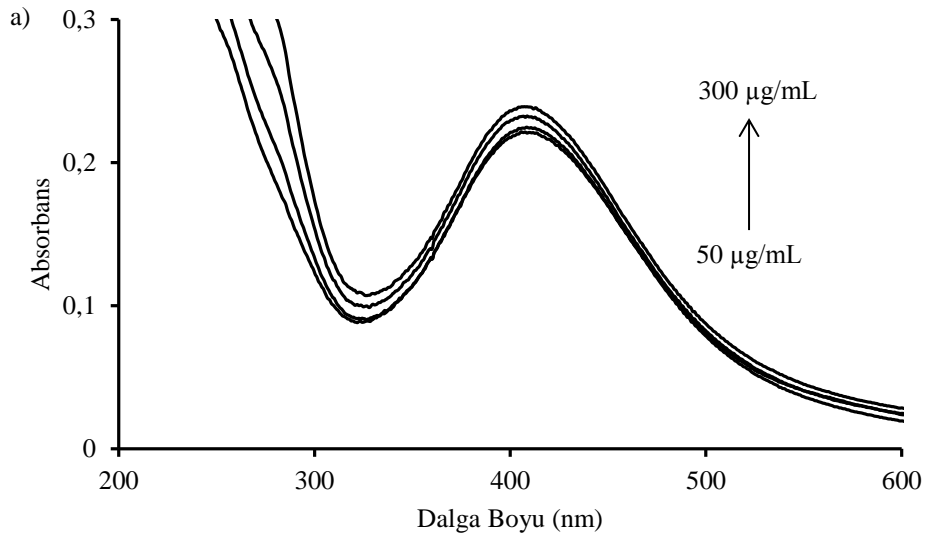
AgGSHHg²⁺TRY, AgGSH, AgGSH ve Hg²⁺, AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Hg²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.198’de gösterilmektedir. AgGSH-Hg²⁺ çözeltisinin absorpsiyon şiddeti azalmıştır. TRY-Hg²⁺ ve TRY çözeltilerinin absorpsiyon şiddetleri birbirine yakın çıkmıştır. AgGSHHg²⁺TRY çözelti absorbansı AgGSH-Hg²⁺ çözeltisinden fazla çıksa da AgGSH-TRY çözeltisinden düşük çıkmıştır. Bu durum AgGSHHg²⁺TRY çözeltisinde komplekse katılmayan Hg²⁺ iyonunun gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminin devam ettiğini göstermektedir. AgGSHHg²⁺TRY çözeltisinin ölçülen pH’ı 7,13’tür.

Şekil 4.199’deki kalibrasyon doğrusu, 408,5 nm’deki absorbans değişimlerinin 50 – 300 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde

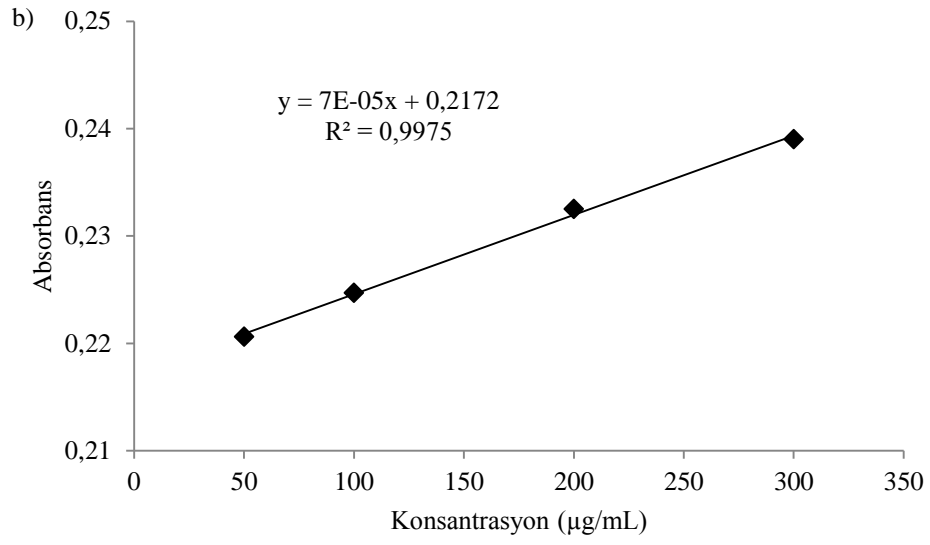
gösterilmiştir. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.200'de gösterilmiştir. Hg^{2+} iyonunun gümüş nanoparçacığı ile etkileşiminin zaman içerisinde de devam ettiği ve absorpsiyon şiddetinin az miktarlarda azaldığı görülmüştür. $AgGSHHg^{2+}TRY$ kompleksine ait AFM görüntüsü Şekil 4.201'de gösterilmiştir. Yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



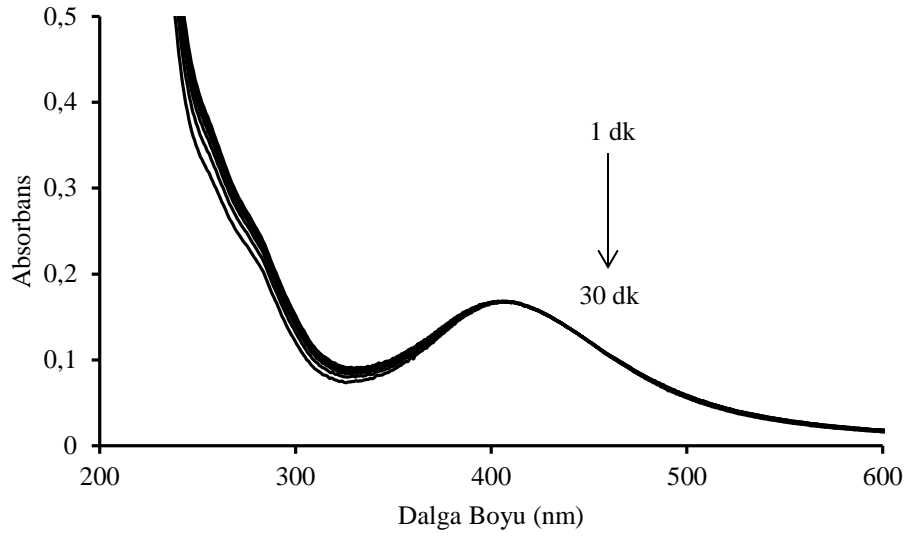
Şekil 4.198. $AgGSHHg^{2+}TRY$, $AgGSH$, $AgGSH$ ve Hg^{2+} , $AgGSH$ ve TRY , TRY , TRY ve Hg^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



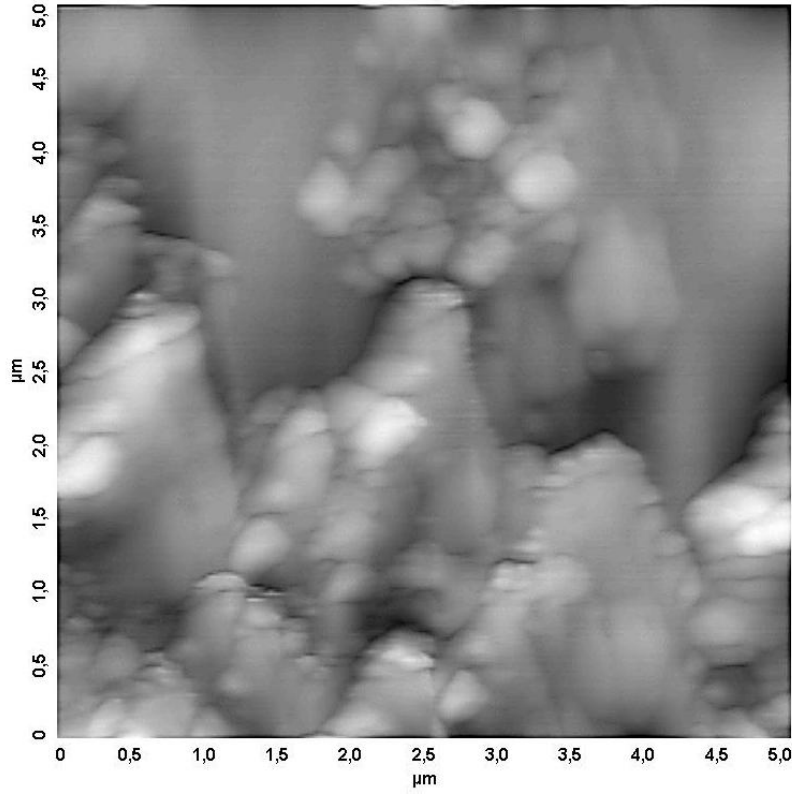
Şekil 4.199. Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.199(Devam). Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.200. Zamanla değişen AgGSHHg^{2+} TRY absorbansları



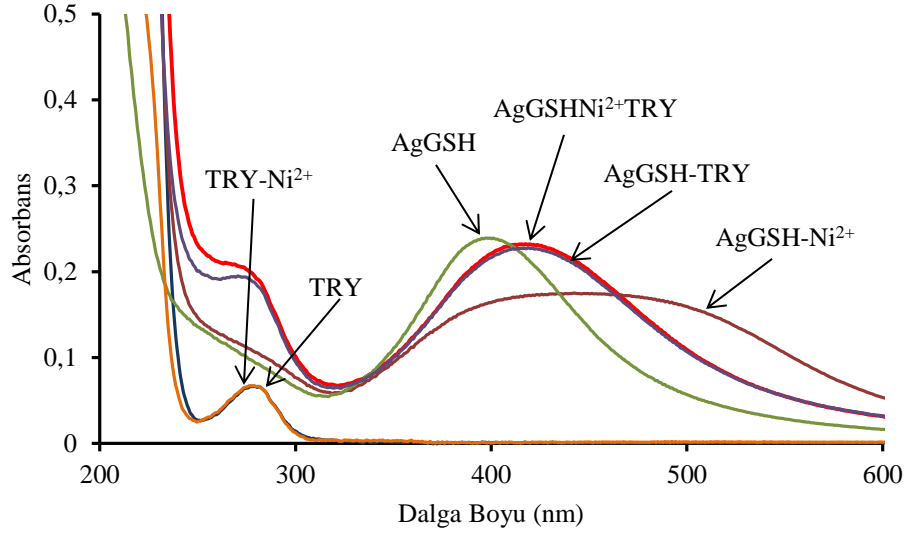
Şekil 4.201. AgGSHHg²⁺TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.3.3. Ni²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini

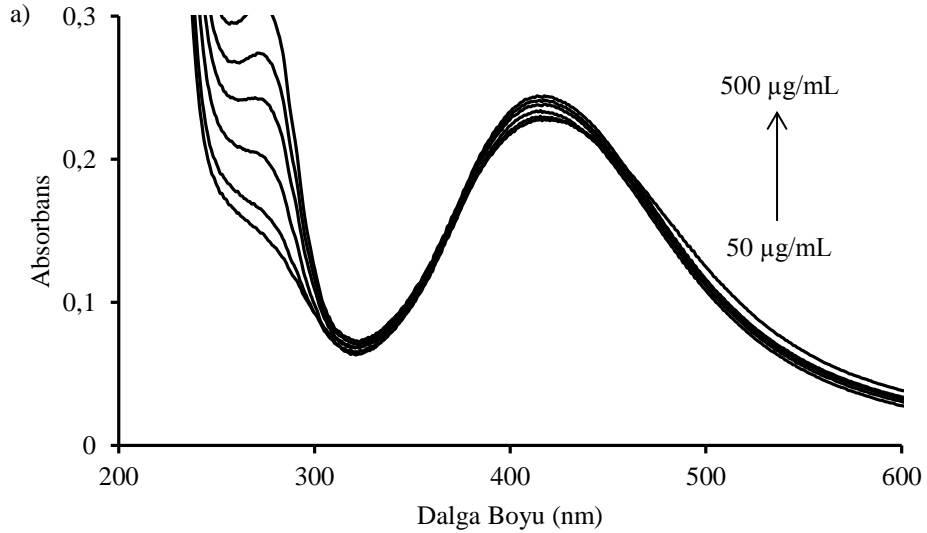
AgGSHNi²⁺TRY, AgGSH, AgGSH ve Ni²⁺, AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Ni²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.202’de gösterilmektedir. AgGSH ve Ni²⁺ etkileşimi nedeniyle çözelti karışımlarının absorpsiyon piki genişlemiştir. TRY-Ni²⁺ ve TRY çözeltilerinin absorpsiyon şiddeti hemen hemen aynı çıkmıştır. AgGSHNi²⁺TRY çözeltisinin absorpsiyon piki 415,5 nm’de çıkmış olup şiddeti AgGSH-TRY çözeltisinin absorpsiyon şiddetinden daha fazladır. AgGSHNi²⁺TRY kompleks etkileşiminin zayıf olduğu görülmektedir. AgGSHNi²⁺TRY çözeltisinin ölçülen pH’ı 8,10’dur.

Şekil 4.203’deki kalibrasyon doğrusu, 415,5 nm’deki absorbans değişimlerinin 50 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Ni²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks

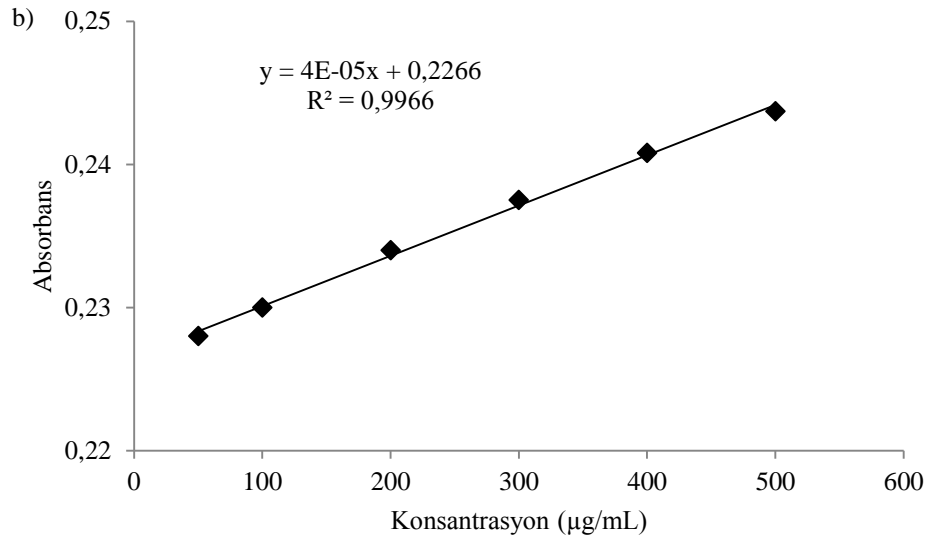
miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.204'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.205'de gösterilen $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{TRY}$ kompleksine ait AFM görüntüsünde taneciklerin agrege olduğu görülmektedir.



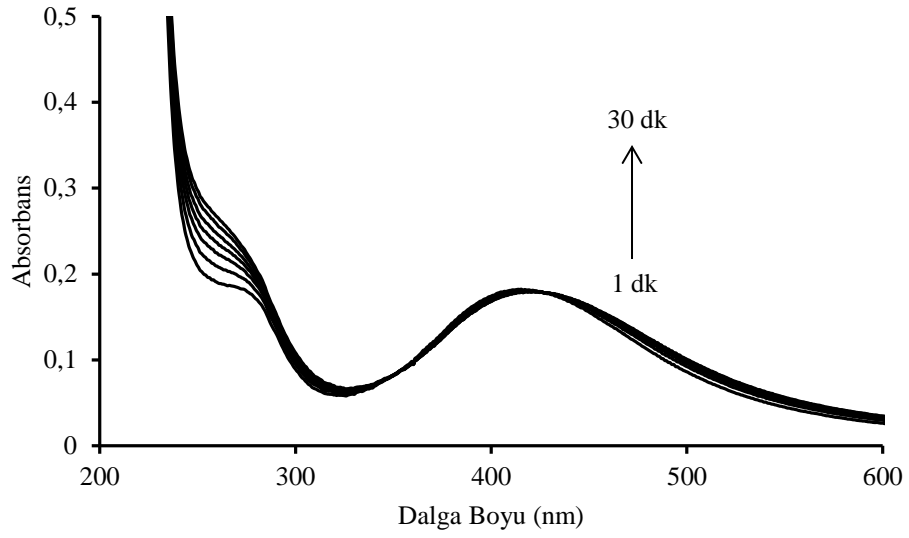
Şekil 4.202. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{TRY}$, AgGSH , AgGSH ve Ni^{2+} , AgGSH ve TRY , TRY , TRY ve Ni^{2+} iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



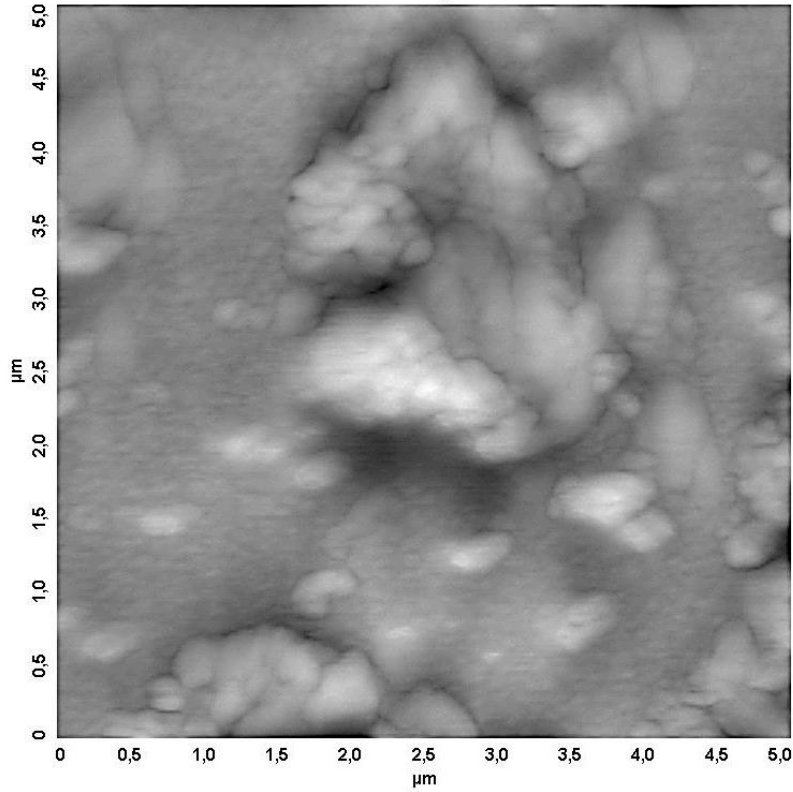
Şekil 4.203. Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.203(Devam). Ni^{2+} iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.204. Zamanla değişen $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{TRY}$ absorbansları



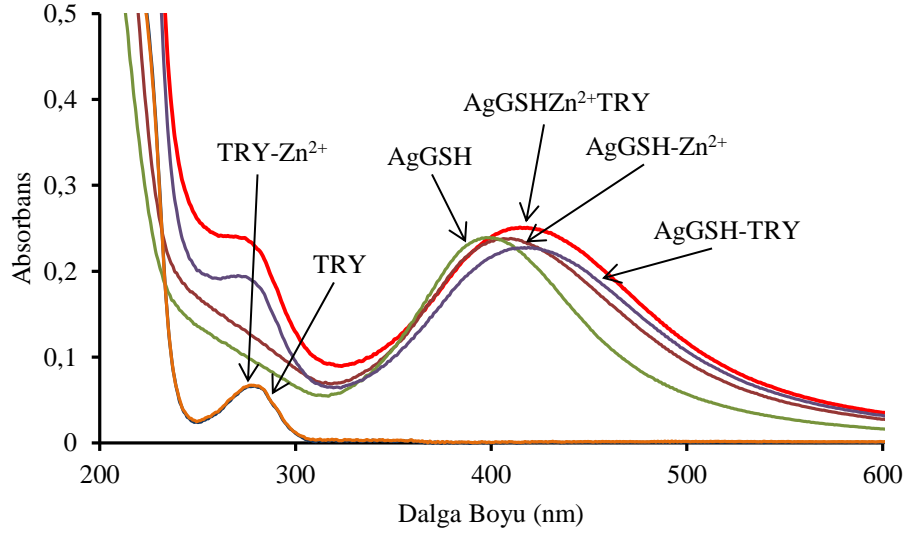
Şekil 4.205. AgGSHNi²⁺TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 µm)

4.4.3.4. Zn²⁺ iyonu bulunan ortamda tripsin tayini

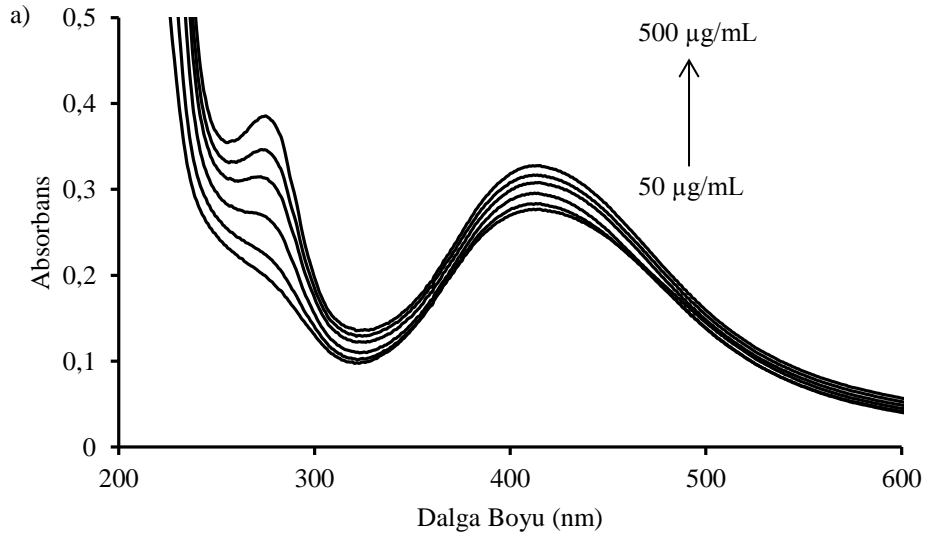
AgGSHZn²⁺TRY, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları Şekil 4.206'da gösterilmektedir. AgGSH-Zn²⁺ çözeltisinin absorpsiyon piki genişleyerek kırmızıya kaymıştır. TRY-Zn²⁺ ve TRY çözeltilerinin absorpsiyon pikleri hemen hemen örtüşmüştür. AgGSHZn²⁺TRY çözeltisinin absorpsiyon şiddeti artarak 412,5 nm'ye kaymıştır. AgGSHZn²⁺TRY çözeltisinin ölçülen pH'ı 7,43'dür.

