



**BAZI SÜLFONİL ÜRE GRUBU HERBİSİT ETKEN
MADDELERİNİN ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ VE ENZİM İNHİBİSYON MEKANİZMASININ KARE
DALGA VOLTAMETRİSİ VE FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

Sedat SEL

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2014

Sedat SEL tarafından hazırlanan “BAZI SÜLFONİL ÜRE GRUBU HERBİSİT ETKEN MADDELERİNİN ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE ENZİM İNHİBİSYON MEKANİZMASININ KARE DALGA VOLTAMETRİSİ VE FLORESANS SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN
Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu Onaylıyorum



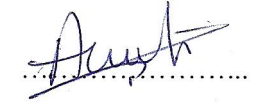
Başkan : Prof. Dr. Zehra YAZAN
Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu Onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Adalet TUNÇELİ
Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu Onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 10/07/2014

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.



Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Sedat SEL

10/7/2014

BAZI SÜLFONİL ÜRE GRUBU HERBİSİT ETKEN MADDELERİNİN
ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE ENZİM İNHİBİSYON
MEKANİZMASININ KARE DALGA VOLTAMETRİSİ VE FLORESANS
SPEKTROSKOPİSİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Sedat SEL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2014

ÖZET

Bu çalışmada, herbisit etken maddesi olarak kullanılan bazı sülfonil üre grubu bileşiklerinin sulu ortamdaki elektrokimyasal davranışları için dönüşümlü voltametri (CV), kare dalga voltametrisi (SWV), kronoamperometri (CA), enzim inhibisyon özelliklerinin incelenmesi için kare dalga voltametrisi ve floresans spektroskopisi gibi teknikler kullanıldı. Sulu ortamda gerçekleşen çalışmalarda 0,02 M pH:7,2 fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) içeren sulu ortam çalışmalarında asılı cıva elektrot kullanıldı. İncelenen maddelerin indirgenme reaksiyonlarında indirgenme potansiyelleri, aktarılan elektron sayıları, difüzyon katsayıları, elektrokimyasal indirgenme mekanizmaları ve buna ilaveten enzim çalışmalarında maddelerin kare dalga voltametrisi ve floresans spektroskopisi yöntemleri kullanılarak glutatyon redüktaz (GR) enzimi ile maddelerin etkileşim mekanizmaları, IC_{50} ve K_i değerleri belirlendi.

Bilim Kodu : 201.01.004

Anahtar Kelimeler : Elektrokimyasal özellikler, Enzim inhibisyonu, Sülfonil üre

Sayfa Adedi : 99

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN

SOME SULFONYL UREA GROUPS ARE USED AS A HERBICIDE ACTIVE
SUBSTANCE OF METARIAL WHICH IS TO INVESTIGATE THE
ELECTROCHEMICAL PROPERTIES AND MECHANISM OF ENZYM INHIBITION
IS DETERMINATED BY SQUARE WAVE VOLTAMMETRY AND FLUORESCENCE
SPECTROSCOPY TECHNICS

(M. Sc. Thesis)

Sedat SEL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2014

ABSTRACT

In this study, the electrochemical behaviour of some compounds either in aqueous media investigated by using cyclic voltammetry (CV), square wave voltammetry (SWV), chronoamperometry (CA) and fluorescence spectroscopy technics. Aqueous medium studies were performed in water containing 0,02 M pH:7,2 phosphate buffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) at dropping mercury electrode. Transferred electron numbers, reduction potential, diffusion coefficients and mechanism of electrochemistry were calculated. Furthermore, the substances with glutathione reductase (GR) enzyme efficiency, IC_{50} and K_i values of substances were detected by using square wave voltammetry and fluorescence spectroscopy technics.

Science Code : 201.01.004

Key Words : Electrochemical properties, Inhibition of enzyme, Sulfonyl urea

Page Number : 99

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmanın, planlamasından tez yazımına kadar değerli katkılarını benden esirgemeyen, bilgi ve hoşgörülerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN'a teşekkür ediyorum. Bilimsel birikim ve tecrübeleriyle yardımını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Nurcan KARACAN'a, Dr. Turgay TUNÇ'a ve Dr. Serhat MAMAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin yazım sürecinde deneysel çalışmalarımın en verimli şekilde sürdürülebilirliğini sağlayan çok değerli arkadaşlarım ve dostlarımdan, Şahin DEMİRCİ, Sadettin GÜLER, Osman Can BEYAZARSLAN, Ömer ŞAHİN, Kübra Begüm VENEDİK, Firdevs İLBİZ, Hatice ORUÇ, Merve Selen AKIN ve Özlem TORAMAN'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bugüne kadar hep yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili babam Mustafa SEL'e, sevgili annem Ayşe SEL'e, abilerim Davut SEL'e, Murat SEL'e ve ablalarım Melahat SEL ERTAN'a, Gülbeyaz CAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pestisitler	3
2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	3
2.1.2. Pestisitlerin tarihsel süreci	4
2.1.3. Pestisitlerin kullanılması	4
2.1.4. Bitkisel ürünlerde pestisit kalıntıları	9
2.2. Bitkilerde Oksidatif Stres	9
2.3. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutasyon.....	10
2.4. Glutasyon Redüktaz.....	11
2.5. Enzim Kinetiği ve Michaelis-Menten Esitliği.....	12
2.6. Enzim İnhibisyonu	16
2.6.1. Enzim inhibisyon çeşitleri.....	16
2.6.2. IC ₅₀ ve K _i değerleri	18
2.7. Elektrokimyasal Yöntemler	19
2.8. Voltametri	20
2.9. Elektrokimyasal Özelliklerin İncelenmesi	37
2.9.1. Maddenin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini	37