Şekil 4.207'deki kalibrasyon doğrusu, 412,5 nm'deki absorbans değişimlerinin 50 – 500 µg/mL konsantrasyon aralığına karşı grafiğe geçirilmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayısı grafik üzerinde gösterilmiştir. AgGSH-Zn²⁺ etkileşiminden kaynaklanan pik genişlemesi kompleks miktarının artması ile azalmıştır. Zamanın etkileşim hızına ve absorbansa etkisi Şekil 4.208'de gösterilmiştir. Kompleksleşme miktarının artması nedeniyle absorpsiyon

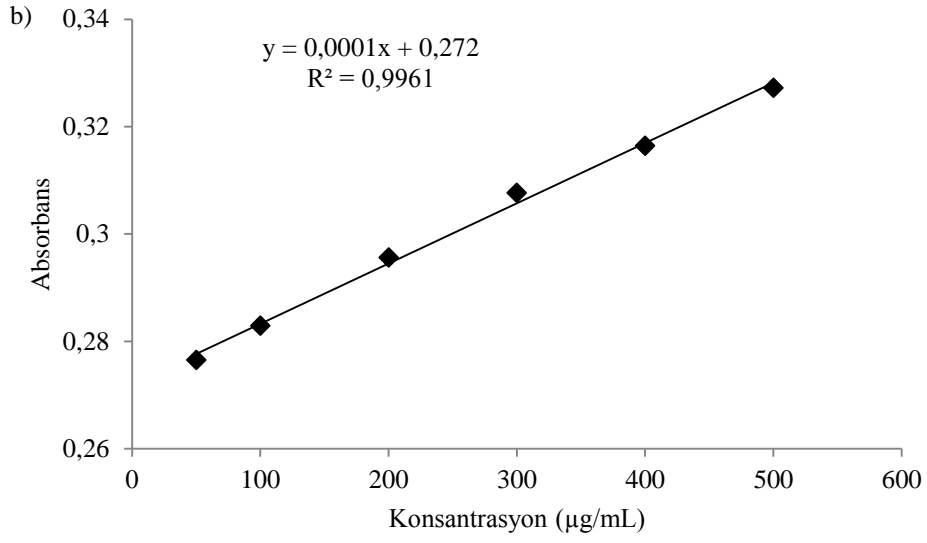
şiddeti az da olsa artmıştır. Şekil 4.209’da gösterilen AFM görüntüsünde yapının agregasyona uğradığı görülmektedir.



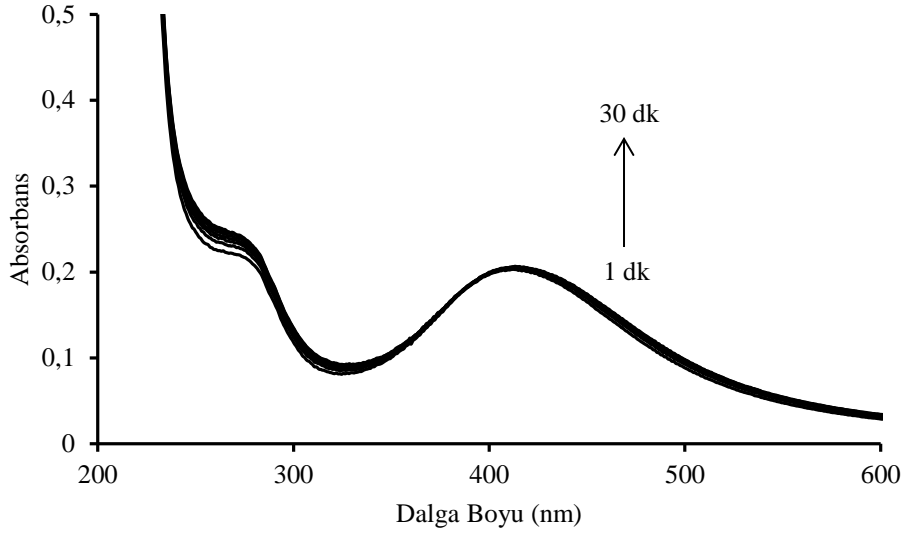
Şekil 4.206. AgGSHZn²⁺+TRY, AgGSH, AgGSH ve Zn²⁺, AgGSH ve TRY, TRY, TRY ve Zn²⁺ iyonu çözelti karışımlarının absorpsiyon spektrumları



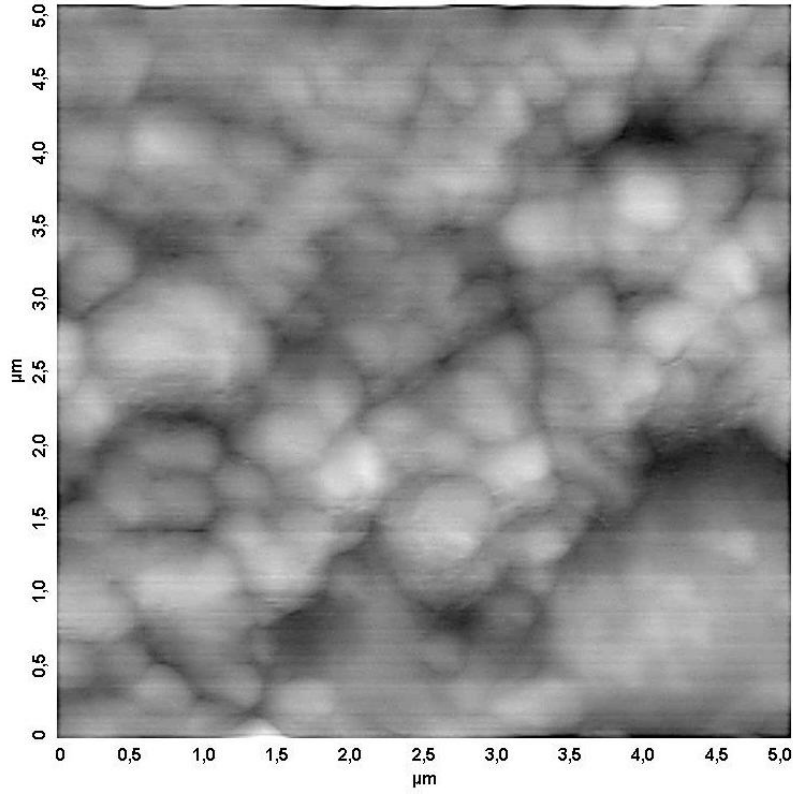
Şekil 4.207. Zn²⁺ iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorpsiyon değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



Şekil 4.207(Devam). Zn^{2+} iyonu bulunan ortamda artan TRY konsantrasyonlarındaki absorbans değişimi (a), kalibrasyon doğrusu (b)



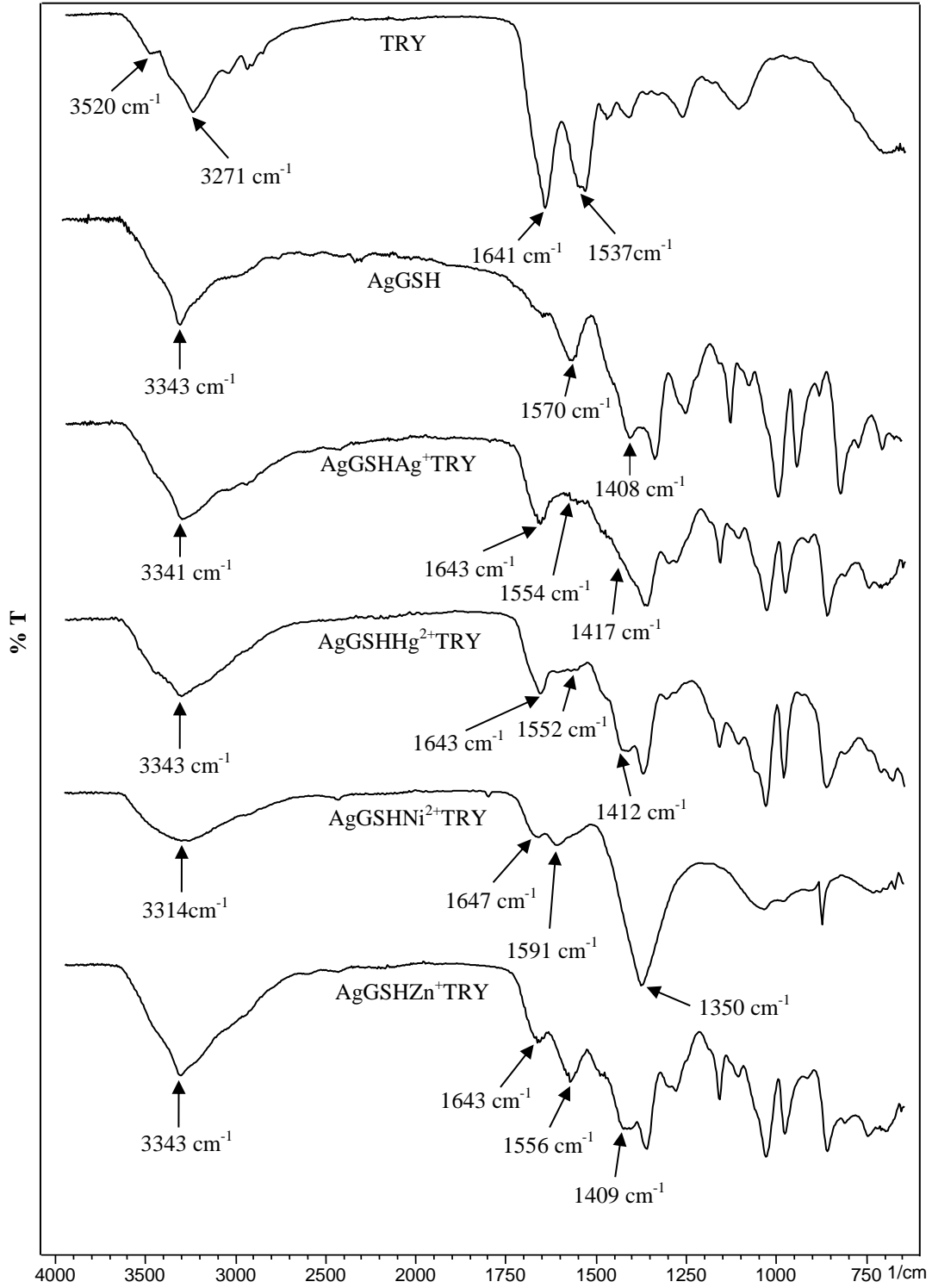
Şekil 4.208. Zamanla değişen $\text{AgGSHZn}^{2+}\text{TRY}$ absorbansları



Şekil 4.209. AgGSHZn²⁺TRY yapısının AFM görüntüsü (5x5 μm)

4.4.3.5. Tripsin için alınan FTIR spektrumları

Şekil 4.210’da gösterilen TYR spektrumunda 3281 ve 3069 cm⁻¹’de bulunan pikler –NH gerilme titreşimleri nedeniyle oluşan piklerdir. 1641 cm⁻¹’de görülen pik –C=O gerilme titreşiminden oluşan amit I pikidir. 1537 cm⁻¹’de görülen pik ise –NH eğilme ve –C-N gerilme titreşiminden kaynaklanan piklerin birleşmesi ile oluşmuştur. AgGSH spektrumunda –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan 3343 cm⁻¹’deki pikin, AgGSHNi²⁺TRY spektrumu haricindeki spektrumlarda kayda değer bir kaymaya maruz kalmadığı gözlenmiştir. AgGSHNi²⁺TRY spektrumundaki pikin ise kaybolduğu ve –OH’dan kaynaklanan 3314 cm⁻¹’deki pikin ortaya çıktığı görülmektedir. TRY yapısında bulunan amin titreşim pikleri ise kayarak –NH₃⁺ grubundan kaynaklanan pikin içine gömülmüştür. AgGSH’in –NH₃⁺ grubunun AgGSHNi²⁺TRY kompleksi dışındaki komplekslerde etkileşime katılmadığı, TRY yapısında bulunan amin gruplarının ise katıldığı görülmektedir.



Şekil 4.210. TRY, AgGSH, AgGSH-metal iyonu-TRY yapılarının çözücü buharlaştırılması sonrasında elde edilen FTIR spektrumları

TRY yapısında 1641 cm⁻¹'de bulunan amit I pikinin diğer spektrumlarda kayda değer bir kaymaya uğramadığı görülmüştür. Amit II piki ise AgGSHAg⁺TRY

spektrumunda 1554 cm^{-1} , $\text{AgGSHHg}^{2+}\text{TRY}$ spektrumunda 1552 cm^{-1} , $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{TRY}$ spektrumunda 1591 cm^{-1} , $\text{AgGSHZn}^{2+}\text{TRY}$ spektrumunda 1556 cm^{-1} 'de çıkmıştır. Amit II pikinin tüm spektrumlarda kaydığı ve şiddetinin azaldığı görülmüştür. Bu sonuç TRY'nin $-\text{NH}$ grupları ile etkileşime girdiğini göstermektedir. AgGSH spektrumunda 1408 cm^{-1} 'de görülen karboksilat pikinin tüm spektrumlarda $1 - 5\text{ cm}^{-1}$ arasında kaymaya uğraması bu grubun zayıf etkileşimlere girdiğini veya hiç girmediğini göstermektedir. $\text{AgGSHNi}^{2+}\text{TRY}$ spektrumunda bahsi geçen pik nitrat grubundan kaynaklanan 1350 cm^{-1} 'deki pikin içerisine gömülmüştür. AgGSH spektrumunda 1570 cm^{-1} 'de bulunan asimetric karboksilat piki ise kayarak amit pikleri ile örtüşmüştür.

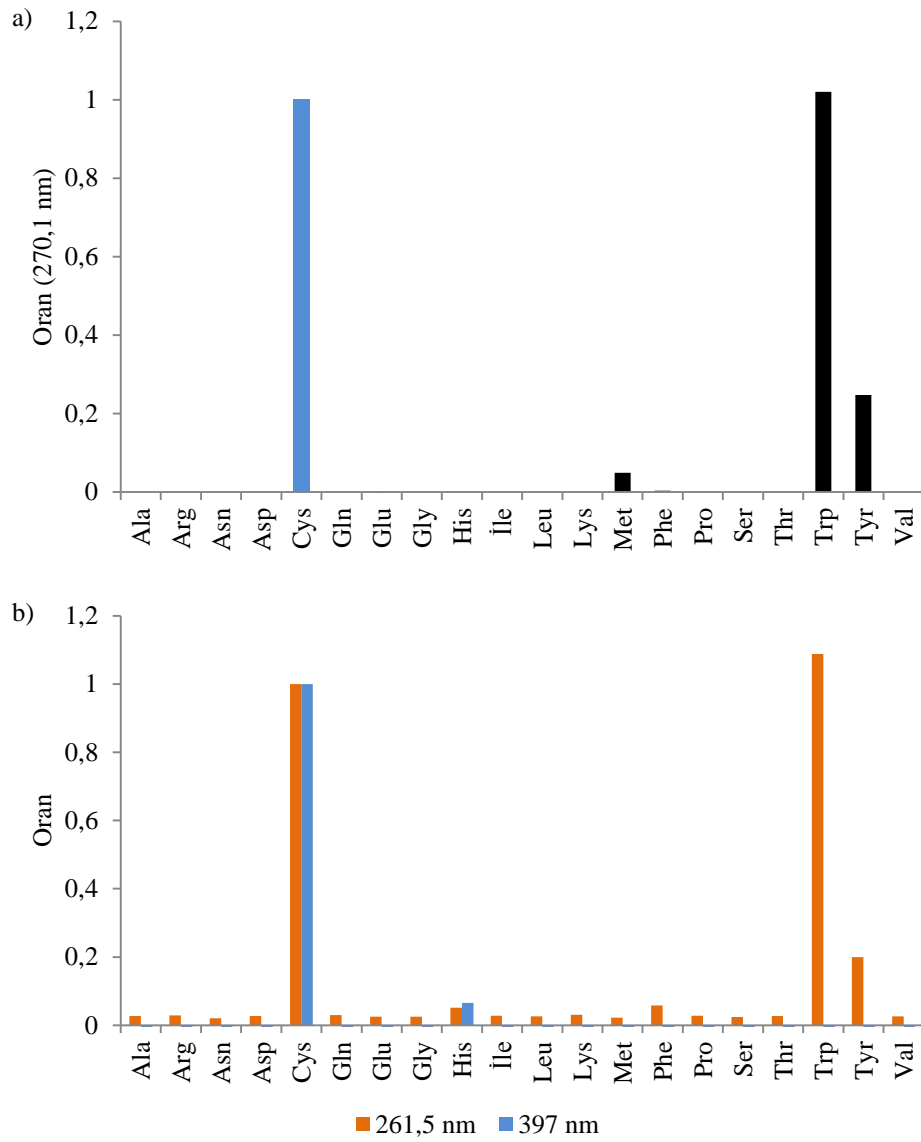
Try'nin normal yapısına beta tabaka ve alfa sarmal yapısı hakimdir. TRY'nin en kararlı olduğu pH, 3 olarak belirtilmiştir. Daha asidik pH'larda (pH 3'ün altı) ve yüksek pH'larda (pH 10'un üstü) ise denatürasyon ve agregasyondan dolayı konformasyonel değişmelere uğradığı belirtilmektedir [514, 515]. Nötral pH'larda ise otolizden dolayı kararlı kalamamaktadır. Otolizi geciktirmek veya önlemek için Ca^{2+} iyonları kullanılmaktadır. Ca^{2+} iyonu kullanımı ile enzimin aktivitesi de korunmaktadır. Tayinde kullanılan Ag^+ , Hg^{2+} , Ni^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ise TRY üzerinde inhibisyon etkisi yapmaktadır. Substrat ile aynı bölgelere bağlanarak enzimin yapısının korunmasına neden olmaktadır. Bu durum metal iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması ve Ca^{2+} iyonlarının ortama ilave edilmesi ile TRY'nin aktivitesini tekrar kazanması ile literatürde kanıtlanmıştır [516]. Çalışılan pH aralığında (7,43 – 8,25) metal iyonu etkileşimleri sayesinde TRY'nin kararlı kaldığı ve meydana gelen etkileşimlerin TRY'nin normal konformasyonu ile oluştuğu söylenebilir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

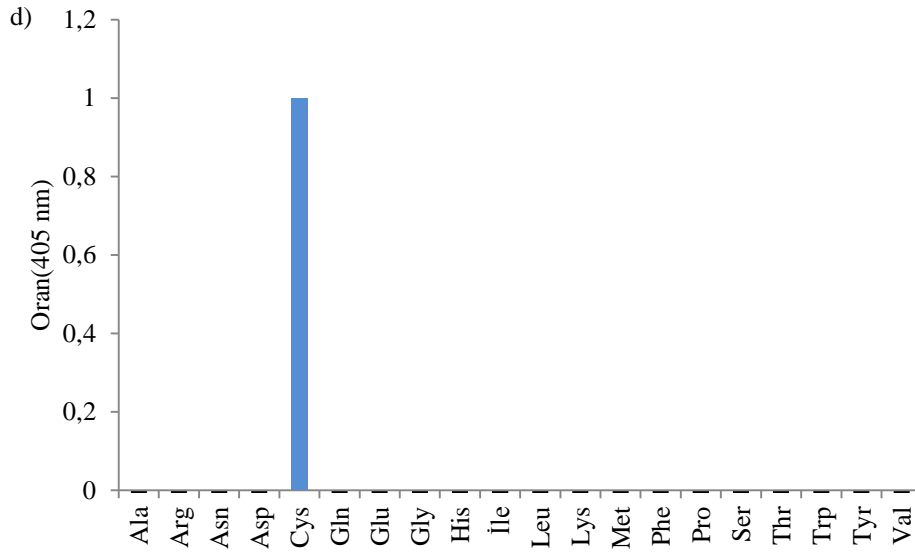
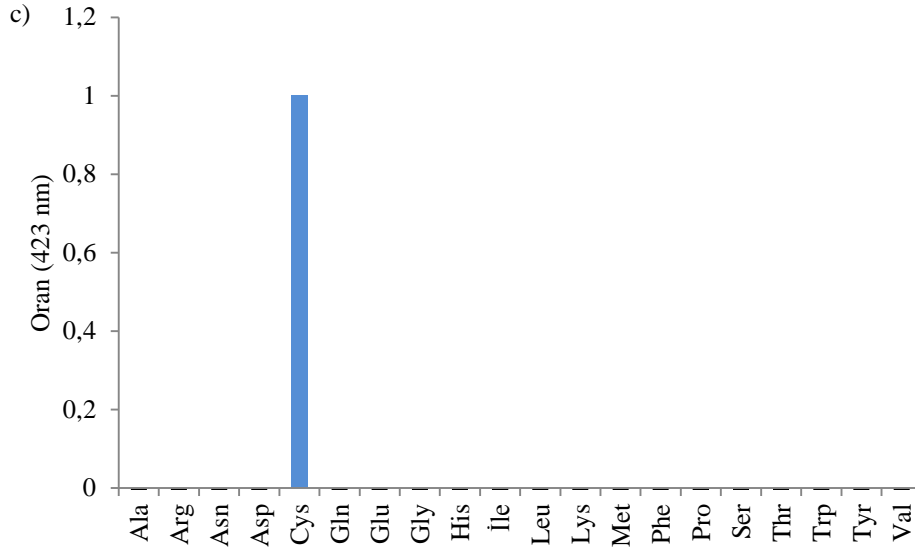
Yapılan denemelerin sonucunda amino asit tayinlerinde en çok etkileşime katılan iyonun Hg^{2+} (Cys, His, Arg, Lys, Met) olduğu ortaya çıkarken, Co^{2+} (Cys, His, Arg, Lys), Cu^{2+} (Cys, His), Cd^{2+} (Cys) ve Ni^{2+} (Cys) iyonları ise Hg^{2+} iyonunu takip etmişlerdir. Ni^{2+} ve Cd^{2+} iyonlarının amino asitler içerisinde sadece sistein ile etkileşim vermesi önemli bir sonuç olup diğer amino asitlerin yapacağı girişim etkisini ortadan kaldırmaktadır. Etkileşim veren türlerin birbirine yapacakları girişim etkisi verdikleri absorpsiyonların oranlanması ile incelenebilir (Şekil 5.1). Girişim etkisini incelemek için kullanılan formül şu şekildedir;

$$O = \frac{A'_{AgGSH-Metal\ iyonu-Amino\ asit} - A_{AgGSH}}{A_{AgGSH-Metal\ iyonu-Amino\ asit} - A_{AgGSH}}$$

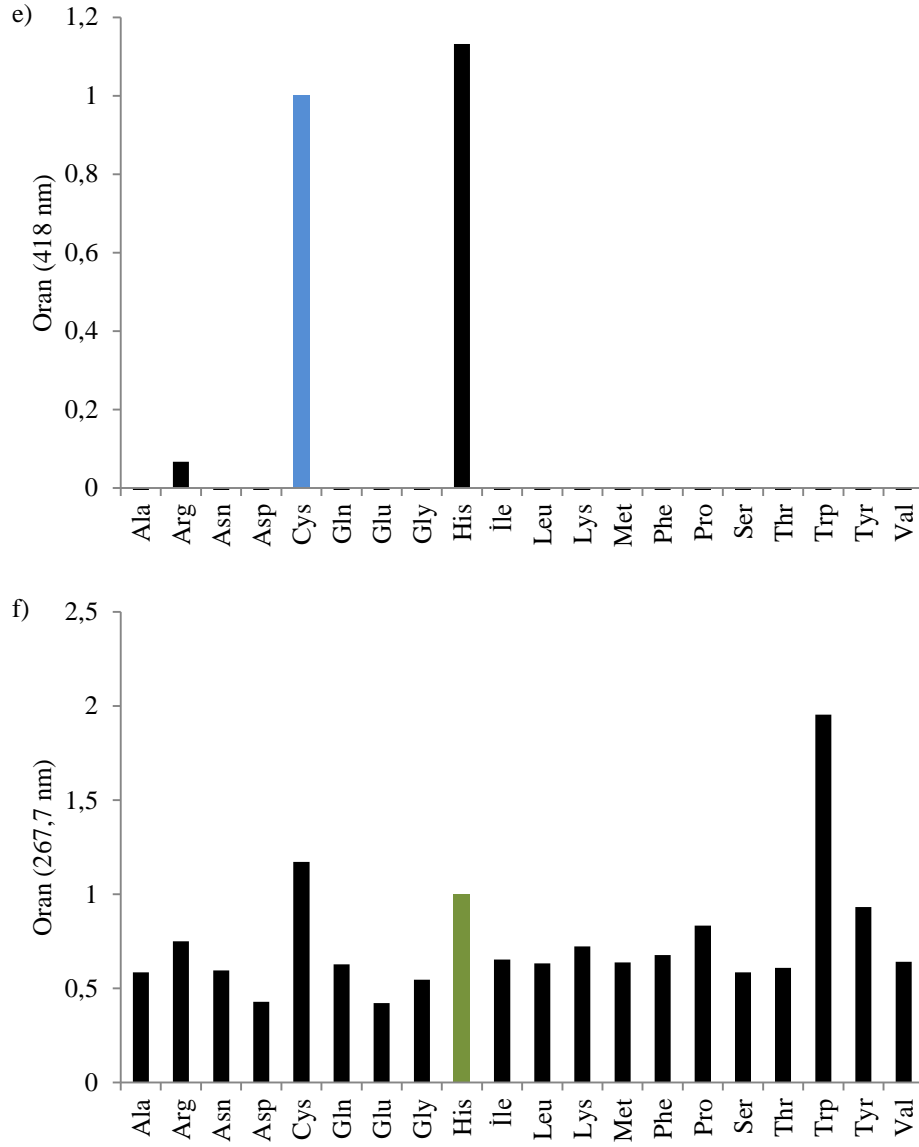
Formülde O; oran, $A'_{AgGSH-Metal\ iyonu-Amino\ asit}$; kullanılan amino asitlerin çalışılan dalga boyundaki absorpsiyonu, A_{AgGSH} ; modifiye gümüş nanoparçacıklarının çalışılan dalga boyundaki absorpsiyonu, $A_{AgGSH-Metal\ iyonu-Amino\ asit}$; tayini gerçekleştirilen amino asidin çalışılan dalga boyundaki absorpsiyonunu ifade etmektedir.



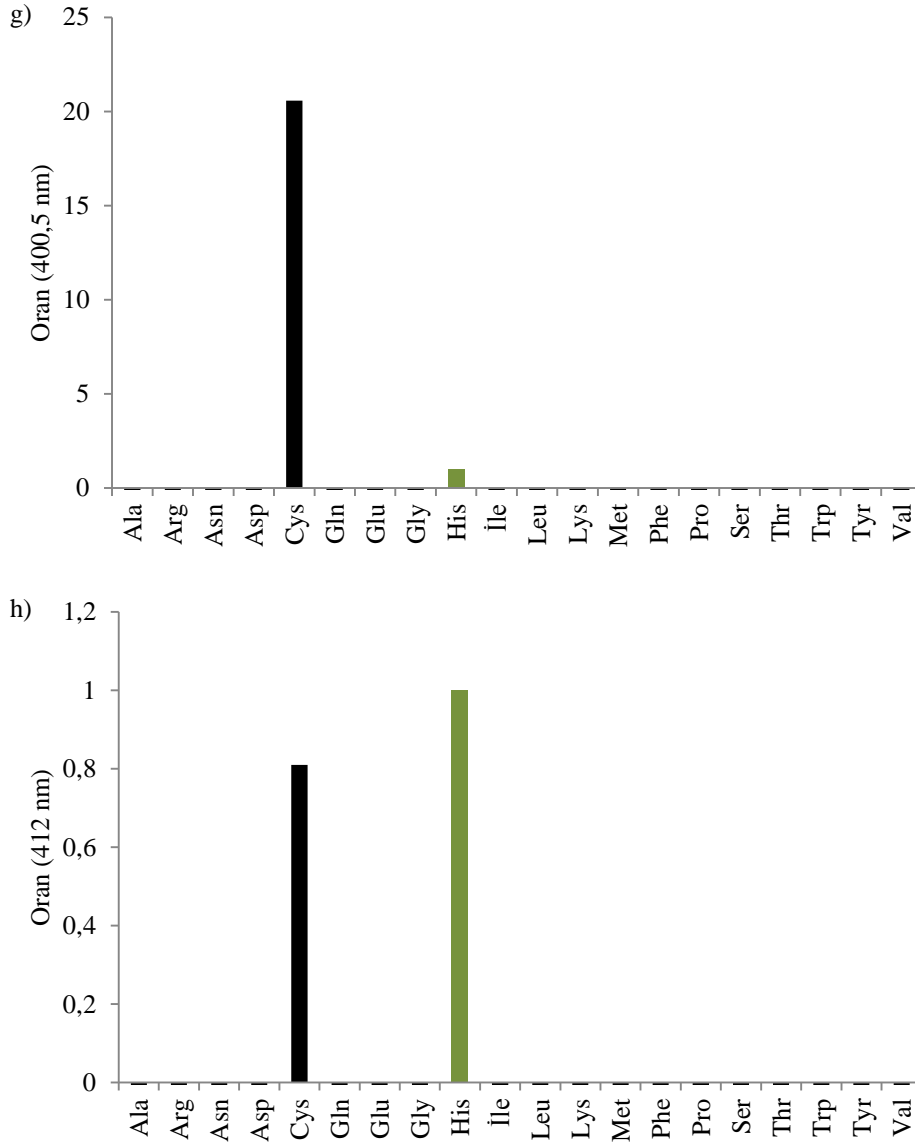
Şekil 5.1. Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)



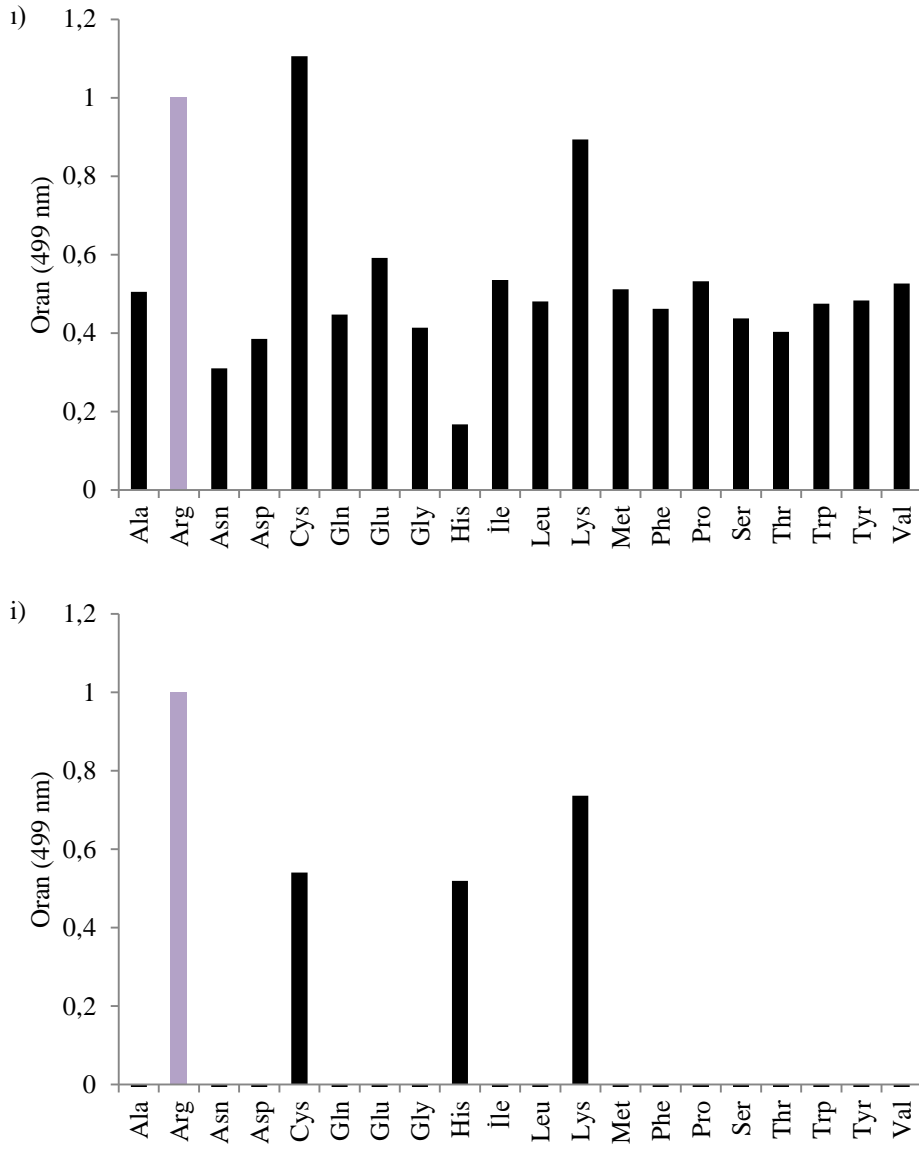
Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)



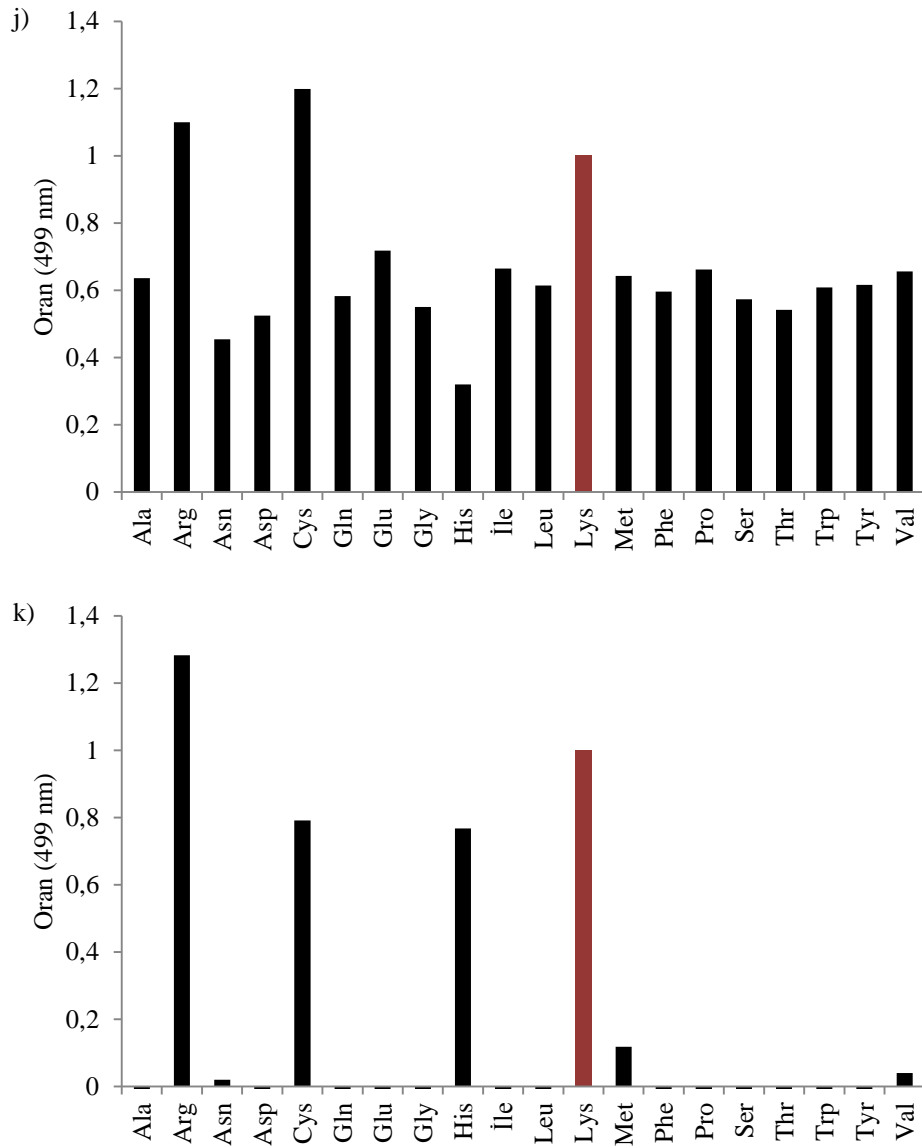
Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)



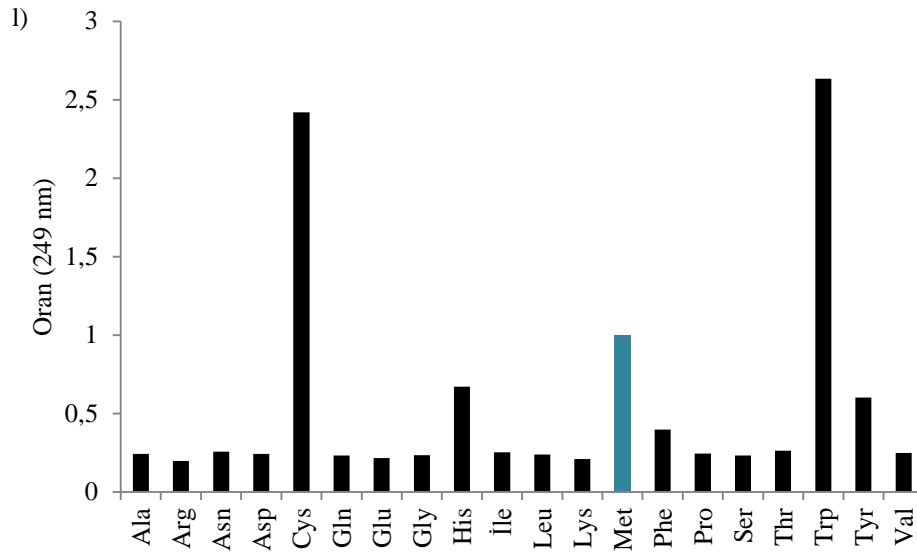
Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)



Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)

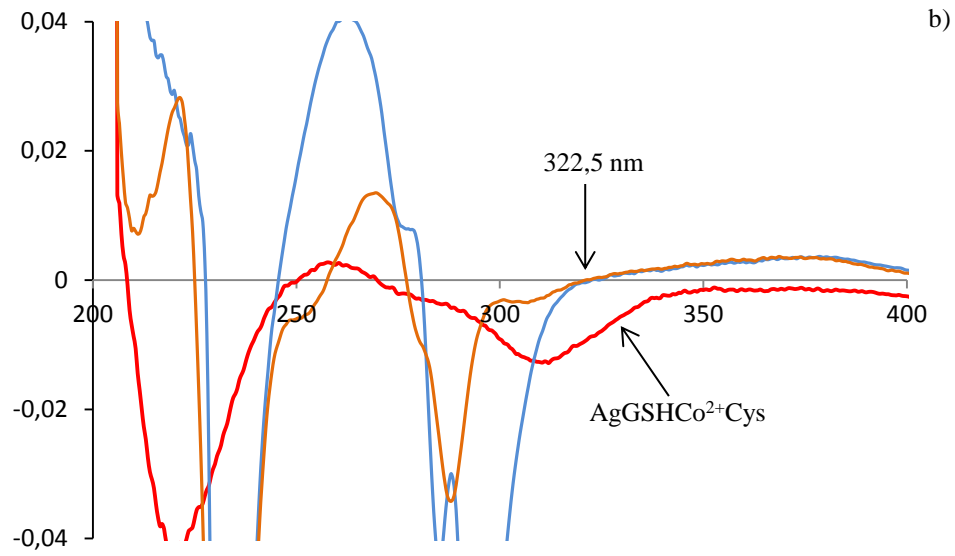
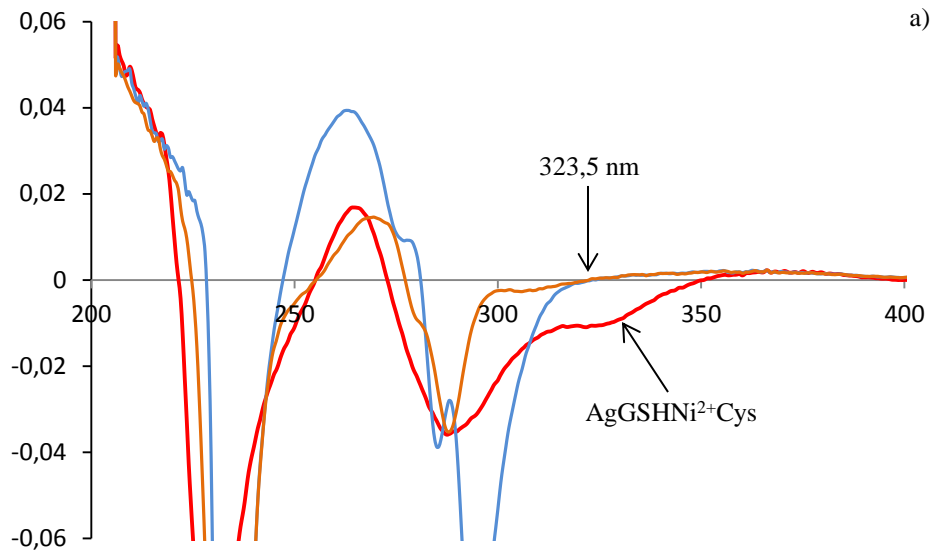


Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)

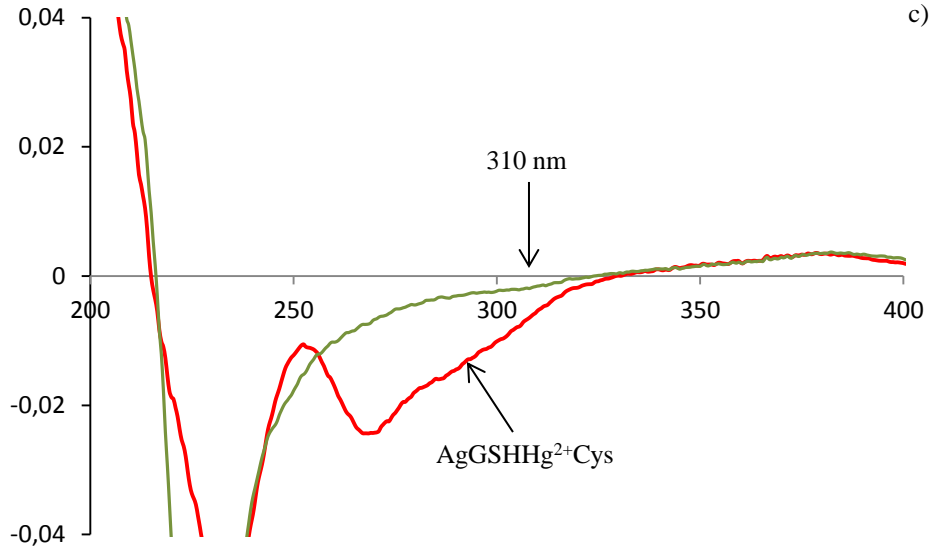


Şekil 5.1(Devam). Girişim grafikleri; AgGSHNi²⁺Cys (a); AgGSHCo²⁺Cys (b); AgGSHCd²⁺Cys (c); AgGSHCu²⁺Cys (d); AgGSHHg²⁺Cys (e); AgGSHCu²⁺His (f); AgGSHCo²⁺His (g); AgGSHHg²⁺His (h); AgGSHCo²⁺Arg (i); AgGSHHg²⁺Arg (i); AgGSHCo²⁺Lys (j); AgGSHHg²⁺Lys (k); AgGSHHg²⁺Met (l)

Ni²⁺ iyonu bulunan ortamda gerçekleştirilen Cys tayininde Tyr'nin ve özellikle Trp'nin girişimi söz konusudur. Daha önce de belirtildiği gibi bu girişimler etkileşimden dolayı gerçekleşmemiş, Tyr ve Trp'nin halkalı gruplarının absorpsiyonu neticesinde oluşmuştur. Bu amino asitlerin absorpsiyon spektrumlarının örtüşmesi türev spektroskopisi ile kolaylıkla çözülebilir (Şekil 5.2). Şekil 5.2a'dan da görülebileceği gibi 323,5 nm'de Trp ve Tyr absorbansları sıfıra yakınken AgGSHNi²⁺Cys absorbans farkı oluşturmuştur. Bu durum Cys, Trp ve Tyr'nin bir arada bulunduğu ortamlarda türev spektroskopisi kullanılarak Cys'nin hiçbir girişime maruz kalmadan tayin edilebileceğini göstermektedir. Tayin sınırları türev alınmamış haliyle aynıdır. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda ise UV bölgesinde Tyr ve Trp'nin girişimi söz konusuyken görünür bölgede yapılan tayinde sadece His amino asidinin çok az bir girişimi mevcuttur. Tyr ve Trp girişimi Ni²⁺ iyonunda olduğu gibi türev spektroskopisi ile çözülebilir. Şekil 5.2b'den de görülebileceği gibi 322,5 nm'de Tyr ve Trp'nin etkileri minimuma indirilebilmektedir. Hg²⁺ iyonu bulunan ortamda ise His amino asidinin kuvvetli bir girişimi söz konusudur. Bu spektrumlara da türev spektroskopisi uygulandığında His'in girişiminin 310 nm civarında azaltılabileceği görülmüştür (Şekil 5.2c). Cd²⁺ ve Cu²⁺ iyonları bulunan ortamda ise hiçbir amino asidin girişim yapmadığı görülmüştür.

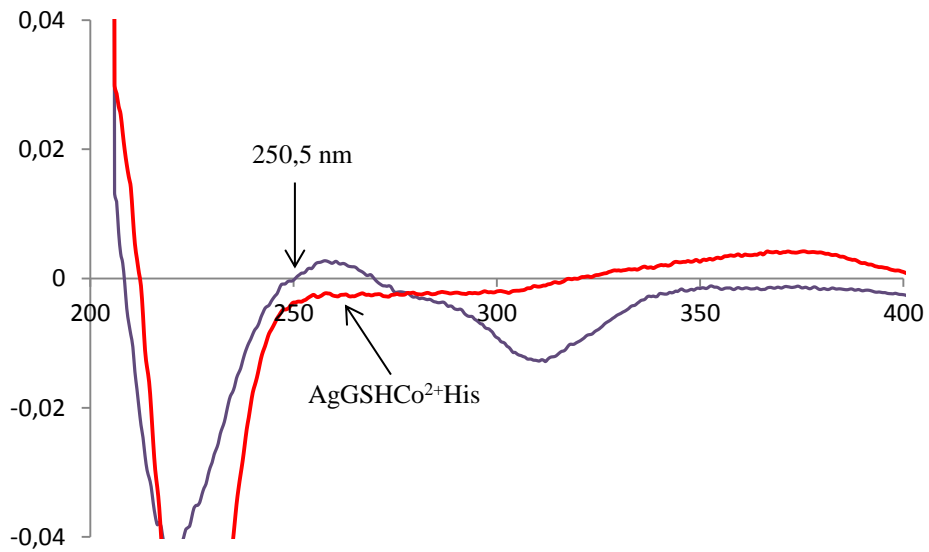


Şekil 5.2. AgGSHNi²⁺Cys, AgGSHCo²⁺Cys ve AgGSHHg²⁺Cys için uygulanan türev spektroskopisinin grafiği



Şekil 5.2(Devam). AgGSHNi²⁺Cys, AgGSHCo²⁺Cys ve AgGSHHg²⁺Cys için uygulanan türev spektroskopisinin grafiği

His denemelerinde ise Cu²⁺ iyonu bulunan ortamda yapılan denemelere pek çok aminosidin girişim yaptığı görülmektedir. Co²⁺ ve Hg²⁺ iyonları bulunan ortamlarda ise Cys'nin girişimi söz konusudur. Co²⁺ iyonu bulunan ortamda türev spektroskopisi ile 250,5 nm'de Cys etkisi bertaraf edilebilirken (Şekil 5.3) Hg²⁺ için aynı durum söz konusu olmamıştır. Cu²⁺ ve Hg²⁺ bulunan ortamlarda His miktarının diğer amino asitlere göre artırılması ile tayin gerçekleştirilebilir.