Sayfa

2.9.2. Adsorbsiyon kontrol tayini.....	38
2.9.3. Difüzyon kontrolü tayini	40
2.9.4. TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin yükseltgenme veya indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayıları ve difüzyon katsayılarının tayini	40
2.10. Moleküler Floresans Spektroskopisi	41
2.11. Kaynak Araştırması.....	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	45
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	45
3.1.1. Potansiyostat cihazı.....	45
3.1.2. Floresans spektrofotometre cihazı.....	45
3.1.3. Kullanılan elektrotlar	46
3.1.4. pH metre.....	48
3.1.5. Ultra saf su cihazı.....	48
3.1.6. Analitik terazi.....	48
3.1.7. Azot gazı	48
3.2. Numuneler, Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları	48
3.3. TBM, MSM, TFS, TRS Maddelerin Deneysel Çalışmaları	51
3.3.1. Elektrokimyasal özelliklerin belirlenmesi için dönüşümlü voltametri teknığının çalışma şartları.....	51
3.3.2. Kare Dalga Voltametrisi kullanılarak enzim inhibisyon mekanizması, IC ₅₀ ve K _i değerlerinin belirlenmesi	51
3.3.3. TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin IC ₅₀ değerlerinin floresans spektroskopi yöntemiyle belirlenmesi	52
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1. TBM, MSM, TFS ve TRS Maddelerinin Sulu Ortamdaki Bazı Elektrokimyasal Özellikleri	55
4.1.1. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerin indirgenme- yükseltgenme potansiyelinin tayini	55

Sayfa

4.1.2. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin sulu ortamda elektrokimyasal davranışının tayini	58
4.1.3. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini.....	60
4.1.4. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayısı ve difüzyon katsayısının tayini .	63
4.1.5. Sulu ortamda indirgenmiş glutatyon (GSH) için kalibrasyon grafiği, gözlemlenebilirlik sınırı (LOD), tayin sınırının (LOQ) belirlenmesi.....	63
4.2. Enzim İnhibisyonu	66
4.2.1. TBM maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi	67
4.2.2. MSM maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi	69
4.2.3. TFS maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi	70
4.2.4. TRS maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi	71
4.2.5. TBM maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi	73
4.2.6. MSM maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi	74
4.2.7. TFS maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi	76
4.2.8. TRS maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi	77
4.2.9. Enzim için inhibitörsüz ortamda ve farklı inhibitör derişimlerinde K_m ve V_{maks} değerlerinin hesaplanması	79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye’ de bazı pestisitlerin, gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen maksimum pestisit kalıntı miktarları	5
Çizelge 2.2. Türkiye’ de pestisit kullanım miktarları	7
Çizelge 2.3. Bazı AB ülkelerinde ortalama pestisit tüketimi.....	8
Çizelge 3.1. Dönüşümlü voltametrisi için potansiyostatın çalışma şartları	53
Çizelge 3.2. Kare dalga voltametri için potansiyostatın çalışma şartları	53
Çizelge 3.3. Floresans spektrofotometrisi için çalışma şartları	53
Çizelge 4.1. TBM maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları	56
Çizelge 4.2. MSM maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları	56
Çizelge 4.3. TFS maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları	57
Çizelge 4.4. TRS maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları	58
Çizelge 4.5. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerin elektron sayısı, difüzyon katsayısı, sınır akımları ve Cottrell eğimleri.....	63
Çizelge 4.6. pH:7,2 fosfat tamponunun artık akım değerleri.....	64
Çizelge 4.7. Kalibrasyon grafiği eğim değeri, gözlenebilme sınır değeri ve tayin sınırı değeri	65
Çizelge 4.8. TBM için farklı madde ve GSSG derişimlerindeki akım ortalamaları.....	68
Çizelge 4.9. TBM için farklı GSSG derişimlerindeki IC ₅₀ değerleri.....	68
Çizelge 4.10. MSM için farklı madde ve GSSG derişimlerindeki akım ortalamaları	69
Çizelge 4.11. MSM için farklı GSSG derişimlerindeki IC ₅₀ değerleri	70
Çizelge 4.12. TFS için farklı TFS ve GSSG derişimlerindeki akım ortalamaları	70
Çizelge 4.13. TFS için farklı GSSG derişimlerindeki IC ₅₀ değerleri	71
Çizelge 4.14. TRS için farklı madde ve GSSG derişimlerindeki akım ortalamaları	72
Çizelge 4.15. TRS için farklı GSSG derişimlerindeki IC ₅₀ değerleri	73

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.16. TBM için farklı madde derişimlerindeki floresans ortalamaları	73
Çizelge 4.17. MSM için farklı madde derişimlerindeki floresans ortalamaları.....	75
Çizelge 4.18. TFS için farklı madde derişimlerindeki floresans ortalamaları	76
Çizelge 4.19. TRS için farklı madde derişimlerindeki floresans ortalamaları.....	78
Çizelge 4.20. Maddelerin kare dalga ve floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenen IC ₅₀ ve K _i değerlerinin karşılaştırılması	79
Çizelge 4.21. TBM için 1/S ve 1/Vmaks değerleri	79
Çizelge 4.22. TBM için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve (Vmaks) değerleri	81
Çizelge 4.23. MSM için 1/S ve 1/Vmaks değerleri	82
Çizelge 4.24. MSM için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve (Vmaks) değerleri	84
Çizelge 4.25. TFS için 1/S ve 1/Vmaks değerleri.....	84
Çizelge 4.26. TFS için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve (Vmaks) değerleri.....	86
Çizelge 4.27. TRS için 1/S ve 1/Vmaks değerleri	87
Çizelge 4.28. TRS için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve (Vmaks) değerleri	89

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin)	10
Şekil 2.2. Yükseltgenmiş glutatyonun yapısı, GSSG, 2(L- γ -glutamil-L-sisteinil- glisin)	11
Şekil 2.3. Michaelis-Menten Grafiği	14
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk Grafiği.....	15
Şekil 2.5. (a) Yarışmalı ve (b) Yarışmasız inhibisyon çeşitleri	16
Şekil 2.6. Sınırlı yarışmalı inhibisyon çeşidi	16
Şekil 2.7. Elektroanalitik teknikler için bir sınıflandırma örneği	20
Şekil 2.8. Kare dalga voltametrisinde potansiyelin uygulanması	23
Şekil 2.9. Dönüşümlü voltametrde potansiyelin uygulanması	24
Şekil 2.10. CV ile elde edilen akım-potansiyel eğrisi.....	25
Şekil 2.11. İki basamakta indirgenebilen bir maddenin CV' si	26
Şekil 2.12. Tersinir, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için voltamogramlar.....	27
Şekil 2.13. (a) Elektrot tepkimesinde ürünün adsorpsiyonu	27
Şekil 2.14. Dönüşümlü voltametrde akım potansiyel eğrisi	29
Şekil 2.15. EC mekanizmasını gösteren çoklu tarama yapılmış voltamogram örneği ...	33
Şekil 2.16. ECE mekanizmasını gösteren çoklu tarama yapılmış voltamogram örneği .	34
Şekil 2.17. Kronoamperometride çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	36
Şekil 2.18. Ürünün kuvvetli absorbe olduğu olduğu durumda gözlenen voltamogram ...	38
Şekil 2.19. Reaktantın kuvvetli adsorbsiyonunda gözlenen arka pik	39
Şekil 3.1. Tribenuron metil (TBM) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il(metil) karbomil sülfomil]benzoat) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi	50
Şekil 3.2. Metsulfuron metil (MSM) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]benzoate) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi	50
Şekil 3.3. Thifensulfuron (TFS) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]tiyofen 2 karboksilat) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi.....	50