Şekil 5.3. AgGSHCo²⁺His için uygulanan türev spektroskopisinin grafiği

Arg ve Lys tayinlerinde ise Co^{2+} iyonu bulunan ortamda diğer amino asitlerin girişimlerinin fazla olduğu görülmektedir. Hg^{2+} iyonu bulunan ortamda ise Cys ve His'in yanında Arg ve Lys'nin birbirine girişimi söz konusudur. Uygulanan türev spektroskopisi ile de girişimler bertaraf edilememiştir. Bu amino asitlerin bir arada bulunduğu ortamda tayin gerçekleştirmenin zor olduğu, diğer amino asitlerin bulunduğu ortamlarda tayinin gerçekleştirilebileceği sonucu çıkarılabilir. Benzer durum Hg^{2+} bulunan ortamda Met tayini için de geçerli olup Cys, His, Trp ve Tyr girişimleri türev spektroskopisi ile de çözülememiştir.

Protein ve enzim tayinlerinde ise Zn^{2+} iyonu, denenen tüm bileşenlerle etkileşim vermiştir. Zn^{2+} iyonunu Ni^{2+} (CK, BSA, LZ, TRY), Cd^{2+} (BSA, αLA , CK), Cu^{2+} (BSA, αLA , LZ), Hg^{2+} (BSA, LZ, TRY), Ag^{2+} (CK, LZ, TRY), Co^{2+} (CK, LZ) ve Fe^{3+} (αLA , LZ) iyonları takip etmiştir. Etkileşim sonrası üçlü kompleks oluşması, sadece iki bileşenin birbirine ilgisinin tayin için yeterli olmaması gerçekleşen kompleksler için metal iyon seçiciliği oluşturmuştur. Diğer metal iyonları ve biyolojik maddelerin tümü için etkileşimin gerçekleşmediği düşünülmemelidir. Bazı denemelerde gerekli güçlü etkileşimlerin kurulamaması nedeniyle absorbans düzensizlikleri görülmüştür ve kantitatif tayin için gereken kalibrasyon doğrusu oluşturulamamıştır. Bazı kalibrasyon grafiklerinde görülen düşük absorbans farkları kantitatif analiz esnasında hataya yol açabilecek düzeydedir. Bu durumun, oluşacak kompleksler için reaksiyon süresinin uzatılması ile kısmen çözülebileceği düşünülmektedir. Amino asit tayinlerinde önerilen kompleks yapılar her ne kadar FTIR spektrumlarının yorumlanması ile desteklenmeye çalışılsada muhtemel yapılardan öteye gidememektedir. GSH ve aminoasitlerin pek çok fonksiyonel gruba sahip olması nedeniyle, oluşacak kompleksler için birden fazla olasılıktan bahsedilebilir. Literatür kullanılarak önerilen kompleks yapılarda Ni^{2+} ve Cu^{2+} için dört, Co^{2+} ve Cd^{2+} için altı koordinasyon sayısı benimsenmiştir. Hg^{2+} iyonu içeren kompleksler için koordinasyon sayısı iki olarak bilinsede literatürde dört ve altı koordinasyon sayısına sahip kompleksler olduğu görülmüş ve önerilen yapılarda altı koordinasyon sayısı benimsenmiştir.

Tablo 5.1. Sonuçların literatür ile karşılaştırılması

	Tayin Aralığı (μM)	Dalga Boyu (nm)	Doğru Denklemi	R^2
Sistein Tayini				
AgGSHNi ²⁺ Cys	100 – 1000	270,1	$y=0,012x+0,096$	0,9999
AgGSHCo ²⁺ Cys	10 – 100	261,5	$y=0,0011x+0,162$	0,9985
	100 – 1000	397	$y=0,01x+0,1897$	0,9991
AgGSHCd ²⁺ Cys	100 – 600	423	$y=0,0001x+0,2555$	0,9987
AgGSHCu ²⁺ Cys	200 – 900	405	$y=8E-5x+0,227$	0,9935
AgGSHHg ²⁺ Cys	300 – 500	418	$y=0,0002x+0,1233$	0,9962
[333]	10 – 1000	-	$y=9,4107x-0,0391$	0,9973
[334]	0,8 – 80,0	-	-	0,998
[335]	2 – 12	-	$y=1,54x-0,06$	0,995
[336]	10 – 100	-	-	0,997
[337]	0 – 100	-	-	0,9979
[338]	0,001 – 7,000	-	$y=219,5x+1969,7$	0,9947
[339]	0,1 – 0,5	-	$y=-4,20x10^5x+0,202$	0,999
[340]	50 – 250	-	$y=0,000117x+0,000164$	0,9997
[341]	0,05 – 90,00	-	$y=0,474x-0,024$	0,998
Histidin Tayini				
AgGSHCu ²⁺ His	100 – 500	267,7	$y=0,0005x+0,5719$	0,9997
AgGSHHg ²⁺ His	400 – 700	412	$y=7E-05x+0,2602$	0,998
AgGSHCo ²⁺ His	600 – 1000	400,5	$y=7E-05x+0,2602$	0,9925
[243]	0,001 – 0,100	-	$y=-14,932x-45,323$	0,9843
[244]	0,13 – 0,77	-	-	0,997
[245]	0,5 – 1000,0	-	$y=9,62x10^{-7}x-139,40$	0,9998
[246]	50 – 5000	-	$y=1,010x+0,017$	0,997
[247]	0,02 – 200	-	-	0,999
Arginin Tayini				
AgGSHCo ²⁺ Arg	60 – 700	499	$y=4E-05x+0,1446$	0,9959
AgGSHHg ²⁺ Arg	100 – 500	499	$y=0,0002x+0,0499$	0,9902
[105]	275 - 18340	-	-	0,9999
[106]	29 – 574	-	$y=0,012x+0,017$	0,999
[108]	0,01 – 1,00	-	-	-
[111]	100 – 30000	-	-	-
Lisin Tayini				
AgGSHCo ²⁺ Lys	100 – 800	499	$y=4E-05x+0,1434$	0,9912
AgGSHHg ²⁺ Lys	100 – 800	499	$y=0,0001x+0,0392$	0,9926
[282]	0 – 500	500	$y=0,8585x+0,0455$	0,9999
[284]	7 – 130	-	$y=0,0199x+0,0181$	0,9997
[286]	1000 - 50000	-	-	0,995
[287]	0,8 – 10,0	-	$y=-0,00431x+0,04086$	0,9975
Metyionin Tayini				
AgGSHHg ²⁺ Met	10 – 100	249	$y=0,0004x+0,2317$	0,9928
	100 – 1000		$y=0,0003x+0,25$	0,9956
[297]	0,4 – 7,0	-	$y=12,471x+56,127$	0,995
[298]	100 – 30000	-	-	0,999
[299]	100 – 500	-	-	-
[301]	$1,4x10^{-3} - 67,0$	-	$y=0,0019x+0,0670$	0,9996

Tablo 5.1(Devam). Sonuçların literatür ile karşılaştırılması

	Tayin Aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	Dalga Boyu (nm) (A)	Doğru Denklemi	R ²
BSA Tayini				
AgGSHCd ²⁺ BSA	5 – 200	410	y=0,0002x+0,2629	0,9972
AgGSHCu ²⁺ BSA	10 – 400	403	y=9E-05x+0,3365	0,9966
AgGSHHg ²⁺ BSA	200 – 500	394	y=4E-05x+0,2859	0,9985
AgGSHNi ²⁺ BSA	50 – 500	412	y=5E-05x+0,2147	0,9951
AgGSHZn ²⁺ BSA	100 – 500	404	y=3E-05x+0,3155	0,998
[396]	0,01 – 2,00	-	y=139,65x+1,57	0,9961
[398]	9,6 – 124,8	-	y=0,34x+0,38	0,9990
[400]	0,01 – 5,00	-	y=2,75x10 ⁸ x+43,10	0,9932
α-laktalbumin Tayini				
AgGSHCd ²⁺ α LA	50 – 400	409,5	y=0,0001x+0,2989	0,9988
AgGSHFe ³⁺ α LA	5 – 300	394,5	y=0,0003x+0,4536	0,9986
AgGSHCu ²⁺ α LA	5 – 200	405	y=0,0004x+0,3115	0,9982
AgGSHZn ²⁺ α LA	5 – 200	407,5	y=0,0001x+0,3054	0,9971
[408]	0,4 – 60,0	-	-	0,9994
[410]	0 - 10	-	y=1,2319x-0,168	0,9791
Kreatin Kinaz Tayini				
AgGSHAg ⁺ CK	5 – 100	410,5	y=0,0005x+0,2719	0,9993
AgGSHCd ²⁺ CK	5 – 500	407,5	y=0,0005x+0,2767	0,9966
AgGSHCo ²⁺ CK	5 – 200	408	y=0,0003x+0,2687	0,9968
AgGSHNi ²⁺ CK	5 – 500	411,5	y=0,0005x+0,2541	0,995
AgGSHZn ²⁺ CK	1 – 500	406	y=0,0004x+0,2751	0,9984
[430]	0,03 – 8,50	-	y=0,213x+46,101	0,985
[431]	1,40x10 ⁻³ – 0,14	-	y=1,1x10 ⁻⁵ x-6,1x10 ²	0,99
[432]	1,4x10 ⁻⁴ – 0,003	-	y=0,2267x+3,3x10 ⁻³	0,990
Lizozim Tayini				
AgGSHAg ⁺ LZ	10 – 300	419	y=0,0004x+0,2849	0,9951
AgGSHCd ²⁺ LZ	50 – 500	417	y=5E-05x+0,3293	0,9955
AgGSHCo ²⁺ LZ	50 – 400	418,5	y=5E-05x+0,3233	0,9918
AgGSHCu ²⁺ LZ	10 – 200	408,5	y=0,0004x+0,3149	0,9973
AgGSHFe ³⁺ LZ	50 – 500	404,5	y=8E-05x+0,4569	0,9967
AgGSHHg ²⁺ LZ	10 – 300	406,5	y=7E-05x+0,2835	0,9949
AgGSHNi ²⁺ LZ	50 – 500	414	y=7E-05x+0,285	0,9943
AgGSHZn ²⁺ LZ	50 – 500	411,5	y=7E-05x+0,3201	0,9952
[440]	0,08 – 2,00	-	y=66,54x-7,08	0,9988
[443]	10 – 100	280	y=0,006x+0,0141	0,9959
[444]	0,01 – 0,10	-	y=-22,69x-164,15	0,998
[445]	0,8 – 35,0	-	y=92,50x-107,82	0,9954
Tripsin Tayini				
AgGSHAg ⁺ TRY	10 – 500	420,5	y=0,0002x+0,2517	0,9965
AgGSHHg ²⁺ TRY	50 – 300	408,5	y=7E-05x+0,2172	0,9975
AgGSHNi ²⁺ TRY	50 – 500	415,5	y=4E-05x+0,2266	0,9966
AgGSHZn ²⁺ TRY	50 – 500	412,5	y=0,0001x+0,272	0,9961
[450]	0,01 – 100,00	-	-	0,992
[452]	5 – 14	-	-	0,9993
[453]	0,5 – 20,0	-	-	0,9967

Literatür taraması bölümünden de anlaşılacağı gibi nanoparçacık ve biyolojik molekül etkileşimlerinde absorpsiyon yöntemi kullanılabileceği gibi floresans ve saçılma yöntemleri de kullanılabilir. Bu tezde yapılan çalışmaların bazı bölümlerinin floresans ve saçılma yöntemlerine de uygun olduğu düşünülmektedir. Uygulanan yöntemin geçerliliği literatür çalışmalarında belirtilen tayin sınırları ile karşılaştırılması ile anlaşılabilir (Tablo 5.1). Literatür değerlerine bakıldığında belirtilen tayin sınırlarının, amino asit tayinleri için kabul edilebilir düzeyde, protein ve enzim tayinleri için ise nispeten yüksek kaldığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] FEYNMAN, RP., There's plenty of room at the bottom. J. Microelectromech S. 1992; 1:60-66.
- [2] TANIGUCHI, N., On the basic concept of nano-technology. Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, JSPE. 1974.
- [3] DREXLER, KE., Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. Proc. Natd. Acad. Sci. USA 1981; 78(9):5275-5278.
- [4] DREXLER, KE., Engines of creation the coming era of nanotechnology. Anchor Books, New York, 1986.
- [5] BINNIG G., ROHRER H., Scanning tunneling microscopy-from birth to adolescence. Physics. 1986; 389-409.
- [6] LIJIMA, S., Helical microtubules of graphitic carbon. Nature. 1991; 354:56-58.
- [7] BETTELHEIM, F. A., BROWN, W. H., CAMPBELL M. K., FARRELL S. O., Introduction to organic and biochemistry. Thomson, 306-307, USA, 2007.
- [8] CEYLAN, S., AKSU, Mİ., Free amino acids profile and quantities of sirt, bohca, sekerpare, pastirma, dry cured meat products. J. Sci. Food. Agric. 2011; 91:956-962.
- [9] FRANCO, D., GONZALEZ, L., BISPO, E., RODRIGUEZ, P., GARABAL, JI., MORENO, T., Study of hydrolyzed protein composition, free amino acid, and taurine content in different muscles of galician blonde beef. J.Muscle Foods. 2010; 21(4):769-784.
- [10] CHO, SH., SEONG, PN., KIM, JH., PARK, BY., BAEK, BH., LEE, YJ., IN, TS., LEE, JM., KIM, DH., AHN, CN., Calorie, cholesterol, collagen, free amino acids, nucleotide-related compounds and fatty acid composition of Hanwoo steer beef with 1(++) quality grade. Korean J.Food Sci. An. 2008; 28(3):333-343.

- [11] IMANARI, M., HIGUCHI M., SHIBA N., ATANABE A., Accurate analysis of taurine, anserine, carnosine and free amino acids in a cattle muscle biopsy sample. *Anim. Sci. J.* 2010; 81:369–376.
- [12] CHO, S., SEONG, P., KANG, G., PARK, BY., JUNG, S., KANG, S., KIM, Y., KIM, J., KIM, D., Meat quality and nutritional properties of hanwoo and imported australian beef. *Korean J.Food Sci. An.* 2011; 31(5):772-781.
- [13] SIRNY, RJ., GREENHUT IT., ELVEHJEM, CA., The Arginine and histidine content of meats. *J.Nutr.* 1950; 383-398.
- [14] KOUTSIDIS, G., ELMORE JS., ORUNA-CONCHA, MJ., CAMPO, MM., WOOD, JD., MOTTRAM, DS., Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: Effect of post-mortem conditioning. *Meat Sci.* 2008; 79:270–277.
- [15] KANG, KT., HEU, MS., JEE SJ., LEE, JH., KIM, HS., KIM, JS., Food component characteristic of tuna livers. *Food Sci. Biotechnol.* 2007;16(3):367-373.
- [16] SAMAE, SM., Quantitative composition of egg protein, lipid, fatty acid, and free amino acid in common dentex (*Dentex dentex* L.) and their relations to viability and larval development. For The Degree of Doctor of Philosophy, University of Salzburg, 2010; 123.
- [17] IORDACHE, A., HORJ, E., TOMA, A., COZAR, O., CULEA, M., Determination of amino acid composition of two carp species by GC-MS. *Asian J. Chem.* 2011; 23(11):4757-4760.
- [18] OHMORI, T., MUTAGUCHI, Y., YOSHIKAWA S., DOI, K., OHSHIMA, T., Amino acid components of lees in salmon fish sauce are tyrosine and phenylalanine. *J. Biosci. Bioeng.* 2011; 112(3):256–258.
- [19] LINDLEY, LC., PHELPS, RP., DAVIS, DA., CUMMINS, KA., Salinity acclimation and free amino acid enrichment of copepod nauplii for first-feeding of larval marine fish. *Aquaculture.* 2011; 318:402–406.
- [20] HUBBARD, PC., BARATA, EN. OZORIO, ROA., VALENTE, LMP., CANARIO, AVM., Olfactory sensitivity to amino acids in the blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*): a comparison between olfactory receptor recording techniques in seawater. *J. Comp. Physiol. A.* 2011; 197:839–849.
- [21] HOSSAIN, MA., ALMATAR, SM., JAMES, CM., Whole body and egg amino acid composition of silver pomfret, *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788) and prediction of dietary requirements for essential amino acids. *J. Appl. Ichthyol.* 2011; 27(4):1067-1071.

- [22] MOHAMED, R., LIVIA, SS., HASSAN, S., SOHER, E., AHMED-ADEL, EB., Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage. *Food Chem.* 2009; 115:635–638.
- [23] KURAUCHI, I., HAMASU, K., DENBOW, DM., FURUSE, M., Plasma amino acid concentration in neonatal chicks modified by acute stress. *J. Anim. Vet. Adv.* 2009; 8(9): 838-1841.
- [24] SOLEIMANI, AF., KASIM, A., ALIMON, AR., MEIMANDIPOUR, A., ZULKIFLI, I., Ileal endogenous amino acid flow of broiler chickens under high ambient temperature. *J. Anim. Physiol. and An. N.* 2010; 94:641–647.
- [25] BOBBINS, KR., HITCHCOCK, JP., MITCHELL, AS., Potassium-induced changes in muscle free amino acid concentrations in chicks. *J. Nutr.* 1982; 112:2122-2129.
- [26] FRAMPTON, RJ., YARDLEY, RW., MACMAHON, RA., Changes in plasma amino acids in the developing chick. *Biol. Neonate.* 1986; 50(3):154-159.
- [27] RUTHERFURD, S., MOUGHAN, P., LOWRY, D., PROSSER, C., Amino acid composition determined using multiple hydrolysis times for three goat milk formulations. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2008; 59(7-8):679-690.
- [28] MAPEKULA, M., CHIMONYO, M., MAPIYE, C., DZAMA, K., Fatty acid, amino acid and mineral composition of milk from Nguni and local crossbred cows in South Africa. *J. Food Compos. Anal.* 2011; 24:529–536.
- [29] KIM, CH., CHOUNG, JJ., CHAMBERLAIN, DG., Estimates of the efficiency of transfer of L-histidine from blood to milk when it is the first limiting amino acid for secretion of milk protein in the dairy cow. *J. Sci. Food Agric.* 2001; 81:1150-1155.
- [30] EL, SN., KAVAS, A., Available lysine in dried milk after processing. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 1997; 48(2):109-11.
- [31] TOELSTEDTE, S., HOFMANN, T., Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 5299–5307.
- [32] JARRETT, WD., ASTON, JW., DULLEY, JR., A simple method for estimating free amino acids in cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.* 1982; 37(2):55-58.

- [33] QUINTO, M., SEVI, A., CATERINA, R., ALBENZIO, M., MUSCIO, A., ROTUNNO, T., Quality of milk and caciocavallo cheese from farms rearing Podolica and Italian Friesian cows. *Ital. J. Food Sci.* 2003; 15(4):485-498.
- [34] SUBRAMANIAN, A., ALVAREZ, VB., HARPER, WJ., RODRIGUEZ-SAONA, LE., Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using fourier-transform infrared spectroscopy, *Int. Dairy J.* 2011; 21:434-440.
- [35] CHANG, SF., AYRES, JW., SANDINE, WE., Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. *J. Dairy Sci.* 1985; 68(11):2840-2846.
- [36] LIVIA, P., FERREIRA, IMPLVO., MENDES, E., OLIVEIRA, B., FERREIRA, M., Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of azeitao cheese. *Food Chem.* 2001; 75:287-291.
- [37] VICKERY, HB., SHORE, A., CXXIX. The basic amino-acids of crystalline egg-albumin. *Biochem. J.* 1932; 26:1101-1106.
- [38] SURAI, PF., SPARKS, NHC., Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends Food Sci. Tech.* 2001; 12:7-16.
- [39] KAYA, Y., TURAN, H., ERDEM, ME., Determination of nutritional quality of warty crab (*Eriphia verrucosa* forsskal, 1775). *J. Anim. Vet. Adv.* 2009; 8(1):120-124.
- [40] BARRENTO, S., MARQUES, A., TEIXEIRA, B., MENDES, R., BANDARRA, N., VAZ-PIRES, P., NUNES, ML., Chemical composition, cholesterol, fatty acid and amino acid in two populations of brown crab *Cancer pagurus*: Ecological and human health implications. *J. Food Compos. Anal.* 2010; 23:716-725.
- [41] PORTER, MA., JONES, AM., Variability in soy flour composition. *JAOCS.* 2003; 80(6):557-562.
- [42] DUDASOVA, S., GRANCICOVA, E., Influence of casein and soy flour proteins on amino-acid content in the liver of experimental-animals. *Physiol. Res.* 1992; 41(6):411-416.
- [43] HANA, BZ., ROMBOUTS, FM., NOUT, RMJ., Amino acid profiles of sufu, a Chinese fermented soybean food. *J. Food Compos. Anal.* 2004; 17:689-698.

- [44] ANUONYE, JC., ONUH, JO., EGWIM, E., ADEYEMO, SO., Nutrient and antinutrient composition of extruded acha/soybean blends. *J. Food Process. Pres.* 2010; 34(2):680-691.
- [45] LUIKING, YC., DEUTZ, NEP., JAKEL, M., SOETERS, PB., Casein and soy protein meals differentially affect whole-body and splanchnic protein metabolism in healthy humans. *J. Nutr.* 2005; 135:1080–1087.
- [46] GAUDICHON, C., BOS, C., MORENS, C., PETZKE, KJ., MARIOTTI, F., EVERWAND, J., BENAMOUZIG, R., DARE, S., TOME, D., METGES, CC., Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology.* 2002; 123(1):50-59.
- [47] SHEN, F., NIU, X., YANG, D., YING, Y., LI, B., ZHU, G., WU, J., Determination of amino acids in chinese rice wine by fourier transform near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58:9809–9816.
- [48] SHASHIREKHA, MN., RAJARATHNAM, S., BANO, Z., Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). *Food Chem.* 2005; 92:255–259.
- [49] MOONGNGARM, A., SAETUNG, N., Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chem.* 2010; 122:782–788.
- [50] KAWAKATSU, T., WANG, S., WAKASA, Y., TAKAIWA, F., Increased lysine content in rice grains by over-accumulation of BiP in the endosperm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2010; 74(12):2529-2531.
- [51] AMREIN, T.M., LUKAC, H., ANDRES, L., PERREN, R., ESCHER, F., AMADO, R., Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53:7819-7825.
- [52] RUGGERI, S., CAPPELLONI, M., GAMBELLI, L., CARNOVALE, E., Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital. J. Food Sci.* 1998; 10(3):243-252.
- [53] BORGES, O., GONCALVES, B., CARVALHO, JLS. CORREIA, P., SILVA, AP., Nutritional quality of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cultivars from Portugal. *Food Chem.* 2008; 106:976–984.
- [54] YANG, XB., MALIK, NSA., PEREZ, JL., LIU, TX., Impact of potato psyllid (Hemiptera: Trioziidae) feeding on free amino acid composition in potato. *Insect Sci.* 2011; 18(6):663-670.

- [55] MU, TH., TAN, SS., Xue, YL., The amino acid composition, solubility and emulsifying properties of sweet potato protein. *Food Chem.* 2009; 112:1002–1005.
- [56] GORINSTEIN, S., YAMAGATA, S., HADZIYEV, D., Electrophoretic Separation of Proteins and Their Amino Acid Composition in Raw and Processed Potatoes. *J. Food Biochem.* 1988; 12:37-49.
- [57] FRITZ, C., MUELLER, C., MATT, P., FEIL, R., STITT, M., Impact of the C–N status on the amino acid profile in tobacco source leaves. *Plant, Cell Environ.* 2006; 29:2055–2076.
- [58] MELESSE, A., BULANG, M., KLUTH, H., Evaluating the nutritive values and in vitro degradability characteristics of leaves, seeds and seedpods from *Moringa stenopetala*. *J. Sci. Food Agric.* 2009; 89:281–287.
- [59] WANI AA., SOGI, DS., SINGH, P., WANIA, IA., Shivhare, US., Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins. *J. Sci. Food Agric.* 2011; 91:113–121.
- [60] HUANG, ZR., CHEN, JH., LIU, HY., ZHU, SJ., Determination of amino acid contents in cottonseeds using near infrared reflectance spectroscopy. *Spectrosc. Anal.* 2011; 31(10):2692-2696.
- [61] HACKL, W., PIEPER, B., PIEPER, R., KORN, U., ZEYNER, A., Effects of ensiling cereal grains (barley, wheat, triticale and rye) on total and pre-caecal digestibility of proximate nutrients and amino acids in pigs. *J. Anim. Physiol. An. N.* 2010; 94:729–735.
- [62] LI, G., WANG, R., QUAMPAH, AJ., RONG, Z., SHI, C., WU, J., Calibration and prediction of amino acids in stevia leaf powder using near infrared reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2011; 59:13065–13071.
- [63] LI, X., REZAEI, R., LI, P., WU, G., Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids.* 2011; 40:1159–1168.
- [64] FONTAINE, J., SCHIRMER, B., HORR, J., Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) enables the fast and accurate prediction of essential amino acid contents. 2. Results for wheat, barley, corn, triticale, wheat bran/middlings, rice bran, and sorghum. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3902-3911.
- [65] HABIB, MAB., YUSOFF, FM., PHANG, SM., ANG, KJ., MOHAMED, S., Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. *Aquaculture.* 1997; 158:95-105.

- [66] SUGIMOTO, N., JONES, AD., BEAUDRY, R., Changes in free amino acid content in jonagold apple fruit as related to branched-chain ester production, ripening, and senescence. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2011; 136(6):429-440.
- [67] NICOLINI, G., RAMPONI, M., LARCHER, R., Free amino acid composition of juices of 12 grape varieties grown in Trentino (Italy). *Ital. J. Food Sci.* 2001; 13(2):189-199.
- [68] CHEN, GL., ZHANG, B., WU, JG., Shia, CH., Nondestructive assessment of amino acid composition in rapeseed meal based on intact seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2011; 165:111–119.
- [69] MURCIA, MA., LOPEZ-AYERRA, B., MARTINEZ-TOME, GARCIA-CARMONA MF., Effect of industrial processing on amino acid content of broccoli. *J. Sci. Agric.* 2001; 81:1299-1305.
- [70] CHO, J., LEE, EJ., YOO, KS., LEE, SK., PATIL, BS., Identification of candidate amino acids involved in the formation of blue pigments in crushed garlic cloves (*Allium sativum* L.). *J. Food Sci.* 2009; 74(1):11-16.
- [71] RAO, L., HAYAT, K., LVA, Y., KARANGWA, E., XIA, S., JIA, C., ZHONG, F., ZHANG, X., Effect of ultrafiltration and fining adsorbents on the clarification of green tea. *J. Food Eng.* 2011; 102:321–326.
- [72] CHEN, GL., ZHANG, B., WU, JG., SHIA, CH., Nondestructive assessment of amino acid composition in rapeseed meal based on intact seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2011; 165:111–119.
- [73] RIBEIRO, B., ANDRADE, PB., SILVA, BM., BAPTISTA, P., SEABRA, RM., VALENTAO, P., Comparative study on free amino acid composition of wild edible mushroom species. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:10973–10979.
- [74] DIEZ, VA., ALVAREZ, A., Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem.* 2001; 75: 417–422.
- [75] NELSON, D. L., COX, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, S.75 ,USA, 2008.
- [76] TÜZÜN, C., *Biyokimya*, Palme Yayınları, S.67-68 Ankara, 1997.
- [77] KEHA, E., KÜFREVİOĞLU, İ., *Biyokimya*, Derya Kitabevi, S.43, Trabzon, 1993.

- [78] PAGLIARA, AS., KARL, IE., VIVO, DCD., FEIGIN, RD., KIPNIS, DM., Hypoalaninemia: a concomitant of ketotic hypoglycemia. *The J. Clin. Invest.* 1972; 51:1440-1449.
- [79] PERMUTT, MA., BIER, DM., KIPNIS, DM., Substrate regulation of gluconeogenesis in Sheehan's syndrome. *Clin. Res.* 1972; 20:57.
- [80] HAYMOND, MW., KARL, IE., PAGLIARA AS., Ketotic hypoglycemia: an amino acid substrate limited disorder. *J. Clin. Endocr. Metab.* 1974; 38(4):521-530.
- [81] INABA, Y., HAMADA-SATO, N., KOBAYASHI, T., IMADA, C., WATANABE, E., Determination of D- and L-alanine concentrations using a pyruvic acid sensor. *Biosens. Bioelectron.* 2003; 18: 963-971.
- [82] MARCHELLI, R., DOSSENA A., PALLA, G., The potential of enantioselective analysis as a quality control tool. *Trends Food Sci. Technol.* 1996; 7:113-119.
- [83] <http://www.nutrabio.com/Products/alanine.htm>, 19.12.2011.
- [84] <http://www.rxlist.com/elitek-drug.htm>, 19.12.2011.
- [85] <http://www.rxlist.com/aminosyn-electrolytes-drug.htm>, 19.12.2011.
- [86] ZHANG, LY., SUN, MX., Selective determination of α -aminobutyric acid, glutamate and alanine by mixed micellar electrokinetic chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 2005; 1095:185-188.
- [87] BORGESA, EP., REIS, BF., An enzymatic flow-injection procedure with chemiluminescence detection for on-site determination of L-alanine in synthesis process. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2005; 16(6A):1226-1232.
- [88] KWAN, RCH., HON, PYT., RENNEBERG, R., Amperometric biosensor for rapid determination of alanine. *Anal. Chim. Acta.* 2004; 523:81-88.
- [89] CAVANI, L., CIAVATTA, C., GESSA, C., Determination of free L- and D-alanine in hydrolysed protein fertilisers by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2003; 985:463-469.
- [90] JANASEK, D., SPOHN, U., Chemiluminometric Flow Injection Analysis procedures for the enzymatic determination of l-alanine, α -ketoglutarate and l-glutamate. *Biosens. Bioelectron.* 1999; 14:123-129.
- [91] SERRA, F., PALOU, A., PONS, A., Enzymatic determination of carbon-14 labeled L-alanine in biological samples. *Anal. Chem.* 1987; 59(14):1841-1843.

- [92] NAREZHAYAYA, EV., ASKALEPOVA, OI., NIKASHINA, AA., KRUKIER, II., POGORELOVA, TN., Determination of L-arginine in amniotic fluid by capillary zone electrophoresis. *J. Anal. Chem.* 2010; 65(12):1280–1283.
- [93] LASSALA, A., BAZER, FW., CUDD, TA., DATTA, S., KEISLER, DH., SATTERFIELD, MC., SPENCER, TE., WU, G., Parenteral Administration of L-arginine prevents fetal growth restriction in undernourished ewes. *J. Nutr.* 2010; 140:1242–1248.
- [94] CHENG, Z., BUENTELLO, A., GATLIN, DM., Effects of dietary arginine and glutamine on growth performance, immune responses and intestinal structure of red drum, *sciaenops ocellatus*. *Aquaculture.* 2011; 319:247–252.
- [95] MAO, H., WEI, W., XIONG, W., LU, Y., CHEN, B., LIU, Z., Simultaneous determination of L-citrulline and L-arginine in plasma by high performance liquid chromatography. *Clin. Biochem.* 2010; 43:1141–1147.
- [96] LAM, TL., WONG, GKY., CHONG, HC., CHENG, PNM., CHOI, SC., CHOW, TL., KWOK, SY., POON, RTP., WHEATLEY, DN., LO, WH., LEUNG, YC., Recombinant human arginase inhibits proliferation of human hepatocellular carcinoma by inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett.* 2009; 277:91–100.
- [97] TANG, WHW., WANG, Z., CHO, L., BRENNAN, D., HAZEN, SL., Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. *JACC.* 2009; 53(22):2061-2067.
- [98] PEREZ-NERI, I., CASTRO, E., MONTES, S., BOLL, MC., BARGES-COLL, J., SOTO-HERNANDEZ, JL., RIOS, C., Arginine, citrulline and nitrate concentrations in the cerebrospinal fluid from patients with acute hydrocephalus. *J. Chromatogr. B.* 2007; 851:250–256.
- [99] BEYER, J., KOLDITZ, M., EWERT, R., RUBENS, C., OPITZ, C., SCHELLONG, S., HOEFFKEN, G., HALANK, M., L-arginine plasma levels and severity of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Vasa.* 2008; 37(1):61-67.
- [100] <http://www.nutrabio.com/Products/arginine.htm>, 23.12.2011.
- [101] <http://www.rxlist.com/ceptaz-drug.htm>, 23.12.2011.
- [102] <http://www.rxlist.com/riastap-drug.htm>, 18.01.2012.
- [103] <http://www.rxlist.com/aminosyn-rf-52-drug.htm>, 23.12.2011.

- [104] <http://www.lorealparis.com.tr/sac-bakimi/kadin-sac-bakimurunleri/els-eve-arginine-direnc/dokulme-karsisti-bakim-kremi.aspx>, 24.07.2012.
- [105] SHEN, Y., LIU, H., RONG, S., LI, Y., HU, C., Simultaneous determination of cephadrine, L-arginine, and cephalixin in cephadrine for injection by capillary zone electrophoresis. *Anal. Lett.* 2006; 39:569–578.
- [106] CHEN, YRU., LIN, SJ., CHOU, YW., WU, HL., CHEN, SH., Simultaneous determination of cefepime and L-arginine by micellar electrokinetic chromatography and applications to commercial injections. *J. Sep. Sci.* 2005; 28:2173–2179.
- [107] HUANG, LF., GUO, FQ., LIANG, YZ., LI, BY., CHENG, BM., Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 380:643–649.
- [108] LIZENG, W., CHENGSONG, M., XIAOLI, Z., ZESHENG, A., Determination of trace arginine by adsorptive voltammetry of its nickel (II) complex. *J. Indian Chem. Soc.* 1999; 76(2): 116-117.
- [109] MIURA, T., KASHIWAMURA, M., KIMURA, M., A fluorometric method for the specific determination of serum arginine with 2,3-naphthalenedicarbaldehyde. *Anal Biochem.* 1984; 139(2):432-437.
- [110] ORDUNA, RM., Quantitative determination of L-arginine by enzymatic end-point analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49:549-552.
- [111] KONCKI, R., WALCERZ, I., RUCKRUH, F., GLAB, S., Bionzymatic potentiometric electrodes for creatine and L-arginine determination. *Anal. Chim. Acta* 1996; 333(3):215-222.
- [112] YOKOHIRA, M., HOSOKAWA, K., YAMAKAWA, K., HASHIMOTO, N., SUZUKI, S., MATSUDA, Y., SAOO, K., KUNO, T., IMAIDA K., A 90-day toxicity study of L-asparagine, a food additive, in F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008; 46:2568–2572.
- [113] APPEL, IM., PINHEIRO, JPV., BOER, ML., LANVERS, C., RENIERS NCM., BOOS, J., PIETERS, R., Lack of asparagine depletion in the cerebrospinal fluid after one intravenous dose of PEG-asparaginase: a window study at initial diagnosis of childhood ALL, Leukemia. 2003; 17: 2254–2256.
- [114] <http://www.rxlist.com/tnkase-drug.htm>, 22.03.2012.
- [115] PLATA-GUERRERO, R., GUERRA-HERNANDEZ, E., GARCIA-VILLANOVA, B., Determination of reducing sugar and asparagine in potatoes. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2009; 32: 2556–2568.

- [116] JUNG, K., BRANCIAMORE, S., MARTINI, G., Electron spin resonance of copper (II) as a tool for the determination of asparagine concentration in *Bacillus subtilis* cultures. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1523:1-5.
- [117] STEIN, K., SHI, R., SCHWEDT, G., Determination of L-asparagine using flow-injection systems with spectrophotometric and potentiometric detection. *Anal. Chim. Acta.* 1996; 336(1-3):113-122.
- [118] FATIBELLO-FILHO, O., SULEIMAN, A., GUILBAULT, GG., Potentiometric determination of L-asparagine with an enzymatic electrode. *J. Macromol. Sci. A Chem.* 1989; 26(8):1261-1269.
- [119] BRASSAT, B., HARE, PE., PONNAMPERUMA, C., THIEMANN, W., Determination of dl-asparagine by gas-chromatography. *J. Chromatogr.* 1986; 354:474-477.
- [120] NIKOLELIS, DP., Construction of an immobilized asparaginase sensor and determination of asparagine and asparaginase in human blood serum. *Anal. Chim. Acta.* 1984; 161:343-348.
- [121] ZHAO, S., LIU, YM., Quantification of D/L-aspartic acids in *aplysia californica* central nervous system by β -cyclodextrin modified micellar electrokinetic chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2001; 15:274-279.
- [122] HAN, H., MIYOSHI, Y., OYAMA, T., KONISHI, R., MITA, M., HAMASE, K., Enantioselective micro-2D-HPLC determination of aspartic acid in the pineal glands of rodents with various melatonin contents. *J. Sep. Sci.* 2011; 34:2847–2853.
- [123] ZAHN, PK., SLUKA, KA., BRENNAN, TJ., Excitatory amino acid release in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Pain.* 2002; 100:65–76.
- [124] HUANG, S., ZHOU, K., LI, Z., Inhibition mechanism of aspartic acid on crystal growth of hydroxyapatite. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 2007; 17:612-616.
- [125] FISHER, GH., DANIELLO, A., VETERE, A., CUSANO, GP., CHAVEZ, M., PETRUCELLI, L., Quantification of D-aspartate in normal and alzheimer brains. *Neurosci. Lett.* 1992; 143(1-2):215-218.
- [126] http://www.nutrabio.com/Products/aspartic_acid.htm, 28.12.2011.
- [127] <http://www.rxlist.com/famotidine-injection-drug.htm>, 28.12.2011.
- [128] <http://www.rxlist.com/trophamine-drug/indications-dosage.htm>, 28.12.2011.

- [129] DAS, S., GUHA, S., BANERJEE, A., LOHAR, S., SAHANA, A., DAS, D., 2-(2-Pyridyl) benzimidazole based Co(II) complex as an efficient fluorescent probe for trace level determination of aspartic and glutamic acid in aqueous solution: A displacement approach. *Org. Biomol. Chem.* 2011; 9:7097-7104.
- [130] BENESOV, T., HONZTKO, A., PILIN, A., VOTRUBA, J., FLIEGER, M., A modified HPLC method for the determination of aspartic acid racemization in collagen from human dentin and its comparison with GC. *J. Sep. Sci.* 2004; 27:330–334.
- [131] GAO, J., LV, D., SUNC, H., YANGA, W., Determination of L-aspartic acid by using the Cu(II)-catalyzed oscillating reaction. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009; 20(10):1827-1832.
- [132] LEE, SH., JEON, CW., WABAIDUR, SM., Flow-injection chemiluminescence determination of aspartic acid in tea leaves using Tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)–Ce(IV) system. *J. Fluoresc.* 2008; 18:655–660.
- [133] ZHAO, S., FENG, Y., LEBLANC, M.H., LIU, YM., Determination of free aspartic acid enantiomers in rat brain by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 2001; 762:97–101.
- [134] LOPES, DCF., DELVIVO, FM., SILVESTRE, MPC, Use of activated carbon for removing phenylalanine from reconstituted skim milk powder hydrolysates. *LWT.* 2005; 38:447–453.
- [135] HYANEK, J., KOBILKOVA, J., VILETOVA, H., KUNOVA, V., SMITKOVA, J., KUBIK, M., Studies of blood and breast milk amino acid concentrations in mothers with abnormal phenylalanine metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 6 Suppl. 1983; 2:107-108.
- [136] http://www.nutrabio.com/Products/phenylalanine_1.htm, 29.12.2011.
- [137] <http://www.rxlist.com/aminosyn-hbc-7-sulfite-free-drug.htm>, 26.03.2012.
- [138] <http://www.rxlist.com/hepatamine-drug.htm>, 29.12.2011.
- [139] <http://www.rxlist.com/travasol-drug.htm>, 29.12.2011.
- [140] ZHANG, K., YAN, HT., ZHOU, T., Spectrofluorimetric determination of phenylalanine based on fluorescence enhancement of europium ion immobilized with sol–gel method. *Spectrochim. Acta A.* 2011; 83:155–160.

- [141] LI, CF., DU, LM., WU, H., CHANG, YX., Determination of L-phenylalanine by cucurbit[7]uril sensitized fluorescence quenching method. *Chinese Chem. Lett.* 2011; 22:851–854.
- [142] HU, Y., ZHANG, Z., ZHANG, H., LUO, L., YAO, S., Electrochemical determination of l-phenylalanine at polyaniline modified carbon electrode based on β -cyclodextrin incorporated carbon nanotube composite material and imprinted sol–gel film. *Talanta.* 2011; 84:305–313.
- [143] TARHAN, L., AYAR-KAYALI, H., Immobilization of phenylalanine dehydrogenase and its application in flow-injection analysis system for determination of plasma phenylalanine. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011; 163:258–267.
- [144] SHEN, JR., SUN, XM., LEI, ZL., ZHONG, BX., DING, ZG., Catalyzed determination of phenylalanine with a mimic enzyme constructed of β -cyclodextrin derivant. *J. Anal. Chem.* 2004; 59(11):1102–1105.
- [145] WIBRAND, F., A microplate-based enzymatic assay for the simultaneous determination of phenylalanine and tyrosine in serum. *Clin. Chim. Acta.* 2004; 347:89–96.
- [146] DENG, C., DENG, Y., Diagnosis of maple syrup urine disease by determination of L-valine, L-isoleucine, L-leucine and L-phenylalanine in neonatal blood spots by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2003; 792:261–268.
- [147] SASAKI S., HASHIZUME, A., CITTERIO, D., FUJII, E., SUZUK, K., Trifluoroacetophenone derivatives as amino acid selective ionophores for the potentiometric determination of phenylalanine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002; 41(16):3005–3007.
- [148] HUANG, T., WARSINKE, A., KUWANA, T., SCHELLER, FW., Determination of L-phenylalanine based on an NADH-detecting biosensor. *Anal. Chem.* 1998; 70:991–997.
- [149] TIMPERIO, AM., FAGIONI, M., GRANDINETTI, F., ZOLLA, L., Chemically enhanced liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of glutamic acid in the diffusion medium of retinal cells. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21:1069–1076.
- [150] TCHERKAS, YV., DENISENKO, AD., Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A.* 2001; 913:309–313.

- [151] GLOVINSKY, Y., QUIGLEY, HA., DUNKELBERGER, GR., Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *IOVS*. 1991; 32(3):484-491.
- [152] WEINREB, RN., LEVIN, LA., Is neuroprotection a viable therapy for glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 1999; 117:1540-1544.
- [153] SILVA, E., HERNANDEZ, L., CONTRERAS, Q., GUERRERO, F., ALBA, G., Noxious stimulation increases glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain*. 2000; 87:131-135.
- [154] HEMELRIJCK, AV., SARRE, S., SMOLDERS, I., MICHOTTE, Y., Determination of amino acids associated with cerebral ischaemia in rat brain microdialysates using narrowbore liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Neurosci. Meth.* 2005; 144:63-71.
- [155] http://nutrabio.com/Products/glutamic_acid.htm, 04.01.2012.
- [156] <http://www.rxlist.com/dienestrol-drug.htm>, 04.01.2012.
- [157] <http://www.rxlist.com/copaxone-drug.htm>, 04.01.2012.
- [158] <http://www.rxlist.com/darvon-compound-drug.htm>, 04.01.2012.
- [159] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-in-dextrose-injection-drug.htm>, 04.01.2012.
- [160] GAO, J., YANG, H., LIU, X., REN, J., LI, Q., KANG, J., Determination of glutamic acid by an oscillating chemical reaction using the analyte pulse perturbation technique. *Talanta*. 2002; 57:105-114.
- [161] QU, J., CHEN, W., LUO, G., WANG, Y., XIAO, S., LING, Z., CHEN, G., Rapid determination of underivatized pyroglutamic acid, glutamic acid, glutamine and other relevant amino acids in fermentation media by LC-MS-MS. *Analyst*. 2002; 127(1):66-9.
- [162] BELJAARS, PR., DIJK, R., BISSCHOP, E., SPIEGELENBERG, WM., Liquid chromatographic determination of free glutamic acid in soup, meat product, and Chinese food: interlaboratory study. *J. AOAC. Int.* 1996; 79(3):697-702.
- [163] BALLESTEROS, E., GALLEGO, M., VALCARCEL, M., Sequential determination of D- and L-glutamic acid by continuous fractional crystallization. *Anal. Chem.* 1996; 68:322-326.
- [164] MULCHANDANI, A., BASSI, AS., Determination of glutamine and glutamic acid in mammalian cell cultures using tetrathiafulvalene modified enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 1996; 11(3):271-280.

- [165] HATTULA, MT., WALLIN, HC., Enzymatic determination of free glutamic acid in dried soups and in minced sausages: NMKL collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1991;74(6):921-5.
- [166] CALDER, PC., YAQOOB, P., Glutamine and the immune system. *Amino Acids.* 1999; 17:227-241.
- [167] YI, GF., ALLEE, GL., KNIGHT, CD., DIBNER, JJ., Impact of glutamine and oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with eimeria maxima. *Poultry Sci.* 2005;84:283–293.
- [168] NEWSHOLME, P., Why Is L-Glutamine Metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection. *J. Nutr.* 2001; 131:2515–2522.
- [169] PETERSON, D., JONES, BJ., PETIT, RG., Randomized, placebo-controlled trial of saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Cancer.* 2007; 109(2):322-331.
- [170] SOUBA, WW., Nutritional support. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336:41-48.
- [171] MARGARITIS, VG., FILOS, KS., MICHALAKI, MA., SCOPA, CD., SPILIOPOULOU, I., NIKOLOPOULOU, VN., VAGIANOS, CE., Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J. Surg.* 2005; 29:1329–1334.
- [172] BARTELL, SM., BATAL, AB., The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. *Poultry Sci.* 2007; 86:1940–1947.
- [173] ANDREWS, FJ., GRIFFITHS, RD., Glutamine: essential for immune nutrition in the critically ill. *Brit. J. Nutr.* 2002; 87(1):3–8.
- [174] WELBOURNE, TC., JOSHI, S., Interorgan glutamine metabolism during acidosis. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* 1990; 14(4):77-85.
- [175] LACEY, JM., WILMORE., DW., Is glutamine a conditionally essential amino acid. *Nutr. Rev.* 1990;48(8):297-309.
- [176] WELBOURNE, TC., Increased plasma bicarbonate and growth hormone after an oral glutamine load. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 61:1058-1061.
- [177] <http://nutrabio.com/Products/glutamine1.htm>, 11.01.2012.