Şekil	Sayfa
Şekil 3.4. Tritosulfuron (TRS) (1-(4-metoksi-6-triflorometil-1,3,5-triazin-2-il)-3-(2-triflorometilbenzensulfonil)üre maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi ...	50
Şekil 4.1. TBM maddesinin pH:7,2 fosfat tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları.....	55
Şekil 4.2. MSM maddesinin pH:7,2 fosfat tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları.....	56
Şekil 4.3. TFS maddesinin pH:7,2 fosfat tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları.....	57
Şekil 4.4. TRS maddesinin pH:7,2 fosfat tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramlar.....	57
Şekil 4.5. TBM için log ipk – log v grafiği.....	58
Şekil 4.6. MSM için log ipk – log v grafiği	59
Şekil 4.7. TFS için log ipk – log v grafiği	59
Şekil 4.8. TRS için log ipk – log v grafiği	60
Şekil 4.9. TBM $ip_k / v^{1/2} - v$ grafiği	61
Şekil 4.10. MSM $ip_k / v^{1/2} - v$ grafiği	61
Şekil 4.11. TFS $ip_k / v^{1/2} - v$ grafiği.....	62
Şekil 4.12. TRS $ip_k / v^{1/2} - v$ grafiği	62
Şekil 4.13. pH:7,2 fosfat tamponunda 10 adet kare dalga voltamogramı.....	64
Şekil 4.14. İndirgenmiş glutatyon için 1×10^{-7} - $1,5 \times 10^{-5}$ mol/L kalibrasyon grafiği.....	65
Şekil 4.15. Tarama sonucunda oluşan GSH'ın 30 s aralıklarla alınmış 10 kare dalga voltamogramı	66
Şekil 4.16. Tepkime sonucunda oluşan GSH'ın 4×10^{-5} M TBM maddesi içeren ortamda 30 s aralıklarla alınmış 10 kare dalga voltamogramı	67
Şekil 4.17. TBM için 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 4×10^{-4} , 8×10^{-4} mol/L derişiminde GSSG için IC_{50} grafiği	68
Şekil 4.18. MSM için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.....	69
Şekil 4.19. TFS için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği	71
Şekil 4.20. TRS için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.....	72

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. TBM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı	74
Şekil 4.22. MSM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı	75
Şekil 4.23. TFS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı	77
Şekil 4.24. TRS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı	78
Şekil 4.25. TBM için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiğı.....	80
Şekil 4.26. TBM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.....	81
Şekil 4.27. MSM için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiğı.....	83
Şekil 4.28. MSM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.....	83
Şekil 4.29. TFS için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiğı	85
Şekil 4.30. TFS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.....	86
Şekil 4.31. TRS için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiğı.....	88
Şekil 4.32. TRS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
A	Elektrotun yüzey alanı, cm^2
C	Ana çözeltideki depolarizer konsantrasyonu, $(\text{mol}/\text{cm}^3), (\text{mol}/\text{lt})$
D	Difüzyon katsayısı, cm^2/s
E	Uygulanan potansiyel (V)
E_{p_k}	Katodik pik potansiyeli, (V)
F	Faraday sabiti
I_d	Difüzyon akımı, (A)
I_p	Pik akımı, (A)
I_{ss}	Ultra mikro elektrotla elde edilen sınır akımı, (A)
n	Aktarılan elektron sayısı
Q	Devreden geçen yük, (C)
s	Standart sapma
S_{cottrell}	Cottrell eşitliğine ait değişimin eğimi
U	Tarama hızı (V/S), (mV/S)

IC₅₀	Enzim aktivite derişimi
K_i	Enzim – inhibitör ayrışma sabiti
Kısaltmalar	Açıklamalar
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
TBM	Tribenuron metil (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il(metil) karbomil sülfomil]benzoat)
MSM	Metsulfuron metil (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]benzoate)
TFS	Thifensulfuron (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]tiyofen 2 karboksilat)
TRS	Tritosulfuron (1-(4-metoksi-6-triflorometil-1,3,5-triazin-2-il)-3-(2-triflorometil benzensulfonil)üre
DMSO	Dimetilsülfoksit

1. GİRİŞ

Pestisitler tarımsal mücadelede zararlı organizmalara karşı kullanılan kimyasal maddeler olarak adlandırılırlar [1]. Pestisitler kullanım amaçlarına göre gruplara ayrılmışlardır. Bu pestisit gruplarından insektisit, herbisit ve fungusitler yaygın olarak kullanılırlar [2]. Pestisit gruplarından olan herbisitler zararlı otları kontrol altına almak amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Bitkilerin kök ve yapraklarından alınan herbisitler, bitkide spesifik olarak etkilediği yapıya (organ, doku, hücre vb.) iletilerek bitkinin gelişmesini kontrol altına alır ya da bitkiyi öldürür.

Sülfonil üre grubu herbisitler yabancı ot kontrolünde önemli bir kimyasal grup olarak yer almaktadır ve G. Lewitt Dupont tarafından 1982 yılında keşfedilmiştir. Yaklaşık 20'den fazla sayıya sahip bir herbisit grubudur. Sülfonil üre grubu herbisitler tahılların üretiminde geniş yapraklı yabancı otların kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sülfonil ürelerin yapısı, bir hetero aromatik sülfamid ile üre köprüsü üzerinden bağlanmış s-triazinik halka veya diazinik yapı ile ifade edilir [3]. Sülfonil ürelerin, 10-50 g/ha arasında en hızlı ve en iyi etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Memelilerde 5000 mg/kg' dan daha düşük oranlarda toksisitesinin oldukça az olduğu belirlenmiştir [4]. Sülfonil üreler toprakta ve sularda biyolojik parçalanma ve kimyasal hidroliz ile bozular. Çevrede birikmesi oldukça azdır [3].