- [178] <http://www.rxlist.com/rotarix-drug.htm>, 11.01.2012.
- [179] LIU, YM., LIU, ZL., SHI, YM., TIAN, W., The determination of glutamine with flow-injection chemiluminescence detection and mechanism study. *Luminescence*. 2010; 25:50–54.
- [180] KHUHAWAR, MY., RAJPER, AD., Liquid chromatographic determination of glutamine in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde derivatizing reagent. *Chromatographia*. 2003; 58(7-8):479-482.
- [181] KATO, M., JIN, HM., SAKAI-KATO, K., TOYOOKA, T., DULAY, MT., ZARE, RN., Determination of glutamine and serine in rat cerebrospinal fluid using capillary electrochromatography with a modified photopolymerized sol-gel monolithic column. *J. Chromatogr. A*. 2003; 1004:209–215.
- [182] DATTELBAUM, JD., LAKOWICZ, JR., Optical determination of glutamine using a genetically engineered protein. *Anal. Biochem*. 2001; 291:89–95.
- [183] HUANG, YL., KHOO, SB., YAP, MGS., Determination of glutamine in mammalian-cell cultures with a flow-injection analysis wall-jet electrode system. *Anal. Lett.* 1995; 28(4):593-603.
- [184] VILLARTA, RL., PALLESCHI, G., SULEIMAN, A., GUILBAULT, GG., Determination of glutamine in serum using an amperometric enzyme electrode. *Electroanalysis*. 1992; 4(1):27-31.
- [185] CATTANEO, MV., MALE, KB., LUONG, JHT., A chemiluminescence fiberoptic biosensor system for the determination of glutamine in mammalian-cell cultures. *Biosens. Bioelectron*. 1992; 7(8):569-574.
- [186] TAKAHASHI, K., TAKAGI, K., AKIBA, Y., Effects of dietary glycine supplementation and fish meal on inflammatory responses in broiler chicks. *Brit. Poultry Sci*. 2009; 50(4):479—486.
- [187] MARTINEZ, M., FRANK, A., DIEZ –TEJEDOR, E., HERNANZ, A., Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and serum in Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect*. 1993;6(1):1-9.
- [188] MITIC, SS., PAVLOVIC, AN., TOSIC, SB., ARSIC, BB., SUNARIC, SM., Quantitative determination of glycine in commercial dosage forms by kinetic spectrophotometry. *J. Anal. Chem*. 2009; 64(7):683–689.
- [189] <http://nutrabilio.com/Products/glycine.htm>, 16.01.2012.

- [190] <http://www.rxlist.com/gamunex-drug.htm>, 18.01.2012.
- [191] <http://www.rxlist.com/genotropin-drug.htm>, 18.01.2012.
- [192] <http://www.rxlist.com/cernevit-drug.htm>, 18.01.2012.
- [193] <http://www.rxlist.com/ultima-drug.htm>, 18.01.2012.
- [194] <http://www.rxlist.com/simulect-drug.htm>, 18.01.2012.
- [195] <http://www.rxlist.com/bayrab-drug.htm>, 18.01.2012.
- [196] <http://www.rxlist.com/baytet-drug.htm>, 18.01.2012.
- [197] <http://www.rxlist.com/flolan-drug.htm>, 18.01.2012.
- [198] <http://www.rxlist.com/humatrope-drug.htm>, 18.01.2012.
- [199] <http://www.rxlist.com/procalamine-drug.htm>, 18.01.2012.
- [200] <http://www.rxlist.com/amevive-drug.htm>, 18.01.2012.
- [201] <http://www.rxlist.com/atryn-drug.htm>, 19.01.2012.
- [202] <http://www.rxlist.com/augmentin-chewable-tablets-drug.htm>, 19.01.2012.
- [203] <http://www.rxlist.com/baygam-drug.htm>, 19.01.2012.
- [204] <http://www.rxlist.com/bayhep-b-drug.htm>, 19.01.2012.
- [205] <http://www.rxlist.com/berinert-drug.htm>, 19.01.2012.
- [206] <http://www.rxlist.com/dyazide-drug.htm>, 19.01.2012.
- [207] <http://www.rxlist.com/exubera-drug.htm>, 19.01.2012.
- [208] <http://www.rxlist.com/alphanate-drug.htm>, 26.03.2012.
- [209] <http://www.rxlist.com/geocillin-drug.htm>, 19.01.2012.
- [210] <http://www.rxlist.com/mumps-skin-test-antigen-drug.htm>, 19.01.2012.
- [211] <http://www.rxlist.com/relistor-drug.htm>, 19.01.2012.
- [212] <http://www.rxlist.com/risperdal-drug.htm>, 19.01.2012.
- [213] <http://www.rxlist.com/maxalt-drug.htm>, 19.01.2012.

- [214] <http://www.rxlist.com/somavert-drug.htm>, 19.01.2012.
- [215] <http://www.rxlist.com/zelapar-drug.htm>, 19.01.2012.
- [216] <http://www.rxlist.com/felbatol-drug.htm>, 20.01.2012.
- [217] <http://www.rxlist.com/namenda-drug.htm>, 20.01.2012.
- [218] WILSON, SF., JAMES, CA., ZHU, X., DAVIS, MT., ROSE, MJ., Development of a method for the determination of glycine in human cerebrospinal fluid using pre-column derivatization and LC-MS/MS. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2011; 56:315– 323.
- [219] PAKHOMOVA, OA., KORENMAN, Y I., N. MOKSHINA, Y., NIFTALIEV, SI., Extraction separation and electrophoretic determination of tyrosine and glycine. *Russ. J. Appl. Chem.* 2010; 83(11):1940–1943.
- [220] ZYABLOV, AN., KALACH, AV., ZHIBROVA, YA., SELEMENEV, VF., DYAKONOVA, OV., Determination of glycine in aqueous solutions Using a molecularly imprinted polymer_modified piezosensor. *J. Anal. Chem.* 2010; 65(1):91–93.
- [221] PEINHARDT, G., Glycine determination according to the european pharmacopoeia, *Pharmazie.* 2004; 59(1):73-74.
- [222] MATEO, JVG., CALATAYUD, JM., Entrapped copper(II) carbonate for indirect determination of glycine by flow-injection atomicabsorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 1993; 274(2):275-281.
- [223] QU, Y., ARCKENS, L., VANDENBUSSCHE, E., GEERAERTS, S., VANDESANDE, F., Simultaneous determination of total and extracellular concentrations of the amino acid neurotransmitters in cat visual cortex by microbore liquid chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 1998; 798:19–26.
- [224] ZHOU, GJ., CHEN, HY., Flow injection chemiluminescence determination of amino acids by oxidation with N-bromosuccinimide. *Anal. Sci.* 2002; 18:693-696.
- [225] SHAHLAEI, M., GHOLIVAND, MB., POURHOSSEIN, A., Simultaneous determination of tyrosine and histidine by differential Pulse cathodic stripping voltammetry using H-point standard addition method in tap and seawater. *Electroanalysis.* 2009; 21(22):2499 – 2502.
- [226] CREIGHTON, TE., *Encyclopedia of Molecular Biology*, 2, Wiley, 1147, NewYork, 1999.

- [227] LIAO, H., ZHANG, Z., NIE, L., YAO, S., Electrosynthesis of imprinted polyacrylamide membranes for the stereospecific L-histidine sensor and its characterization by AC impedance spectroscopy and piezoelectric quartz crystal technique. *J. Biochem. Biophys. Met.* 2004; 59:75–87.
- [228] SHOJAEI, M., MIRMOHSENI, A., FARBODI, M., Application of a quartz crystal nanobalance and principal component analysis for the detection and determination of histidine. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391:2875–2880.
- [229] <http://nutrabilio.com/Products/histidine.htm>, 25.01.2012.
- [230] <http://www.rxlist.com/stelara-drug.htm>, 25.01.2012.
- [231] <http://www.rxlist.com/ilaris-drug.htm>, 25.01.2012.
- [232] <http://www.rxlist.com/xolair-drug.htm>, 25.01.2012.
- [233] <http://www.rxlist.com/nplate-drug.htm>, 25.01.2012.
- [234] <http://www.rxlist.com/herceptin-drug.htm>, 25.01.2012.
- [235] <http://www.rxlist.com/bioclata-drug.htm>, 20.01.2012.
- [236] <http://www.rxlist.com/benefix-drug.htm>, 25.01.2012.
- [237] <http://www.rxlist.com/synagis-drug.htm>, 25.01.2012.
- [238] <http://www.rxlist.com/simponi-drug.htm>, 25.01.2012.
- [239] <http://www.rxlist.com/doxil-drug.htm>, 25.01.2012.
- [240] <http://www.rxlist.com/kepivance-drug.htm>, 25.01.2012.
- [241] <http://www.rxlist.com/norditropin-drug.htm>, 25.01.2012.
- [242] ZHOU, L., YAN, N., ZHANG, H., ZHOU, X., PU, Q., HU, Z., Microwave-accelerated derivatization for capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: A case study for determination of histidine, 1- and 3-methylhistidine in human urine. *Talanta.* 2010; 82:72–77.
- [243] KURZATKOWSKA, K., SHPAKOVSKY, D., RADECKI, J., RADECKA, H., JINGWEI, Z., MILAEV, E., Iron (III) porphyrin bearing 2,6-di-*tert*-butylphenol pendants deposited onto gold electrodes for amperometric determination of l-histidine. *Talanta.* 2009; 78:126–131.

- [244] FARIAS, PAM., CASTRO, AA., WAGENER, ALR., MIGUEL, EM., CABRAL, OV., Histidine determination in the presence of copper in diluted alkaline electrolyte by adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode. *Anal. Lett.* 2008; 41:1248–1266.
- [245] GAO, C., FAN, S., Influence of zone stacking sequences on CL intensity and determination of histidine in sequential injection analysis. *Anal. Lett.* 2008; 41:1335–1347.
- [246] KIBA, N., KOGA, A., TACHIBANA, M., TANI, K., KOIZUMI, H., KOYAMA, T., YAMAMURA, A., MATSUMOTO, K., OKUDA, T., YOKOTSUKA, K., Flow-injection determination of L-histidine with an immobilized histidine oxidase from *brevibacillus borstelensis* KAIT-B-022 and chemiluminescence detection. *Anal. Sci.* 2006; 22:95-98.
- [247] YOSHIDA, H., ICHINOSE, F., YOSHITAKE, T., NAKANO, Y., TODOROKI, K., NOHTA, H., YAMAGUCHI, M., Simultaneous determination of histamine and histidine by liquid chromatography following intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization with pyrene-labeling reagent. *Anal. Sci.* 2004; 20:557-559.
- [248] ELBRASHY, AM., GHANNAM, SM., Determination of histidine by atomic absorption spectroscopy. *J. AOAC Int.* 1997; 80(4):741-745.
- [249] DOI, M., YAMAOKA, I., NAKAYAMA, M., MOCHIZUKI, S., SUGAHARA, K., YOSHIZAWA, F., Isoleucine, a blood glucose-lowering amino acid, increases glucose uptake in rat skeletal muscle in the absence of increases in AMP-activated protein kinase activity. *J. Nutr.* 2005; 135:2103–2108.
- [250] POON, RTP., YU, WC., FAN, ST., WONG, J., Long-term oral branched chain amino acids in patients undergoing chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2004; 19:779–788.
- [251] CHIN, SE., SHEPHERD, RW., THOMAS, BJ., CLEGHORN, GJ., PATRICK, MK., WIKOX, JA., ONG, TH., LYNCH, SV., STRONG, R., The nature of malnutrition in children with end-stage liver disease awaiting orthotopic liver transplantation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 56:164-8.
- [252] <http://nutrabio.com/Products/isoleucine.htm>, 02.02.2012.
- [253] <http://www.rxlist.com/aminosyn-hf-8-drug.htm>, 29.12.2011.
- [254] <http://www.rxlist.com/nephramine-drug.htm>, 07.02.2012.

- [255] XUE, R., ZHANG, S., DENG, C., DONG, L., LIU, T., WANG, J., WU, H., GU, J., SHEN, X., Simultaneous determination of blood glucose and isoleucine levels in rats after chronic alcohol exposure by microwave-assisted derivatization and isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2008; 22:245–252.
- [256] SAMY, S., ROBINSON, J., HAYS, MD., An advanced LC-MS (Q-TOF) technique for the detection of amino acids in atmospheric aerosols. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 401:3103–3113.
- [257] CHEN, GL., ZHANG, B., WU, JG., SHI, CH., Nondestructive assessment of amino acid composition in rapeseed meal based on intact seeds by near-infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2011; 165:111–119.
- [258] CHANG, PL., CHIU, TC., WANG, TE., HU, KC., TSAI, YH., HU, CC., BAIR, MJ., CHANG, HT., Quantitation of branched-chain amino acids in ascites by capillary electrophoresis with light-emitting diode-induced fluorescence detection. *Electrophoresis.* 2011; 32:1080–1083.
- [259] RIGOBELLO-MASINI, M., PENTEADO, JCP., LIRI, CW., MIRANDA, MTM., MASINI, JC., Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography for fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae *tetraselmis gracilis*. *Anal. Chim. Acta.* 2008; 628:123–132.
- [260] CHINO, S., SAKAGUCHI, A., YAMOTO, R., FERRI, S., SODE, K., Branched-chain amino acid biosensing using fluorescent modified engineered leucine/isoleucine/valine binding protein. *Int. J. Mol. Sci.* 2007; 8:513-525.
- [261] FANG, G., LIU, N., Determination of eight essential amino acids in mixtures by chemometrics–spectrophotometry without separation. *Anal. Chim. Acta.* 2001; 445:245–253.
- [262] LEE, YC., HUH, MH., Development of a biosensor with immobilized L-amino acid oxidase for determination of L-amino acids. *J. Food Biochem.* 1999; 23(2):173-185.
- [263] KIBA, N., TACHIBANA, M., TANI, K., MIWA, T., Chemiluminometric branched chain amino acids determination with immobilized enzymes by flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta.* 1998; 375:65-70.
- [264] ANTHONY, JC., YOSHIZAWA, F., ANTHONY, TG., VARY, TC., JEFFERSON, LS., KIMBALL, SR., Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J. Nutr.* 2000; 130:2413–2419.

- [265] NISHITANI, S., MATSUMURA, T., FUJITAN, S., SONAKA, I., MIURA, Y., YAGASAKI, K., Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2002; 299:693–696.
- [266] CAMPBELL, MK., FARRELL, SO., *Biochemistry*, Thompson Learning Inc. 698, USA, 2003.
- [267] <http://nutrabiio.com/Products/leucine.htm>, 09.02.2012.
- [268] <http://www.rxlist.com/dostinex-drug.htm>, 09.02.2012.
- [269] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-35-in-25-dextrose-drug.htm>, 26.03.2012.
- [270] REZAEI, B., ZARE, ZM., Modified glassy carbon electrode with multiwall carbon nanotubes as a voltammetric sensor for determination of leucine in biological and pharmaceutical samples. *Anal. Lett.* 2008; 41:2267–2286.
- [271] STADEN, RIS., MUVHULAWA, LS., Determination of L- and D-enantiomers of leucine using amperometric biosensors based on diamond paste. *Instrum. Sci. Tech.* 2006; 34:475–481.
- [272] MITOME, M., ITO, K., ARAKAWA, H., MAEDA, M., Simultaneous determination of phenylalanine, leucine and galactose in a dried-blood disc by semi-micro FIA using an enzyme-immobilized column and its application to neonatal mass-screening for inborn errors of metabolism. *Bunseki Kagaku.* 2000; 498(6):355-361.
- [273] SCHWEER, H., WATZER, B., SEYBERTH, HW., STEINMETZ, A., SCHAEFER, JR., Determination of isotopic ratios of L-leucine and L-phenylalanine and their stable isotope labeled analogues in biological samples by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1996; 31:727-734.
- [274] KIBA, N., KATO, A., FURUSAWA, M., Determination of branched-chain l-amino-acids by flow-injection analysis with co-immobilized leucine dehydrogenase nadh oxidase and chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* 1995; 311(1):71-76.
- [275] DOUSA, M., BRICHA, C., GIBALA, P., LEHNERT, P., Rapid hydrophilic interaction chromatography determination of lysine in pharmaceutical preparations with fluorescence detection after postcolumn derivatization with o-phtaldialdehyde. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2011; 54:972–978.
- [276] SAUDUBRAY, JM., RABIER, D., Biomarkers identified in inborn errors for lysine, arginine, and ornithine. *J. Nutr.* 2007; 137:1669–1672.

- [277] BOBRESHOVA, OVM., AGUPOVA, V., PARSHINA, AV., Potentiometric determination of lysine in aqueous solutions using MF-4SK modified perfluorinated membranes. *J. Anal. Chem.* 2009; 64(6):642–647.
- [278] <http://nutrabioproducts.com/Products/lysine.htm>, 06.03.2012.
- [279] <http://www.rxlist.com/regranex-drug.htm>, 06.03.2012.
- [280] <http://www.rxlist.com/cayston-drug.htm>, 06.03.2012.
- [281] <http://www.rxlist.com/neoprofen-drug.htm>, 06.03.2012.
- [282] MATSUDA, M., ASANO, Y., Determination of plasma and serum L-lysine using L-lysine *o*-oxidase from *Marinomonas mediterranea* NBRC 103028T. *Anal. Biochem.* 2010; 406:19–23.
- [283] WANG, SW., YU, JH., WAN, FW., GE, SG., YAN, M., ZHANG, M., Flow injection electrochemiluminescence determination of L-lysine using tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium(II) (Ru(bpy)₃(2+)) on indium tin oxide (ITO) glass. *Anal. Methods.* 2011; 3(5):1163-1167.
- [284] HASANI, M., YAGHOUBI, L., ABDOLLAHI, H., A kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of glycine and lysine by artificial neural networks. *Anal. Biochem.* 2007; 365:74–81.
- [285] VEGA, M., ARANDA, M., Determination of available lysine by planar chromatography: a useful tool for protein quality evaluation in fish feed. *J. AOAC. Int.* 2009; 92(3):699-702.
- [286] TABI, T., LOHINAI, Z., PÁLFI, M., LEVINE, M., SZOKO, E., CE-LIF determination of salivary cadaverine and lysine concentration ratio as an indicator of lysine decarboxylase enzyme activity. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391:647–651.
- [287] GARCIA-VILLAR, N., SAURINA, J., HERNANDEZ-CASSOU, S., Flow injection differential potentiometric determination of lysine by using a lysine biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 2003; 477:315–324.
- [288] MITIC, SS., MILETIC, GZ., PETROVIC, AN., TOSIC, SB., A kinetic determination of lysine in pharmaceutical sample. *J. Serb. Chem. Soc.* 2002; 67(11):783–792.
- [289] ZINELLU, A., SOTGIA, S., USAI, MF., ZINELLU, E., POSADINO, AM., GASPA, L., CHESSA, R., PINNA, A., CARTA, F., DEIANA, L., CARRU, C., Plasma methionine determination by capillary electrophoresis–UV assay: Application on patients affected by retinal venous occlusive disease. *Anal. Biochem.* 2007; 363:91–96.

- [290] AGUI, L., MANSO, J., YANEZ-SEDENO, P., PINGARRON, JM., Colloidal-gold cysteamine-modified carbon paste electrodes as suitable electrode materials for the electrochemical determination of sulphur-containing compounds Application to the determination of methionine. *Talanta*. 2004; 64:1041–1047.
- [291] http://nutrabilio.com/Products/methionine_powder.htm, 13.03.2012.
- [292] <http://www.rxlist.com/permax-drug.htm>, 13.03.2012.
- [293] <http://www.rxlist.com/argatroban-drug.htm>, 13.03.2012.
- [294] <http://www.rxlist.com/depo-subq-provera-drug.htm>, 13.03.2012.
- [295] <http://www.rxlist.com/follistim-aq-cartridge-drug.htm>, 13.03.2012.
- [296] <http://www.rxlist.com/aminosyn-rf-52-drug.htm>, 26.03.2012.
- [297] RAMAUTAR, R., RATNAYAKE, CK., SOMSEN, GW., JONGA, GJ., Capillary electrophoresis-mass spectrometry using an in-line sol–gel concentrator for the determination of methionine enkephalin in cerebrospinal fluid. *Talanta*. 2009; 78:638–642.
- [298] PEDRERO, M., SALAS, P., GALVEZ, VILLENA, RFJM., PINGARRON, JM., Ruthenium and ruthenium dioxide-modified graphite–ethylene/ propylene/diene and graphite–Teflon composite electrodes as amperometric flow detectors. Application to the determination of methionine. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 2001; 371:507–513.
- [299] BLASCO, F., MEDINA-HERNHDEZ, MJ., SAGRADO, S., Use of pH gradients in continuous-flow systems and multivariate regression techniques applied to the determination of methionine and cysteine in pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta.* 1997; 348:151-159.
- [300] TOMAXY, HE., MEENOCHITE, AT., Analytical determination of methionine by complex formation with the pentacyanoferrate (II) ion. *Anal. Lett.* 1989; 22(9):2105-2114.
- [301] KHAN, MI., IQBAL, Z., Simultaneous determination of ascorbic acid, amino thiols, and methionine in biological matrices using ion-pairing RP-HPLC coupled with electrochemical detector. *J. Chromatogr. B.* 2011; 879:2567– 2575.
- [302] YANG, L., MESTER, Z., STURGEON, RE., Determination of methionine and selenomethionine in yeast by species-specific isotope dilution GC/MS. *Anal. Chem.* 2004; 76:5149-5156.

- [303] FLEISCHER, H., THUROW, K., Rapid enantiomeric excess determination of D- and L-proline using electrospray ionization-mass spectrometry. *Am. Lab.* 2011; 43(9):32-39.
- [304] SUN, H., LI, L., SU, M., Simultaneous determination of proline and pipemidic acid in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *J. Clin. Lab. Anal.* 2010; 24:327–333.
- [305] SUN, H., LI, L., WU, Y., Capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection for simultaneous determination of proline and fleroxacin in human urine. *Drug Test. Analysis.* 2009; 1:87–92.
- [306] OZOEMENA, KI., STEFAN, RI., Enantioselective, potentiometric membrane electrodes based on maltodextrins. Their applications for the determination of l-proline. *Sensor Actuat. B.* 2004; 98:97–100.
- [307] <http://nutrabis.com/Products/proline.htm>, 26.03.2012.
- [308] <http://www.rxlist.com/privigen-drug.htm>, 26.03.2012.
- [309] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-35-drug.htm>, 26.03.2012.
- [310] ZHANG, M., WAN, F., WANG, S., GE, S., YAN, M., YU, J., Determination of L-proline based on anodic electrochemiluminescence of CdTe quantum dots. *J. Lumin.* 2012; 132:938–943.
- [311] SAITO, K., KOHAMA, J., SAKAMOTO, Y., IWASAKI, Y., ITO, R., HORIE, M., NAKAZAWA, H., Determination of proline enantiomers in honey and royal jelly by LC-UV. *J. AOAC. Int.* 2011; 94(2):482-486.
- [312] SUN, H., LI, L., SU, M., Simultaneous determination of lidocaine, proline and lomefloxacin in human urine by CE with electrochemiluminescence detection. *Chromatographia.* 2008; 67(5/6):399-405.
- [313] DAVYDOVA, EG., KOTOVA, DL., KRYSANOVA, TA., SELEMENEV, VF., Spectrophotometric determination of proline in aqueous solutions. *J. Anal. Chem.* 2005; 60(8):710–713.
- [314] EVGENEV, MI., EVGENEVA, II., Selective spectrophotometric determination of proline and tryptophan as 4,6-Dinitrobenzofuroxan derivatives in the presence of other amino acids. *J. Anal. Chem.* 2000; 5:741-745.

- [315] SIMONIAN, AL., RAININA, EI., LOZINSKY, VI., BADALIAN, IE., KHACHATRIAN, GE., TATIKIAN, SS., MAKHLIS, TA., VARFOLOMEYEV, SD., A biosensor for l-proline determination by use of immobilized microbial-cells. *Appl. Biochem. Biotech.* 1992; 3(3):199-210.
- [316] HERNANDEZ, B., PFLUGER, F., ADENIER, A., NSANGOU, M., KRUGLIK, SG., Energy maps, side chain conformational flexibility, and vibrational features of polar amino acids L-serine and L-threonine in aqueous environment. *J. Chem. Phys.* 2011; 135(055101):1-7.
- [317] NSANGOU, M., DFT study of geometrical and vibrational features of small amino acids with polar side chains in hydrated media: L-Threonine and L-Serine. *Comput. Theoret. Chem.* 2011; 966:364–374.
- [318] JEON, GS., CHOI, DH., LEE, HN., KIM, DW., CHUNG, CK., CHO, SS., Expression of L-serine biosynthetic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase (Phgdh) and neutral amino acid transporter ASCT1 following an excitotoxic lesion in the mouse hippocampus. *Neurochem. Res.* 2009; 34:827–834.
- [319] ASECHI, M., KURAUCHI, I., TOMONAGA, S., YAMANE, H., SUENAGA, R., TSUNEYOSHI, Y., DENBOW, DM., FURUSE, M., Relationships between the sedative and hypnotic effects of intracerebroventricular administration of L-serine and its metabolites, pyruvate and the derivative amino acids contents in the neonatal chicks under acute stressful conditions. *Amino Acids.* 2008; 34:55–60.
- [320] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-425-drug.htm>, 05.04.2012.
- [321] YAQOOB, M., NABI, A., Flow-injection method for the determination of serine using immobilized enzyme. *Talanta.* 2001; 55:1181–1186.
- [322] KATO, M., JIN, HM., SAKAI-KATO, K., TOYOOKA, T., DULAY, MT., ZARE, RN., Determination of glutamine and serine in rat cerebrospinal fluid using capillary electrochromatography with a modified photopolymerized sol-gel monolithic column. *J. Chromatogr. A.* 2003; 1004:209–215.
- [323] HASEGAWA, H., SHINOHARA, Y., MASUDA, N., HASHIMOTO, T., ICHIDA, K., Simultaneous determination of serine enantiomers in plasma using Mosher's reagent and stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* 2011; 46:502–507.
- [324] FUKUSHIMA, T., KAWAI, J., IMAI, K., TOYOOKA, T., Simultaneous determination of D- and L-serine in rat brain microdialysis sample using a column-switching HPLC with fluorimetric detection. *Biomed. Chromatogr.* 2004; 18:813–819.

- [325] NEZAMZADEH-EJHIEH, A., HASHEMI, HS., Voltammetric determination of cysteine using carbon paste electrode modified with Co(II)-Y zeolite. *Talanta*. 2012; 88:201–208.
- [326] MATTSON, MP., SHEA, TB., Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends. Neurosci.* 2003; 26(3):137-146.
- [327] <http://www.rxlist.com/chirhostim-drug.htm>, 06.04.2012.
- [328] <http://www.rxlist.com/zyban-drug.htm>, 06.04.2012.
- [329] <http://www.rxlist.com/cardiolite-drug.htm>, 06.04.2012.
- [330] <http://www.rxlist.com/acthrel-drug.htm>, 06.04.2012.
- [331] <http://www.rxlist.com/miraluma-drug.htm>, 06.04.2012.
- [332] <http://www.rxlist.com/wellbutrin-sr-drug.htm>, 09.04.2012.
- [333] JIA, D., LI, F., SHENG, L., REN, Q., DONG, S., XU, S., MU, Y., MIAO, Y., Synthesis and assembly of ultrathin film of Ni(OH)₂ nanoparticles at gas/liquid interface, its high electrocatalytic oxidation toward bio-thiols and selective determination of cysteine. *Electrochem. Commun.* 2011; 13:1119–1122.
- [334] YOSHITAKE, M., NOHTA, H., SEJIMA, N., TODOROKI, K., YOSHIDA, H., YAMAGUCHI, M., Selective determination of cysteines through precolumn double-labeling and liquid chromatography followed by detection of intramolecular FRET. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 399:1665–1675.
- [335] LU, J., SUN, C., CHEN, W., MA, H., SHI, W., LI, X., Determination of non-protein cysteine in human serum by a designed BODIPY-based fluorescent probe. *Talanta*. 2011; 83:1050–1056.
- [336] WEI, X., QIA, L., TAN, J., LIU, R., WANG, F., A colorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta.* 2010; 671:80–84.
- [337] LI, H., XU, J., YAN, H., Ratiometric fluorescent determination of cysteine based on organic nanoparticles of naphthalene–thiourea–thiadiazole-linked molecule. *Sensor. Actuat. B.* 2009; 139:483–487.
- [338] YANG, P., CHEN, Y., ZHU, Q., WANG, F., WANG, L., LI, Y., Sensitive chemiluminescence method for the determination of glutathione, L-cysteine and 6-mercaptopurine. *Microchim. Acta.* 2008; 163:263–269.

- [339] NAIK, RM., SARKAR, J., PRASAD, S., Kinetic determination of cysteine and thiosulphate by inhibition of Hg (II) catalyzed ligand substitution reaction. *Microchem. J.* 2008; 88:45–51.
- [340] KARGOSHA, K., AHMADI, SH., ZEEB, M., MOEINOSSADAT, SR., Vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of l-cysteine and l-cystine. *Talanta.* 2008; 74:753–759.
- [341] RUIZ-DIAZ, JJJ., TORRIERO, AAJ., SALINAS, E., MARCHEVSKY, EJ., SANZ, MI., RABA, J., Enzymatic rotating biosensor for cysteine and glutathione determination in a FIA system. *Talanta.* 2006; 68:1343–1352.
- [342] LI, ZP., DUAN., RUI, X., LIU, CH., DU, BA., Selective determination of cysteine by resonance light scattering technique based on self-assembly of gold nanoparticles. *Anal. Biochem.* 2006; 351:18–25.
- [343] MARRUBINI, G., CACCIALANZA, G., MASSOLINI, G., Determination of glycine and threonine in topical dermatological preparations. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2008; 47:716–722.
- [344] UEATRONGCHIT, T., ASANO, Y., Highly selective L-threonine 3-dehydrogenase from *Cupriavidus necator* and its use in determination of L-threonine. *Anal. Biochem.* 2011; 410:44–56.
- [345] <http://www.nutrabio.com/Products/threonine.htm>, 21.04.2012.
- [346] <http://www.rxlist.com/cinryze-drug.htm>, 21.04.2012.
- [347] <http://www.rxlist.com/temodar-drug.htm>, 22.04.2012.
- [348] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-drug.htm>, 22.04.2012.
- [349] OKA, K., KIMURA, T., OTSUKA, M., OHMORI, S., Specific determination of threonine in biological samples by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. B.* 2006; 830:173–177.
- [350] ZHAO, H., HAMASE, K., MORIKAWA, A., QIU, Z., ZAITSU, K., Determination of d- and l-enantiomers of threonine and allo-threonine in mammals using two-step high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2004; 810:245–250.
- [351] THOMSON, J., RANKIN, H., ASHCROFT, GW., YATES, CM., MCQUEEN, JK., CUMMINGS, SW., The treatment of depression in general practice: a comparison of L-tryptophan, amitriptyline, and a combination of L-tryptophan and amitriptyline with placebo. *Psychol. Med.* 1982; 12:741-751.

- [352] MAZLOUM-ARDAKANI, M., GANJIPOUR, B., BEITOLLAHI, H., AMINI, MK., MİRKHALAF, F., NAEIMI, H., NEJATI-BARZOKIF, M., Simultaneous determination of levodopa, carbidopa and tryptophan using nanostructured electrochemical sensor based on novel hydroquinone and carbon nanotubes: Application to the analysis of some real samples. *Electrochim. Acta* 2011; 56:9113– 9120.
- [353] GOYAL, RN., BISHNOI, S., CHASTA, H., AZIZ, A., OYAMA, M., Effect of surface modification of indium tin oxide by nanoparticles on the electrochemical determination of tryptophan. *Talanta*. 2011; 85:2626–2631.
- [354] <http://nutrabiocom/Products/tryptophan.htm>, 23.04.2012.
- [355] <http://www.rxlist.com/aminosyn-ii-5-drug.htm>, 23.04.2012.
- [356] ENSAFI, AA., KARIMI-MALEH, H., MALLAKPOUR, S., Simultaneous determination of ascorbic acid, acetaminophen, and tryptophan by square wave voltammetry using N-(3,4-dihydroxyphenethyl)-3,5-dinitrobenzamide-modified carbon nanotubes paste electrode. *Electroanalysis*. 2012; 24(3):666 – 675.
- [357] IIZUKA, H., ISHII, K., HIRASA, Y., KUBO, K., FUKUSHIMA, T., Fluorescence determination of d- and l-tryptophan concentrations in rat plasma following administration of tryptophan enantiomers using HPLC with pre-column derivatization. *J. Chromatogr. B*. 2011; 879:3208–3213.
- [358] HUANG, GG., CHENG, ML., YANG, J., Metal ion-assisted infrared optical sensor for selective determination of tryptophan in urine samples. *J. Chin. Chem. Soc.TAIP*. 2011; 58:435-442.
- [359] WU, F., TONG, B., ZHANG, Q., Application of a new iridium complex as a chemiluminescence reagent for the determination of tryptophan. *Anal. Sci*. 2011; 27:529-533.
- [360] GAO, J., QU, J., YANG, W., WEI, X., DAI, H., LV, D., REN, J., CHEN, H., Kinetic determination of tryptophan by using the B-Z oscillating chemical system. *Amino Acids*. 2009; 36:391–397.
- [361] CHUANG, CH., CHEN, YT., Raman scattering of L-tryptophan enhanced by surface plasmon of silver nanoparticles: vibrational assignment and structural determination. *J. Raman. Spectrosc*. 2009; 40: 150–156.
- [362] RAZMI, H., NASIRI, H., MOHAMMAD-REZAEI, R., Amperometric determination of L-tyrosine by an enzymeless sensor based on a carbon ceramic electrode modified with copper oxide nanoparticles. *Microchim. Acta*. 2011; 173:59–64.

- [363] GELENBERG, AJ., GIBSON, CJ., WOJCIK, JD., Neurotransmitter precursors for the treatment of depression. *Psychopharmacol. Bull.* 1982; 18(1):7-18.
- [364] XU, Q., WANG, SF., Electrocatalytic oxidation and direct determination of L-tyrosine by square wave voltammetry at multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. *Microchim. Acta.* 2005; 151:47–52.
- [365] BABAEI, A., ZENDEHDEL, M., KHALILZADEH, B., ABNOSI, M., A New sensor for simultaneous determination of tyrosine and dopamine using iron (III) doped zeolite modified carbon paste electrode. *Chin. J. Chem.* 2010; 28:1967—1972.
- [366] <http://nutrabilio.com/Products/tyrosine.htm>, 26.04.2012.
- [367] <http://www.rxlist.com/aminosyn-pf-7-drug.htm>, 27.04.2012.
- [368] FAN, Y., LIU, JH., LU, HT., ZHANG, Q., Electrochemistry and voltammetric determination of L-tryptophan and L-tyrosine using a glassy carbon electrode modified with a Nafion/TiO₂-graphene composite film. *Microchim. Acta.* 2011; 173:241–247.
- [369] MA, Q., YU, W., HUANG, H., SU, X., Determination of L-tyrosine based on luminescence quenching of Mn-doped ZnSe quantum dots in enzyme catalysis system. *J. Fluoresc.* 2011; 21:125–131.
- [370] LI, YJ., Optical determination of L-tyrosine based on eggshell membrane immobilized tyrosinase. *J. AOAC. Int.* 2010; 93(6):1912-1915.
- [371] ZHU, X., XU, S., Determination of l-tyrosine by β -cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method. *Spectrochim. Acta A.* 2010; 77:566–571.
- [372] LIN, HC., CHOU, YH., YANG, J., Development of an aminocarboxylic acid-modified infrared chemical sensor for selective determination of tyrosine in urine. *Anal. Chim. Acta.* 2008; 606:230–238.
- [373] ZHANG, WZ., LANG, C., KAYE, DM., Determination of plasma free 3-nitrotyrosine and tyrosine by reversed-phase liquid chromatography with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan derivatization. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 273–278.
- [374] KAKAZU, E., KANNO, N., UENO, Y., SHIMOSEGAWA, T., Extracellular branched-chain amino acids, especially valine, regulate maturation and function of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 2007;179:7137-7146.

- [375] RIAZI, R., RAFII, M., WYKES, L.J., BALL, RO., PENCHARZ, PB., Valine may be the first limiting branched-chain amino acid in egg protein in men. *J. Nutr.* 2003; 133:3533–3539.
- [376] YOSHIKAWA, F., New therapeutic strategy for amino acid medicine: notable functions of branched chain amino acids as biological regulators. *J. Pharmacol. Sci.* 2012; 118(2):149–155.
- [377] <http://nutrabilio.com/Products/valine.htm>, 03.05.2012.
- [378] <http://www.rxlist.com/aminosyn-pf-7-drug.htm>, 03.05.2012.
- [379] GAO, J., LI, Q., YANG, W., LIU, X., REN, J., YANG, H., DENG, H., Determination of L-valine based on an oscillating chemical reaction. *Electroanalysis.* 2002; 14(17):1191-1196.
- [380] LIANG, R., WANG, L., MENG, X., WANG, J., QIU, J., Enhanced electrophoresis separation of non-electroactive amino acids on poly(dimethylsiloxane) microchip coupled with direct electrochemical detection on a copper electrode. *Microfluid. Nanofluid.* 2011; 11:227–233.
- [381] KABELOVA, I., DVORAKOVA, M., CIZKOVA, H., DOSTALEK, P., MELZOK, K., Determination of free amino acids in beers: A comparison of Czech and foreign brands. *J. Food Compos. Anal.* 2008; 21:736–741.
- [382] SHEN, Z., SUN, Z., WU, L., WU, K., SUN, S., HUANG, Z., Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 2002; 979:227–232.
- [383] GÖZÜKARA E.M., *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., S.105-107, İstanbul, 2001.*
- [384] PAMUK, F., *Biyokimya, Gazi Kitabevi, S.343,103, Ankara, 2000.*
- [385] HAMES, D., HOOPER, N., *Biyokimya, Nobel Yayın Dağıtım, S.37, 83, Ankara, 2010.*
- [386] MAJOREK, K.A., POREBSKI, P.J., CHRUSZCZ, M., ALMO, S.C., MINOR, W., Crystal structure of bovine serum albumin. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3V03&bionumber=1>, 14.05.2012.
- [387] ZHANG, G., MA, Y., WANG, L., ZHANG, Y., ZHOU, J., Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. *Food Chem.* 2012; 133:264–270.

- [388] KHODARAHMI, R., KARIMI, SA., KOOSHK, MRA., GHADAMI, SA., GHOBADI, S., AMANI, M., Comparative spectroscopic studies on drug binding characteristics and protein surface hydrophobicity of native and modified forms of bovine serum albumin: possible relevance to change in protein structure/function upon non-enzymatic glycation. *Spectrochim. Acta. A.* 2012; 89:177– 186.
- [389] ZHANG, Y., SHI, S., SUN, X., XIONG, X., PENG, M., The effect of Cu^{2+} on interaction between flavonoids with different C-ring substituents and bovine serum albumin: Structure–affinity relationship aspect. *J. Inorg. Biochem.* 2011; 105:1529–1537.
- [390] <http://www.rxlist.com/attenuvax-drug.htm>, 14.05.2012.
- [391] <http://www.rxlist.com/meruvax-drug.htm>, 14.05.2012.
- [392] <http://www.rxlist.com/mumpsvox-drug.htm>, 14.05.2012.
- [393] <http://www.rxlist.com/proquad-drug.htm>, 14.05.2012.
- [394] <http://www.rxlist.com/ixiaro-drug.htm>, 14.05.2012.
- [395] <http://www.rxlist.com/pentacel-drug.htm>, 14.05.2012.
- [396] YU, JH., GE, L., HUANG, JD., GE, SG., Microemulsion sensitized determination of BSA by resonance rayleigh scattering method. 2009 3rd International Conference On Bioinformatics And Biomedical Engineering 2009; 1(11):2588-2590.
- [397] PENG, L., LI, CY., LIEW, KY., ZHAN, GQ., Determination of BSA applying resonance light scattering (RLS) spectroscopy and ruthenium nanoparticles. *Chem. Anal. Warsaw.* 2009; 54(6):1423-1432.
- [398] LI, L., ZHANG, F., DING, Y., WANG, Y., ZHANG, L., Synthesis of functionalized ZnSe nanoparticles and their applications in the determination of bovine serum albumin. *J. Fluoresc.* 2009; 19:437–441.
- [399] SUZnjevic, D., ERCEG, M., VUCELIC, D., Indirect method for quantitative determination of bovine serum albumin and transferrin by anodic stripping voltammetry with a rotating glassy carbon electrode. *Microchem. J.* 2001; 69:59-71.
- [400] JINGHUA, Y., FUWEI, W., CONGCONG, Z., MEI, Y., XIAONA, Z., SHAOWEI, W., Molecularly imprinted polymeric microspheres for determination of bovine serum albumin based on flow injection chemiluminescence sensor. *Biosens. Bioelectron.* 2010; 26:632–637.

- [401] LUO, D., LAN, J., ZHOU, C., LUO, C., Polarographic behavior of Co(II)-BSA or -HSA complex in the presence of a guanidine modifier. *Anal. Chem.* 2003; 75:6346-6350.
- [402] LEE, SH., SUH, JK., LI, M., Determination of bovine serum albumin by its enhancement effect of Nile blue fluorescence. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2003; 24(1):45-48.
- [403] PIKE, AC., BREW, K., ACHARYA, K.R., Crystal structures of guinea-pig, goat and bovine alpha-lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthase. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1HFX&bionumber=1>, 21.05.2012.
- [404] BARBANA, C., PEREZ, MD., Interaction of α -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties: A review. *Int. Dairy J.* 2011; 21:727-741.
- [405] CATIAU, L., DELVAL-DUBOIS, V., GUILLOCHON, D., NEDJAR-ARROUME, N., Characterization and identification of a chymotryptic hydrolysate of alpha-lactalbumin stimulating cholecystokinin release in STC-1 cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011;165:1264–1273.
- [406] MAZRI, C., SANCHEZ, L., RAMOS, SJ., CALVO, M., PEREZ, MD., Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. *Eur. Food Res. Technol.* 2012; 234:813–819.
- [407] http://nutrabilio.com/Products/whey_protein_concentrate.htm, 21.05.2012.
- [408] REN, Y., HAN, Z., CHU, X., ZHANG, J., CAI, Z., WU, Y., Simultaneous determination of bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin in infant formulae by ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2010; 667:96–102.
- [409] BUTIKOFER, U., MEYER, J., REHBERGER, B., Determination of the percentage of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin of total milk protein in raw and heat treated skim milk. *Milchwissenschaft.* 2006; 61(3):263-266.
- [410] BILLAKANTI JM., FEE, CJ., LANE, FR., KASH, AS., FREDERICKS, R., Simultaneous, quantitative detection of five whey proteins in multiple samples by surface plasmon resonance. *Int. Dairy J.* 2010; 20:96–105.
- [411] MARCHAL, E., COLLARD-BOVY, C., HUMBERT, G., LINDEN, G., MONTAGNE, P., DUHEILLE, J., VARCIN, P. Microparticle-enhanced nephelometric immunoassay. 2. measurement α -lactalbumin and β -lactoglobulin. *J. Dairy Sci.* 1991; 74(11): 3702–3708.

- [412] DING, X., YANG, Y., ZHAO, S., LI, Y., WANG, Z., Analysis of α -lactalbumin, α -lactoglobulin A and B in whey protein powder, colostrum, raw milk, and infant formula by CE and LC. Dairy Sci. Tech. 2011; 91(2):213-225.
- [413] EICH, RF., LI, T., LEMON, DD., DOHERTY, DH., CURRY, SR., AITKEN, JF., MATHEWS, AJ., JOHNSON, KA., SMITH, RD., PHILLIPS, GN., OLSON, JS., Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. <http://www.rcsb.org/pdb/explorer/jmol.do?structureId=1TES&bionumber=1>, 22.05.2012.
- [414] YI, J., HEINECKE, J., TAN, H., FORD, PC., RICHTER-ADDO, GB., The distal pocket histidine residue in horse heart myoglobin directs the *o*-binding mode of nitrite to the heme iron. J. Am. Chem. Soc. 2009; 131:18119–18128.
- [415] SANCTIS, GD., PETRELLA, G., CIACCIO, C., FEIS, A., SMULEVICH, G., COLETTA, M., A comparative study on axial coordination and ligand binding in ferric mini myoglobin and horse heart myoglobin. Biophys. J. 2007; 93:2135–2142.
- [416] OSBORNE, RL., COGGINS, MK., WALLA, M., DAWSON, JH., Horse heart myoglobin catalyzes the H₂O₂-dependent oxidative dehalogenation of chlorophenols to dna-binding radicals and quinones. Biochemistry US. 2007; 46:9823-9829.
- [417] BELOGORTSEVA, N., RUBIO, M., TERRELL, W., MIKSOVSKA, J., The contribution of heme propionate groups to the conformational dynamics associated with CO photodissociation from horse heart myoglobin. J. Inor. Biochem. 2007; 101:977–986.
- [418] COUCK, P., CLAEYS, R., VANDERSTRAETEN, E., GORUS, FK., Evaluation of the Stratus CS fluorometer for the determination of plasma myoglobin. Acta. Clin. Belg. 2005; 60(2):75-78.
- [419] ZHENG, Q., LIU, Z., CAI, R., Determination of myoglobin based on its enzymatic activity by stopped-flow spectrophotometry. Spectrochim. Acta A. 2005; 61:1035–1038.
- [420] LIANG, H., SCOTT, MK., MURRY, DJ., SOWINSKI, KM., Determination of albumin and myoglobin in dialysate and ultrafiltrate samples by high-performance size-exclusion chromatography. J. Chromatogr. B. 2001; 754:141–151.
- [421] YAN, F., RUAN, C., CHEN, X., DENG, J., KONG, J., Amperometric method for the determination of myoglobin based on the electrochemical reduction on the glassy carbon electrode. Fresenius J. Anal. Chem. 1999; 363:83–87.