Sülfonil üre herbisitleri, bitkilerde dallı aminoasit sentezinde görev alan asetolaktat sentaz ve glutatyon redüktaz enzimini etkileyerek bitki büyümesini etkiler. Herbisitlerin, asetolaktat sentaz ve glutatyon redüktaz enzimleri dışında etkilediği başka enzimler de vardır. Bunlara örnek vermek gerekirse fotosentez, lipit, oksidatif fosforilasyon ve karotenoit biyosentezde görev alan enzimlerdir.

Enzim inhibitörleri, bir enzime bağlanan ve onun etkinliğini azaltan moleküllerdir. Bir enzim inhibitörü çoğu patojeni durdurabildiği ve bir metabolik düzensizliği düzenlediği için çoğu ilaç bir enzim inhibitörüdür. Ayrıca enzim inhibitörler pestisit olarak da kullanılabilirler.

Glutatyon redüktaz (GR) enzimi düşük veya yüksek molekül ağırlıklı disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler. Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyonun bilinen en önemli hedeflerinden biri hücre

ortamındaki GSSG/GSH oranını korumaktır. Bu oran eritrosit hücrelerinde yaklaşık 500/1' dir. Bu oran düşük olduğu zaman eritrosit hücreleri hemoliz olmaktadır.

Bu çalışmada bazı sülfonil üre grubuna ait herbisitlerin elektrokimyasal özellikleri ve glutatyon redüktaz enzimi için inhibisyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin IC_{50} ve K_i değerleri kare dalga voltametrisi ve floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bunun için;

1. Elektrokimyasal yöntemler kullanılarak,
 - a- Maddelerin elektrokimyasal parametrelerinin (indirgenme potansiyeli, sınır akımı, difüzyon katsayısı ve elektron sayısı) belirlenmesi
 - b- Maddelerin sulu ortamda elektrokimyasal davranışlarının belirlenmesi
 - c- Maddelerin sulu ortamda elektrokimyasal indirgenme mekanizmalarının belirlenmesi
2. Voltametri tekniği kullanılarak maddelerin enzim üzerindeki inhibisyonu ve kinetiğinin incelenmesi
 - a- Reaksiyon sonucu oluşan GSH ın doğrusal çalışma aralığı, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerlerinin belirlenmesi
 - b- Maddelerin IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesi
 - c- K_m ve V_{maks} değerlerinin belirlenmesi
 - d- İnhibisyon çeşidinin belirlenmesi
3. Floresans spektroskopisi yöntemi kullanılarak maddelerin IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesi

Çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pestisitler

Tarımda mücadele amacıyla kullanılan bütün kimyasallara pestisit denir. Pestisitler böcek, bitki, mantar ve kemirici hayvanlar gibi türlere karşı kullanılmaktadır [5]. Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, kontrol altına almak ya da zararlarını kontrol altına almak için kullanılan madde veya maddelerden oluşan karışımlardır. Pestisit kimyasal bir madde, virüs ya da bakteri gibi biyolojik bir ajan da olabilir. Pestisit kelimesi, Latince kökenli olup, hastalık öldürücü anlamına gelmektedir.

Pestisitlerin bilinçli kullanımları sonucunda tarımsal ürünlerin üretiminde yüksek başarı sağlanmaktadır. Fakat pestisitlerin bilinçsiz ve aşırı kullanımı sonucunda ürünlerde ve çevrede aşırı pestisit birikimleri oluşmaktadır [6]. Pestisitler, tarımsal faydalarının yanı sıra canlılar ve çevre için önemli bir kirletici olmuştur.

Pestisitlerin bilinçsiz ve aşırı kullanılması, besin zincirindeki üyelerde birikmesi sonucunda canlılarda birçok önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır [7]. Örneğin DDT, aldrin, heptaklor, dieldrin gibi pestisitlerin toprakta uzun süre bozulmadan kalabildiği ve besin zincirindeki bireylerde birikmelere yol açtığı için kullanımı yasaklanmıştır.

2.1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı, ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılabilir. Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma şekilleri ise kullanıldıkları zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmadır.

- İnsektisitler, böcekler,
- Herbisitler, zararlı otlara,
- Fungusitler, mantarlara
- Akarisitler, örümcek, bit, kene gibi parazitlere,
- Rodentisit, kemirgenlere,

- Nematisit, nematotlara karşı kullanılan pestisitlerdir [8,9].

2.1.2. Pestisitleri tarihsel süreci

İnsanların pestisit ile tanışması yıllar öncesine dayanmaktadır. Bazı tuzların ve küllerin herbisit olarak M.Ö 1200 yıllarında kullanıldığı, kükürdün insektisit ve fungusit olarak M.Ö. 1100 yıllarında kullanıldığı bilinmektedir. Bunların yanı sıra örneğin mineral yağ ve tütün ekstratlarının insektisit, tütün dumanlarının ise fungusit olarak kullanıldığı bilinmektedir [10].

Son yıllarda organik pestisitler yerini sentetik pestisitlere bırakmıştır. Kısa sürede etkili olan ve alternatifleri de bulunmayan bu sentetik pestisitlerden ilk organik fosforlu bileşik olan TEPP (tetra etil pirofosfat), Bernard Shreder tarafından 1938’de ilk sentetik organik klorlulardan DDT (dikloro difenil trikloroetan) 1874’de sentezlenmiş ve Paul Müller tarafından 1939 yılında insektisit özelliği keşfedilmiştir.

Son yıllarda sentetik kimyasal maddelerin yoğun bir şekilde bitki koruma alanında kullanılmasıyla birlikte bitki, hayvan, insan ve çevre sağlığı açısından bazı problemlerin arttığı görülmektedir.