- [422] LONG, YT., ZHU, JJ., CHEN, HY., Preconcentration and voltammetric determination of trace myoglobin at a 6-mercaptopurine modified silver electrode. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998; 360:614–617.
- [423] OELLINGRATH, IM., IVERSEN, A., SKREDE, G., Quantitative determination of myoglobin and haemoglobin in beef by high-performance liquid chromatography. *Meat Sci.* 1990; 28(4):313–320.
- [424] KITAO, T., MIYAISHI, S., ISHIZU, H., Effects of pH and urea on the determination of urinary myoglobin concentration by an enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta.* 1999; 282:203–209.
- [425] KARLSON, P., Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya, Arkadaş Tıp Kitapları, S.64, Kırklareli, 1992.
- [426] RAO, JK., BUJACZ, G., WLODAWER, A., Crystal structure of rabbit muscle creatine kinase. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2CRK&bionumber=1>, 24.05.2012.
- [427] FORESTER, BP., ZUO, CS., RAVICHANDRAN, C., HARPER, DG., DU, F., KIM, S., COHEN, BM., RENSCHAW, PF., Coenzyme Q10 effects on creatine kinase activity and mood in geriatric bipolar depression. *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.* 2012; 25(1):43-50.
- [428] BREWSTER, LM., CORONEL, CMD., SLUITER, W., CLARK, JF., MONTFRANS, GA., Ethnic differences in tissue creatine kinase activity: an observational study. *Plos. One.* 2012; 7(3):1-3.
- [429] WANGA, CY., CHEN, YC., SHEU, DC., CHOU, TC., Molecularly imprinted polymers for the recognition of sodium dodecyl sulfate denatured creatine kinase. *J. Taiwan Inst. Chem. E.* 2012; 43:188–194.
- [430] LIU, CX., JIANG, LY., WANG, H., GUO, ZH., CAI, XX., A novel disposable amperometric biosensor based on trienzyme electrode for the determination of total creatine kinase. *Sensor. Actuat. B.* 2007; 122:295–300.
- [431] FUJIMA, JM., DANIELSON, ND., Determination of creatine kinase activity and phosphocreatine in off-line and on-line modes with capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta.* 1998; 375:233-241.
- [432] FERNANDEZ-ROMERO, JM., CASTRO, MDL., Determination of creatine kinase activity using a co-immobilized auxiliary enzyme reactor coupled on-line with a flow injection system. *Analyst.* 1991; 116:167-169.
- [433] AMINLARI, M., REZAIAN, GR., Determination of creatine kinase in the sera of patients with myocardial infarction by a rhonitrophenylglyoxal method. *Ann. Clin. Biochem.* 1990; 6:569-574.

- [434] GIROTTI, S., CASCIONE, ML., GHINI, S., CARREA, G., BOVARA R., RODA, A., MOTTA, R., PETILINO, R., Bioluminescence flow sensor for determination of creatine kinase activity in blood. *Anal. Chim. Acta.* 1989; 227:29–36.
- [435] KLEYWEGT, GJ., DIVNE, C., Structure of lysozyme. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2CDS&bionumber=1>, 28.05.2012.
- [436] GAO, FY., QU, L., YU, SG., YE, X., TIAN, YY., ZHANG, LL., BAI, JJ., LU, M., Identification and expression analysis of three c-type lysozymes in oreochromis aureus. *Fish Shellfish Immun.* 2012; 32:779–788.
- [437] MYINT, SL., SHIMOGIRI, T., KINOSHITA, K., NIRASAWA, K., SAITOH, N., WATANABE, H., KAWABE, K., MAEDA, Y., OKAMOTO, S., Analysis of egg white lysozyme polymorphisms among japanese quail populations in Japan and France. *J. Poult. Sci.* 2012; 49:74–78.
- [438] LIBURDI, K., STRANIERO, R., BENUCCI, I., GARZILLO, AMV., ESTI, M., Lysozyme immobilized on micro-sized magnetic particles: kinetic parameters at wine pH. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2012; 166:1736–1746.
- [439] LIU, S., LI, X., LU, D., SHANG, S., WANG, M., ZHENG, M., ZHANG, R., TANG, B., LI, Q., DAI, Y., LI, N., High-level expression of bioactive recombinant human lysozyme in the milk of transgenic mice using a modified human lactoferrin BAC. *Transgenic. Res.* 2012; 21:407–414.
- [440] CAI, Z., CHEN, G., HUANG, X., MA, M., Determination of lysozyme at the nanogram level in chicken egg white using Resonance Rayleigh-scattering method with Cd-doped ZnSe quantum dots as probe. *Sensor. Actuat. B.* 2011; 157:368–373.
- [441] QIAN, ZS., LIU, MG., TIAN, DH., HAO, D., ZHU, CQ., Fluorescence enhancement method for determination of lysozyme using fluorescent gold nanoparticles as probe. *Chinese J. Anal. Chem.* 2011; 39(5):611–616.
- [442] LI, Y., QI, H., GAO, Q., ZHANG, C., Label-free and sensitive electrogenerated chemiluminescence aptasensor for the determination of lysozyme. *Biosens. Bioelectron.* 2011; 26:2733–2736.
- [443] TIAN, MM., SU, RY., JIA, Q., BAO, CL., QUAN, XJ., Spectrophotometric determination of lysozyme by on-line preconcentration with a microcolumn containing La³⁺-TiO₂-zeolite. *Chin. J. Anal. Chem.* 2011; 39(1):103–106.

- [444] WANG, CY., WANG, DY., WANG, GX., HU, XY., Determination of lysozyme using microcantilever sensor based on atomic force microscopy. *Chin. J. Anal. Chem.* 2010; 38(12):1771–1775.
- [445] SUN, W., ZHAO, N., NIU, X., WANG, Y., JIAO, K., Linear sweep voltammetric studies on the supramolecular complex of alizarin red S with lysozyme and determination of lysozyme. *J. Chem. Sci.* 2009; 121(2):217–223.
- [446] CHAMORRO GAVILANES, JA., CUESTA-SEIJO, JA., GARCIA-GRANDA, S., Pancreatic bovine trypsin native and inhibited with Benzamidine from synchrotron data. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1S0Q&bionumber=1>, 30.05.2012.
- [447] BAYRAMOGLU, G., YAKUP ARICA, M., Development of a sensitive method for selection of affinity ligand for trypsin using quartz crystal microbalance sensor. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2012; 35:423–431.
- [448] CHI, Z., LIU, R., YANG, H., SHEN, H., WANG, J., Binding of tetracycline and chlortetracycline to the enzyme trypsin: spectroscopic and molecular modeling investigations. *Plos. One.* 2011; 6(12):1-9.
- [449] SUN, L., LI, Y., YANG, P., ZHU, G., DOVICH, NJ., High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres. *J. Chromatogr. A.* 2012;1220:68– 74.
- [450] HU, L., HAN, S., PARVEEN, S., YUAN, Y., ZHANG, L., XU, G., Highly sensitive fluorescent detection of trypsin based on BSA-stabilized gold nanoclusters. *Biosens. Bioelectron.* 2012; 32:297– 299.
- [451] NEFF, PA., SERR, A., WUNDERLICH, BK., BAUSCH, AR., Label-free electrical determination of trypsin activity by a silicon-on-insulator based thin film resistor. *Chem. Phys. Chem.* 2007; 8:2133 – 2137.
- [452] BRACA, E., SECCO, E., SPINETTI, M., RASPI, G., Determination of trypsin, chymotrypsin and kallikrein in porcine pancreas extracts by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia.* 2002; 55(11/12):693-707.
- [453] SEEGOPAL, P., RECHNITZ, GA., Kinetic determination of trypsin with an ammonia gas-sensing membrane electrode. *Anal. Lett.* 1982; 15(88):709-719.
- [454] SUZUKI, T., TAKAHATA, J., MIYAUCHI, K., MEGURO, H., A sensitive determination of trypsin and inhibitor with a new substrate, tosyl-L-arginyl-L-phenylalanine, *Agr. Biol. Chem. Tokyo.* 1983; 47(12):2913-2914.

- [455] MAYORAL, JG., ALARCON, FJ., MARTINEZ, TF., BARRANCO, P., NORIEGA, F., An improved end-point fluorimetric procedure for the determination of low amounts of trypsin activity in biological samples using rhodamine-110-based substrates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010; 160:1–8.
- [456] LI, H., CUI, Z., HAN, C., Glutathione-stabilized silver nanoparticles as colorimetric sensor for Ni²⁺ ion. *Sensor. Actuat. B.* 2009, 143:87–92.
- [457] LI, H., BIAN, Y., Selective colorimetric sensing of histidine in aqueous solutions using cysteine modified silver nanoparticles in the presence of Hg²⁺. *Nanotechnology.* 2009; 20(145502):1-6.
- [458] MANDAL, S., GOLE, A., LALA, N., GONNADE, R., GANVIR, V., SASTRY, M., Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir.* 2001; 17:6262-6268.
- [459] JAIN, PK., EL-SAYED, IH., EL-SAYED, MA., Au nanoparticles target cancer. *Nanotoday.* 2007; 2(1):18-29.
- [460] BIERI, M., BURGI, T., L-glutathione chemisorption on gold and acid/base induced structural changes: a pm-irras and time-resolved in situ atr-ir spectroscopic study. *Langmuir.* 2005; 21:1354-1363.
- [461] SILVER, J., HAMED, MY., Studies of the reactions of ferric iron with glutathione and some related thiols. Part V. Solid complexes containing Fe^{II} and glutathione or Fe^{III} with oxidized glutathione. *Inor. Chim. Acta.* 1985; 107(3):169–178.
- [462] BELL, RA., BENNET, S., BRITTEN, FJ., HU, M., Silver complexes of environmental and related thiols: structural studies. *Anal. Chem.* 1989; 61(114):13-18.
- [463] SHINDO, H., BROWN, TL., Infrared spectra of complexes of l-cysteine and related compounds with zinc (II), cadmium (II), mercury (II), and lead (II). *J. Am. Chem. Soc.* 1965; 5(87):1904-1909.
- [464] LIM, IS., MOTT, D., IP, W., NJOKI, PN., PAN, Y., ZHOU, S., ZHONG, CJ., Interparticle interactions in glutathione mediated assembly of gold nanoparticles. *Langmuir.* 2008; 24:8857-8863.
- [465] BASU, S., GHOSH, SK., KUNDU, S., PANIGRAHI, S., PRAHARAJ, S., PANDE, S., JANA, S., PAL, T., Biomolecule induced nanoparticle aggregation: effect of particle size on interparticle coupling. *J. Colloid Interf. Sci.* 2007; 313:724–734.

- [466] PETEAN, I., TOMOAI, GH., HOROVITZ, O., MOCANU, A., TOMOAI-COTISEL, M., Cysteine mediated assembly of gold nanoparticles. *J. Optoelectron. Adv. M.* 2008; 10(9):2289–2292.
- [467] PANIGRAHI, S., KUNDU, S., BASU, S., PRAHARAJ, S., JANA, S., PANDE, S., GHOSH, SK., PAL, A., PAL, T., Cysteine functionalized copper organosol: synthesis, characterization and catalytic application. *Nanotechnology.* 2006; 17:5461–5468.
- [468] SANTANA, H., PAESANO, A., COSTA, ACS., MAURO, E., SOUZA, IG., IVASHITA, FF., SOUZA, CMD., ZAIA, CTBV., ZAIA, DAM., Cysteine, thiourea and thiocyanate interactions with clays: FT-IR, Mossbauer and EPR spectroscopy and X-ray diffractometry studies. *Amino Acids.* 2010; 38:1089–1099.
- [469] NIU, H., VOLESKY, B., Gold-cyanide biosorption with l-cysteine. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2000; 75:436-442.
- [470] DESROCHERS, PJ., CUTTS, RW., RICE, PK., GOLDEN, ML., GRAHAM, JB., BARCLAY, TM., CORDES, AW., Characteristics of five-coordinate nickel-cysteine centers. *Inorg. Chem.* 1999; 38:5690-5694.
- [471] BUCHMANN, W., SPEZIA, R., TOURNOIS, G., CARTAILLER, T., TORTAJADA, J., Structures and fragmentations of cobalt(II)–cysteine complexes in the gas phase. *J. Mass Spectrom.* 2007; 42:517–526.
- [472] JALILEHVAND, F., LEUNG, BO., MAH, V., Cadmium (II) complex formation with cysteine and penicillamine. *Inorg. Chem.* 2009; 48:5758-5771.
- [473] SUMESH, E., BOOTHARAJU, MS., PRADEEP, AT., A practical silver nanoparticle-based adsorbent for the removal of Hg^{2+} from water. *J. Hazard. Mater.* 2011; 189:450–457.
- [474] CULZONI, MJ., PENA, AM., MACHUCA, A., GOICOECHEA, HC., BABIANO, R., Rhodamine and BODIPY chemodosimeters and chemosensors for the detection of Hg^{2+} , based on fluorescence enhancement effects. *Anal. Methods.* 2013; 5:30-49.
- [475] REDDY, PR., RADHIKA, M., MANJULA, P., Synthesis and characterization of mixed ligand complexes of Zn(II) and Co(II) with amino acids: Relevance to zinc binding sites in zinc fingers. *J. Chem. Sci.*, 2005; 117(3):239–246.
- [476] BARTH, A., The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog. Biophys. Mol. Bio.* 2000; 74:141–173.

- [477] CHEN, XM., YE, BH., HUANG, XC., XU, ZT., Model complexes for the carboxylate-histidine-metal triad systems in metalloenzymes. Synthesis, crystal structures and spectroscopic properties of $[M(\text{Him})_2(\text{O}_2\text{CMe})_2]$ ($M = \text{Zn}^{\text{II}}$ or Co^{II} , Him= imidazole). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1996; 3465-3468.
- [478] RAYAR, SL., SELVARAJAN, P., Structural, mechanical, FTIR, SHG and thermal studies of L-HFTA single crystals grown by solution method. *RRST*. 2010; 2(10):77-81.
- [479] FORBES, MW., BUSH, MF., POLFER, NC., OOMENS, J., DUNBAR, RC., WILLIAMS, ER., JOCKUSCH, RA., Infrared spectroscopy of arginine cation complexes: direct observation of gas-phase zwitterions. *J. Phys. Chem. A* 2007; 111:11759-11770.
- [480] ARDALAN, P., DAVANI, N., MUSGRAVE, CB., Attachment of alanine and arginine to the Ge(100)-2x1 surface. *J. Phys. Chem. C*. 2007; 111:3692-3699.
- [481] SIDERATOU, Z., TZIVELEKA, LA., KONTOYIANNI, C., TSIOURVAS, D., PALEOS, CM., Design of functional dendritic polymers for application as drug and gene delivery systems. *Gene. Ther. Mol. Biol.* 2006; 10:71-94.
- [482] SINGH, K., INGOLE, PG., BHRAMBHATT, H., BHATTACHAYRA, A., BAJAJ, HC., Preparation, characterization and performance evaluation of chiral selective composite membranes. *Sep. Purif. Technol.* 2011; 78:138-146.
- [483] PATIL, A., PORE, Y., KUCHEKAR, B., Effect of l-arginine on bicalutamide complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 2008; 3(2):89-98.
- [484] KUMAR, S., RAI, SB., Spectroscopic studies of l-arginine molecule. *IJPAP*. 2010; 48:251-255.
- [485] KITADAI, N., YOKOYAMA, T., NAKASHIMA, S., In situ ATR-IR investigation of l-lysine adsorption on montmorillonite. *J. Colloid Interf. Sci.* 2009; 338:395-401.
- [486] KONG, J., YU, S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Bioch. Bioph. Sin.* 2007; 39(8):549-559.
- [487] KRISHNAKUMAR, V., NAGALAKSHMI, R., MANOHARA, S., KOCSIS, L., Probes on l-lysine monohydrochloride dihydrate: A semiorganic nonlinear optical crystal. *Spectrochim. Acta A*. 2008; 71:471-479.

- [488] HAN, J., CHI, YS., SHIN, BK., KIM, SK., PAIK, IK., FT-IR and XRD analyses of commercial methionine-mineral chelates. *Agric. Chem. Biotechnol.* 2006; 49(1):8-10.
- [489] ZOR, S., KANDEMIRLI, F., BINGUL, M., Inhibition effects of methionine and tyrosine on corrosion of iron in hcl solution: electrochemical, ftir, and quantum-chemical study. *Prot. Met. Phys. Chem.* 2009; 45(1):46–53.
- [490] WAGNER, CC., BARAN, EJ., Vibrational spectra of bis(L-methioninato)copper(II). *Acta Farm. Bonaerense.* 2002; 21(4):287-290.
- [491] LEE, Y., LEE, DH., SARJEANT, AAN., KARLIN, KD., Thiol-copper(I) and disulfide–dicopper(I) complex O₂-reactivity leading to sulfonate–copper(II) complex or the formation of a cross-linked thioether–phenol product with phenol addition. *J. Inorg. Biochem.* 2007; 101:1845–1858.
- [492] HUANG, P., KONG, Y., ZHIMING, L, GAO, F., CUI, D., Copper selenide nanosnakes: bovine serum albumin-assisted room temperature controllable synthesis and characterization. *Nanoscale Res. Lett.* 2010; 5:949–956.
- [493] HUANG, P., LI, Z., HU, H., CUI, D., Synthesis and characterization of bovine serum albumin-conjugated copper sulfide nanocomposites. *J. Nanomater.* 2010; 1-6.
- [494] REITER, G., HASSLER, N., WEBER, V., FALKENHAGEN, D., FRINGELI, UP., In situ FTIR ATR spectroscopic study of the interaction of immobilized human tumor necrosis factor- α with a monoclonal antibody in aqueous environment. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1699:253– 261.
- [495] TSAI, DH., DAVILA-MORRIS, M., DELRIO, FW., GUHA, S., ZACHARIAH, MR., HACKLEY, VA., Quantitative determination of competitive molecular adsorption on gold nanoparticles using attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. *Langmuir.* 2011; 27:9302–9313.
- [496] ESTEY, T., KANG, J., SCHWENDEMAN, SP., CARPENTER, JF., BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from plga delivery systems. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95(7):1626-1639.
- [497] TSAI, DH., DELRIO, FW., KEENE, AM., TYNER, KM., MACCUSPIE, RI., CHO, TJ., ZACHARIAH, MR., HACKLEY, VA., Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods. *Langmuir.* 2011; 27:2464–2477.

- [498] FANG, Y., DALGLEISH, DG., The conformation of α -lactalbumin as a function of pH, heat treatment and adsorption at hydrophobic surfaces studied by FTIR. *Food Hydrocolloid*. 1998; 12:121-126.
- [499] MIZUGUCHI, M., NARA, M., KAWANO, K., NITTA, K., FT-IR study of the Ca^{2+} -binding to bovine α -lactalbumin. Relationships between the type of coordination and characteristics of the bands due to the Asp COO⁻ groups in the Ca^{2+} -binding site. *FEBS Lett*. 1997; 417:153-156.
- [500] LAURETO, PP., FRARE, E., GOTTARDO, R., FONTANA, A., Molten globule of bovine α -lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: a comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Proteins*. 2002; 49:385–397.
- [501] LIU, D., ZHOU, P., LIU, X., LABUZA, TP., Moisture-induced aggregation of alpha-lactalbumin: effects of temperature, cations, and pH. *J. Food Sci*. 2011; 76(6):817-823.
- [502] KIM, S., BAUM, J., Electrostatic interactions in the acid denaturation of α -lactalbumin determined by NMR. *Protein Sci*. 1998; 7:1930-1938.
- [503] MENG, FG., HONG, YK., HE, HW., LYUBAREV, AE., KURGANOV, BI., YAN, YB., ZHOU, HM., Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase. *Biophys. J*. 2004; 87:2247–2254.
- [504] RAIMBAULT, C., BUCHET, R., VIAL, C., Changes of creatine kinase secondary structure induced by the release of nucleotides from caged compounds an infrared difference-spectroscopy study. *Eur. J. Biochem*. 1996; 240:134-142.
- [505] VIAL, C., Creatine kinase. Nova Science Publishers, USA 2006; 111-112.
- [506] RAIMHAJLT, C., COUTHON, F., VIAL, C., BUCHET, R., Effects of pH and kcl on the conformations of creatine kinase from rabbit muscle infrared, circular dichroic and fluorescence studies. *Eur. J. Biochem*. 1995; 234:570-578.
- [507] SASSI, P., GIUGLIARELLI, A., PAOLANTONI, M., MORRESI, A., ONORI, G., Unfolding and aggregation of lysozyme: A thermodynamic and kinetic study by FTIR spectroscopy. *Biophys. Chem*. 2011; 158:46–53.
- [508] SHAREGHI, B., FARHADIAN, S., SALAVATI-NIASARI, M., Structural studies on the interaction of nano-SiO₂ with lysozyme. *JNS*. 2012; 1:205-212.

- [509] PEREZ, C., GRIEBENOW, K., Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol. *Biotech. Lett.* 2000; 22:1899–1905.
- [510] HOMCHAUDHURI, L., KUMAR, S., SWAMINATHAN, R., Slow aggregation of lysozyme in alkaline pH monitored in real time employing the fluorescence anisotropy of covalently labelled dansyl probe. *FEBS Lett.* 2006; 580:2097–2101.
- [511] BABU, KR., BHAKUNI, V., Ionic-strength-dependent transition of hen egg-white lysozyme at low pH to a compact state and its aggregation on thermal denaturation. *Eur. J. Biochem.* 1997; 245:781-789.
- [512] OTSUKA, M., FUKUI, Y., OTSUKAC, K., OZAKI, Y., Comparative evaluation of bioactivity change of crystalline trypsin during compression by chemoinformatics and 2-D Fourier-transform infrared spectroscopy. *Analyst.* 2006; 131:1116–1121.
- [513] RUAN, K., LANGE, R., MEERSMAN, F., HEREMAN, K., BALNY, C., Fluorescence and FTIR study of the pressure-induced denaturation of bovine pancreas trypsin. *Eur. J. Biochem.* 1999; 265:79-85.
- [514] SIMON, ML., LASZLO, K., KOTORMAN., M., SZAJANI, B., A comparative study of the conformational stabilities of trypsin and α -chymotrypsin. *Acta Biol. Szeged.* 2001; 45(1-4):43-49.
- [515] BITTAR, ER., CALDEIRA, FR., SANTOS, AMC., GÜNTHER, AR., ROGANA, E., SANTORO, MM., Characterization of β -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2003; 36:1621-1627.
- [516] GREEN, NM., NEURATH, H., The effects of divalent cations on trypsin. *J. Biol. Chem.* 1953; 379-390.

ÖZGEÇMİŞ

Can Serkan KESKİN, 1982 de Adapazarı'nda doğdu. Lise eğitimini Adapazarı Ali Dilmen Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı bölümde tamamladı. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazanarak 2005 yılında mezun oldu. Aynı sene Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa kabul edildi. 2006 yılında aynı yere araştırma görevlisi olarak atandı. 2008 yılında yüksek lisansı bitirerek doktora eğitimine başladı. Bu tezin yazıldığı tarih itibariyle araştırma görevlisi görevini devam ettirmektedir.