2.1.3. Pestisitlerin kullanılması

Pestisitlerin tarım zararlılarına karşı yaygın olarak kullanılması ile insan, hayvan ve çevre sağlığı açısından birçok risk ortaya çıkmıştır. İnsan, hayvan ve çevre sağlığını korumak amacıyla her ülke de yasal düzenlemeler yapılmıştır. Ulusal düzenlemelerin yanı sıra uluslararası birçok kuruluş (EPPO, FAO, WHO; ECC, EPA) pestisitlerin güvenli kullanılması için azami gayret göstermektedir.

Dünya’ da tarım ürünlerinin arttırılma çabalarının yanı sıra çevre ve insan sağlığına zararı daha az olan ya da zararı olmayan pestisitlerin kullanılması kaçınılmaz olmuştur. Birçok ülke yasalarla koyduğu sınırlamalarla bazı pestisitlerin kullanımını kontrol altına almışlardır. Türkiye’ de de pestisit kullanımını sınırlayan yönetmelikler vardır. Ülkemizde pestisitlerin bitkilerdeki kullanımı Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının uyguladığı yönetmelikler Türk Gıda Kodeksi’ ne göre sınırlanır. Pestisit kısıtlamalarıyla ilgili

kanunlar ülkelerin fayda/risk analizindeki önceliklerin önemli bir etkisi vardır. Örneğin ileri tarım teknolojisi olan ülkelerde bir türe karşı zararlı olan pestisit yasaklı olabilirken daha düşük tarım teknolojisine sahip ülkelerde yasaklı pestisit grubunda olmayabilir. Birçok gelişmiş dünya ülkesinde çevre dostu pestisit üretimi için araştırma ve geliştirme çalışmalarına ağırlık verilmektedir. Çizelge 2.1.'de Türkiye' de bazı pestisitlerin gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en fazla pestisit kalıntı miktarları verilmektedir.

Çizelge 2.1. Türkiye' de bazı pestisitlerin, gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen maksimum pestisit kalıntı miktarları [11].

Aktif Madde	Ürün Adı	En fazla Kalıntı Limitleri (mg/kg)
Asetamiprid	Turunçgiller	1
	Antep fıstığı	0,01
	Elma	0,7
	Kiraz/Vişne	0,5
	Domates	0,15
	Biber	0,3
Amitrol	Turunçgiller	0,01
	Elma	0,01
	Sofralık ve Şaraplık üzüm	0,01
	Asma yaprağı	0,01
1-3 dikloropropen	Turunçgiller	0,1
	Sert çekirdekli meyveler	0,1
	Meyveli sebzeler	0,1
Acetoklor	Ayçiçeği tohumu	0,01
	Mısır	0,01
Aklonifen	Havuç	0,1
	Mercimek	0,05
	Nohut	0,05
Bensulfuron – metil	Pirinç (Çeltik)	0,01
Bifenazet	Sofralık ve Şaraplık üzüm	0,01
	Çilek	2
	Domates	0,5
	Biber	2
	Patlıcan	0,5
Kloridazon	Soğan	0,05

Çizelge 2.1. (Devamı) Türkiye’ de bazı pestisitlerin, gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen maksimum pestisit kalıntı miktarları [11].

Dicamba	Arpa	0,05
	Mısır	0,05
Deltametrin	Fındık	0,05
	Elma	0,2
	Armut	0,1
	Nohut	1
	Soya fasülyesi	0,05
Etridiazole	Domates	0,05
Etoksisulfuron	Pirinç	0,05
Fentin asetat	Şeker pancarı	0,1
Florosulam	Tahılla	0,01
Halosulfuron metil	Mısır	0,1
Glifosat	Greyfurt	0,1
	Portakal	0,5
	Limon	0,1
	Sofralık zeytin	1
İmazalil	Asma yaprağı	0,02
Kükürt	Çay	5
	Şeker pancarı	50
	Şeker kamışı	0,5
Metazaklor	Kolza tohumu	0,05
Nicosulfuron	Mısır	0,02
Ofurace	Patates	0,1
	Domates	0,2
Penoxsulam	Pirinç	0,01
Tritosulfuron	Mısır	0,01
	Buğday	0,01
Valifenalat	Patates	0,01

Pestisitler, tarımsal mücadele de yoğun olarak kullanılmaktadır. Pestisitlerin tarımsal mücadeledeki öneminin yanı sıra ekonomik anlamda da ülkeler için önem arz etmektedir. Tarımla uğraşan birçok ülke pestisitlerin geliştirilmesi ve etkin kullanılabilmesi için yoğun

olarak araştırma geliştirme çalışmalarını sürdürmektedir. Türkiye’de ve Dünya’da kullanılan pestisit miktarı Çizelge 2.2. ve Çizelge 2.3.’te verilmektedir.

Çizelge 2.2. Türkiye’ de pestisit kullanım miktarları (kg veya L) [12].

Yıllar	İnsektisit	Fungusit	Herbisit	Akarisit	Rodentisit	Diğer	Toplam
2004	-	-	-	-	-	-	41.223.053
2005	-	-	-	-	-	-	43.362.627
2006	7.628.215	19.899.724	6.955.895	901.999	2.877	9.987.399	43.375.799
2007	21.045.632	16.706.631	6.668.653	966.488	50.925	3.277.315	48.715.644
2008	9.250.719	17.862.861	6.176.508	737.123	351.095	5.613.346	39.991.651
2009	9.913.897	17.395.950	5.960.852	1.532.728	76.610	2.302.300	31.383.337
2010	7.175.813	17.545.584	7.451.591	1.039.739	147.404	5.343.714	38.703.862
2011	6.119.933	18.123.614	7.406.602	1.061.609	421.426	6.977.975	40.110.958

Türkiye’de birim alana düşen pestisit miktarı birçok dünya ülkesine göre oldukça az miktardadır. Fakat pestisitlerin bilinçsizce kullanılması nedeniyle her yıl tonlarca ürün pestisit kalıntı sorunlarıyla karşı karşıya kalmaktadır. Türkiye’ deki pestisit kullanımının bölgelere göre dağılımı incelenilecek olursa modern tarımın ve seracılığın gelişmiş olduğu Ege ve Akdeniz bölgelerinde yoğun pestisit kullanımı vardır. Dünya’ da herbisitler tarım ilaçları arasında % 47’lik bir oranla ilk sırayı almaktadır. Herbisitleri % 29 ile insektisitler, % 19 ile fungusitler izlemektedir. Diğer pestisit grupları toplam % 5’ lik bir orandadır. Türkiye’ de pestisit kullanımı incelendiğinde ise % 47 ile insektisitler ilk sırayı alırken, insektisitleri % 24 ile herbisitler ve % 16 ile fungusitler izlemektedir [13].

Dünya’ da pestisit tüketimi yaklaşık 3 milyon ton olup, parasal değeri ise 30 milyar € civarındadır. Türkiye’ de yıllık tarım ilacı tüketimi 33000 ton olup bu miktardaki tarım ilacının piyasadaki payı yaklaşık 230-250 milyon dolardır. Çizelge 2.3. incelendiğinde Avrupa Birliğine üye ülkeler arasında Hollanda, Yunanistan ve İtalya en yoğun pestisit tüketen ülkeler iken, Finlandiya, Belçika ve Danimarka en az pestisit tüketen ülkelerdir.

Çizelge 2.3. Bazı AB ülkelerinde ortalama pestisit tüketimi (kg/ha) [13].

Ülkeler	Pestisit Tüketimi (kg/ha)
Hollanda	13.8
Yunanistan	13.5
İtalya	9.3
İrlanda	8
İngiltere	6,4
Portekiz	6
Fransa	5.6
İsveç	4.4
Lüksemburg	4.4
Avusturya	4
Almanya	2.6
İspanya	2.3
Danimarka	1.7
Belçika	1.2
Finlandiya	1.2
Türkiye	0,7

Türkiye’ de pestisit kullanımı yıllara göre 400–700 g arasında değişmektedir [14]. 1990’larda hektar başına 400–700 g olan pestisit tüketimi 2006 yılında 705 g’a ulaşmıştır [15]. Ülkemizde pestisit tüketimi AB ülkeleri ile kıyaslandığında ülkemizde kullanılan pestisit miktarı AB ülkelerine oranla oldukça az miktardadır. Fakat yurt dışına

ithal edilen ürünlerdeki uygun olmayan parti sayısına bakıldığında ülkemiz 125 ülke arasında 2. sıradır.

2.1.4. Bitkisel ürünlerde pestisit kalıntıları

Son yıllarda sivil savunma topluluklarının ve tüketicilerin baskılarıyla çevreye zarar vermeyen çevre dostu pestisitlerin kullanımı artmış bulunmaktadır. AB 2002 yılından bu yana Hızlı Alarm Sistemi ile (Rapid Alert System for Food and Feed) AB' ye giren kalıntı limitlerine uygun olmayan ürünleri internet sitelerinde yayınlamaktadır. ABD Tarım Bakanlığı ve Gıda İlaç Dairesi tarafından yaş gıda ürünlerinde gıda güvenliği sağlanması amacıyla iyi tarım uygulamaları başlatılmıştır [16].

Türkiye'nin AB'ye girme girişimlerinin yoğunluk kazandığı ve birçok gelişmiş ülkeye ciddi ölçülerde tarım ürünü dış satışının sürdüğü günümüzde, sağlığı çevreyi ve dış ticareti koruyabilmek amacıyla, tarım ilacı kullanımı gelişmiş ülkeler standartlarında, çok bilinçli ve kontrollü yapılmalıdır [17,18]. Diğer taraftan AB uyum çalışmaları çerçevesinde izleme programlarının oluşturulması ve kalıntı analizlerinin rutin olarak yapılması gerekmektedir [19-21].

2.2. Bitkilerde Oksidatif Stres

Bitkilerde oksidatif stres, UV ışınları, kuraklık, hava kirleticilerine maruz kalma, yüksek sıcaklık ve herbisit gibi etkenlerle meydana gelmektedir. Oksidatif stres bitkilerde hasarlara ve yıkımlara neden olduğu için her yıl üretimlerde büyük kayıplara neden olmaktadır. Süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri bitkilerin bazı yaşamsal mekanizmalarını etkileyerek bitkiye zarar vermektedir [22-24].

Oksidatif stres serbest radikallerin üretimi ve antioksidan metabolitleri arasındaki denge eksikliği olarak adlandırılır [25]. Hücresel metabolizma tarafından üretilen serbest radikaller lipitlere, proteinlere zarar verebildiği için hücre zarı bozunmaları ve DNA hasarı gibi etkileri vardır [26-28]. Bu hasar mekanizması karbon merkezli şeker radikallerinin OH^- veya H^+ bağlanmış heterosiklik baz radikallerinin oluşumuna yol açan, serbest radikallerin ayrışma ve birleşme tepkimelerinden ibarettir. Bu radikallerin tepkimeye girmesi ise çok sayıda hasarlı ürünlerin oluşmasına yol açar [29]. Ayrıca bazı reaktif

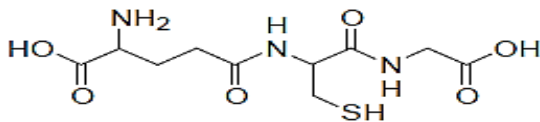
oksidatif türler hücrenin redoks sistemine etki ederler. Böyle oksidatif stres hücre redoks sisteminin bozulmasına neden olur.

Oksidatif stres DNA bozulmasının yanı sıra Parkinson, Alzheimer ve kanser hastalıklarına da neden olmaktadır [30,31]. Oksidatif strese neden olan serbest radikallerin en önemli tepkimeleri moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir [32]. Demir, bakır, mangan gibi metaller de dış yörüngelerinde tek elektron taşımalarına rağmen radikal özelliklere sahip değildirler [32]. Ayrıca tiyol grupları da enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak amacıyla görev yapan bir antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptit olan glutatyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen ve ya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev almaktadır. Glutatyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır [33].

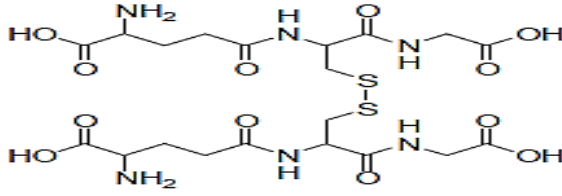
2.3. İndirgenmiş ve Yükseltgenmiş Glutatyon

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan glutatyon hemen hemen bütün memeli, prokaryot ve ökaryot hücrelerinde milimolar düzeyinde bulunan, başlıca protein yapısında olmayan bir tiyol bileşiğidir. Bir tripeptit olan glutatyon, temel biyolojik indirgenme reaktifi olarak görev alır. Bu tripeptitin önemli görevleri; hücre içi redoks dengesini sağlamak ve hücreleri reaktif oksijen türevlerinden korumaktır. Ayrıca DNA sentezi ve amino asit taşınması gibi fizyolojik süreçlerde de görev almaktadır [34].

Glutatyonu ilk olarak 1888 yılında maya hücresinde bularak “filothian” adını veren Roy Paihade isimli bilim adamı keşfetmiştir. 1921’de Hopkins tarafından saflaştırılarak, kristallendirilerek bugünkü ismi verilmiştir. İlk önceleri glutamid-sisteinden ibaret bir dipeptit olduğu zannedilmiştir. Fakat 1929’dan sonra tripeptit olduğu anlaşılmıştır [35,36].



Şekil 2.1. İndirgenmiş glutatyon yapısı, GSH, (L-γ-glutamil-L-sisteinil-glisin).



Şekil 2.2. Yükseltgenmiş glutatyonun yapısı, GSSG, 2(L-γ-glutamil-L-sisteinil- glisin).

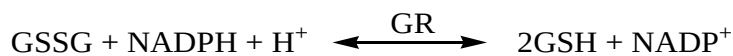
Glutatyon yapısında bulunan –SH grupları sayesinde hücreyi oksitleyici ajanların yıkıcı etkilerine karşı korumaktadır. Glutatyonun düşük derişimlerin de ise bazı metabolik sorunlarla karşılaşlabilmektedir. Glutatyonun bilinen bazı görevleri şunlardır.

- Serbest radikallerin ve reaktif oksijen ürünlerinin inaktivasyonunu sağlar.
- Bazı proteinleri ve çeşitli enzim proteinlerinin tiyol gruplarının korunmasını sağlar.
- DNA ve protein sentezini yapar.
- Aminoasit taşınımını gerçekleştirmede görev alır.
- Proteinlerin konformasyonlarının değişmesine neden olur.
- Proteinlerdeki sulfidril gruplarının indirgenmiş halde tutulmasında.
- Bazı enzimatik reaksiyonlar da koenzim olarak rol oynar
- Antioksidan savunma sisteminde
- Ksenobiyotiklerin etkisini gidermede görev almaktadır [37,38].

Enzimatik savunma sistemlerinde birçok enzim kullanılmaktadır. Bu sistemlere örnek vermek gerekirse dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimler söylenebilmektedir.

2.4. Glutatyon Redüktaz

Glutatyon redüktaz (GR) (E.C.1.8.1.7) ilk defa 1951’de tanımlanmıştır. Bu enzim hücrede okside glutatyonu redükte glutatyonla dönüştürmeden sorumlu olan ve tüm dokularda tespit edilen flavoprotein yapısında bir enzimdir [39]. Bu enzim düşük veya yüksek molekül kütleli disülfür substratları ile indirgenmiş piridin nükleotidleri arasında elektron transferini katalizler.



İndirgenmiş glutatyon serbest bir disülfidril grubu içeren bir tripeptittir. İndirgenmiş durumda hemoglobin ve eritrosit hücre proteinlerinin sistein atıklarını muhafaza eden bir sülfidril tamponu olarak hizmet eder. Glutatyon redüktaz, hücre içerisinde indirgenmiş glutatyonun(GSH) oksitlenmiş glutatyon oranını GSH/GSSG korumaktadır. Bu oran eritrosit hücrelerinde 500/1'dir [40-42].

Glutatyon kemoterapi tedavilerinde redüktaz glutatyon mekanizmasının dengesinde, bazı genetik hastalıkların teşhisinde, beslenmede ve riboflavin yetersizliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır [43,44].

Bitkilerde glutatyon redüktaz (GR) inhibisyonu

Glutatyon redüktaz aerobik organizmalarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu antioksidan savunma sistemlerinde kullanılmaktadır. Oksidatif stres koşulları altında enzimatik savunma mekanizmalarından olan glutatyon redüktaz ve askorbat peroksidaz enzimleri genellikle hidrojen peroksiti suya indirgeyerek kloroplast ve mitokondriden temizlenmesinde etkilidir. Askorbat peroksidaz, askorbat-glutatyon döngüsünde hidrojen peroksidi suya indirgemede görevlidir. Bu sırada askorbat monodehidroaskorbat (MDHA) okside olur. MDHA monodehidroaskorbat redüktaz tarafından askorbata dönüşür. Bununla beraber MDHA'nın iki molekülü enzimatik olmayan yol ile MDHA'ya ve dehidroaskorbata (DHA) oransız olarak dönüşür. DHA, dehidroaskorbat redüktaz ile askorbata indirgenir. Bu reaksiyondan sonra ise glutatyon (GSH), DHAR'ın etkisiyle yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) dönüşür ve GSSG, GR tarafından GSH'a geri indirgenir.

2.5. Enzim Kinetiği ve Michaelis-Menten Esitliği

İnsanlar çok eski zamanlardan beri enzimatik maddelerden yararlanmışlardır. Örneğin; şarap yapımında, ekmek, yoğurt kırmızı ve boza yapımlarında enzimleri kullanmışlardır.

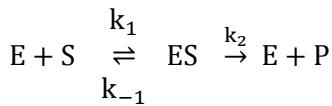
Enzim terimi ilk kez W. Kühne tarafından kullanılmıştır. İlk kez 1883'lerde Payen ve Persoz nişastayı sindiren enzim olan diyastazı buldular. 1836'da ise Schwan mide suyundan pepsini elde etti. 1926 yılında ilk kristal enzim olan ureaz Summer tarafından izole edildi [45].

Enzim, sözcük anlamı canlı ile bitkisel ve hayvansal hücrelerde biyolojik olayların kimyasal katalizörleri olan organik yapılu maddelere enzim denir. Bir başka deyişle, hücre içerisinde maddelerin değişimi, bozunmaları, parçalanmaları biyolojik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Enzimler biyolojik reaksiyonları hızlandırıcı etki gösterirler [46-48].

Enzimler tarafından katalizlenen kimyasal reaksiyonların hızını inceleyen çalışma alanına enzim kinetiği adı verilmektedir [49]. Enzimlerin kinetik özelliklerini açıklamak için 1913 yılında Leonor Michaelis ve Maud Menten basit bir model ileri sürmüşlerdir. Michaelis–Menten eşitliğinin amacı biyokimyasal reaksiyonlar için kantitatif bir hesaplama geliştirmektir. Canlı hücrelerin biyokimyasal reaksiyonlarını genelde enzimler katalizler. Bu enzimler substratın spesifik bölgelerine bağlanır. Bu enzimatik reaksiyonlara birkaç örnek vermek gerekirse [50].

- Glikozun, heksokinaz enzimi varlığında glikoz-6-fosfat ürününe dönüşmesi
- Transkripsiyon
- Proteinlerin fosforilasyonu sayılabilir [51].

Birçok enzimin kinetik özellikleri en basit bir biçimde;



Yukarıda ifade edilen Michaelis-Menten eşitliğine göre substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan oldukça fazladır. Formülde, E enzimi, S substrat, P ürünü, ES enzim substrat madde, k_1 , k_{-1} ve k_2 hız sabitlerini göstermektedir. Bu formülden yararlanılarak, ES maddesi k_1 katsayısı ile enzim ve substrata parçalanırken, k_2 katsayısı ile ürün oluşur. Enzim, k_1 orantılı hızıyla substrata bağlanarak ES maddesini oluşturur.

$$[ES] \text{ oluşum hızı} = [ES] = k_1.[E].[S] \quad (2.1)$$

$$[ES] \text{ parçalanma hızı} = k_{-1}.[ES] + k_2.[ES] \quad (2.2)$$

eşitlikleri elde edilir.

[ES] oluşum hızı ile [ES] parçalanma hızı birbirine eşitlenerek;

$$k_1.[E].[S] = (k_{-1} + k_2).[E].[S] \quad (2.3)$$

$$[ES] = \frac{k_1.[E].[S]}{(k_{-1} + k_2)} \quad (2.4)$$

Eşitlikleri elde edilir. Ortamdaki en yüksek enzim derişimi bilinerek maksimum hıza ulaşılabilir [52].

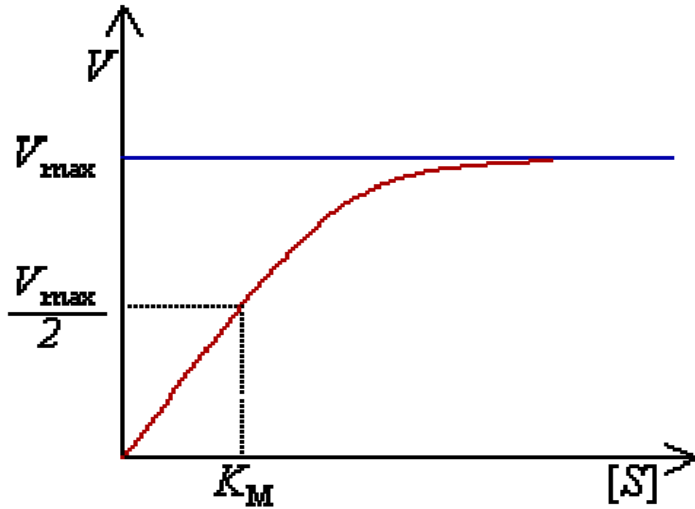
$$[E].[S]/[ES] = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (2.5)$$

$$K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1 \quad (2.6)$$

K_m ; tepkimenin maksimum hızının yarısındaki substrat derişimine karşılık gelir, enzim-substrat etkileşimini karakterize eden önemli bir birimdir, enzim ve substrat derişiminden bağımsızdır. Buradan;

$$V_0 = V_{maks} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (2.7)$$

Michaelis-Menten eşitliği elde edilir [53] (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Michaelis-Menten Grafiği

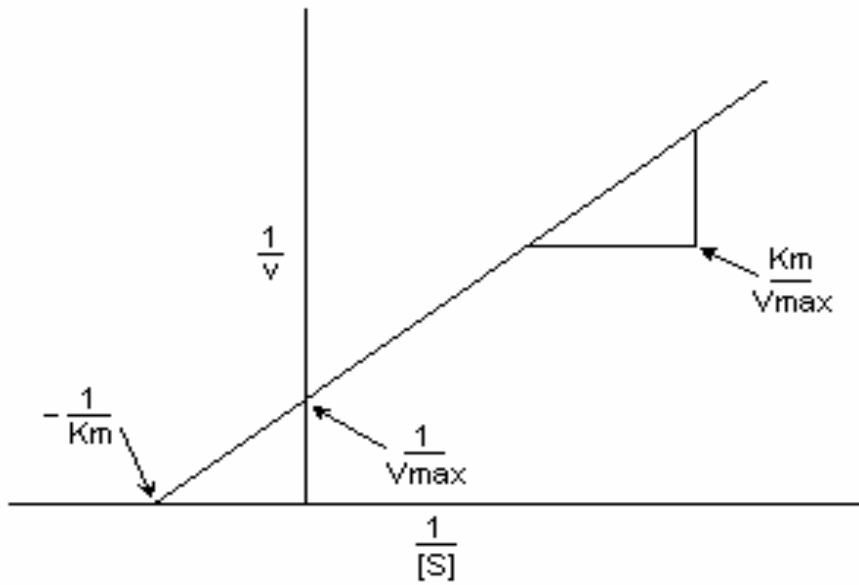
Sabit substrat derişimine ulaşıldığı andaki enzim hızı (V_{maks}), maksimum hız olarak tanımlanır. K_m değeri ise; enzimin maksimum hızının yarısına ulaşılması için gerekli substrat derişimi olarak tanımlanır [54,55]. Her enzime özgü karakteristik bir Michaelis-Menten sabiti (K_m) vardır. Ayrıca K_m değeri, enzimin substrata karşı ilgisinin bir ölçüsüdür.

V_0 ve K_m ' yi hesaplamak için farklı substrat konsantrasyonlarında tepkime hızları hesaplanır ve Michaelis-Menten denkleminin ters çevrilmesiyle elde edilen Lineweaver-Burk denklemi kullanılır [53,57] (Şekil 2.4.).

$$V_0 = V_{maks} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Michaelis-Menten eşitliği}) \quad (2.8)$$



$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_m}{V_{maks}} \frac{1}{[S]} \quad (\text{Lineweaver-Burk eşitliği}) \quad (2.9)$$



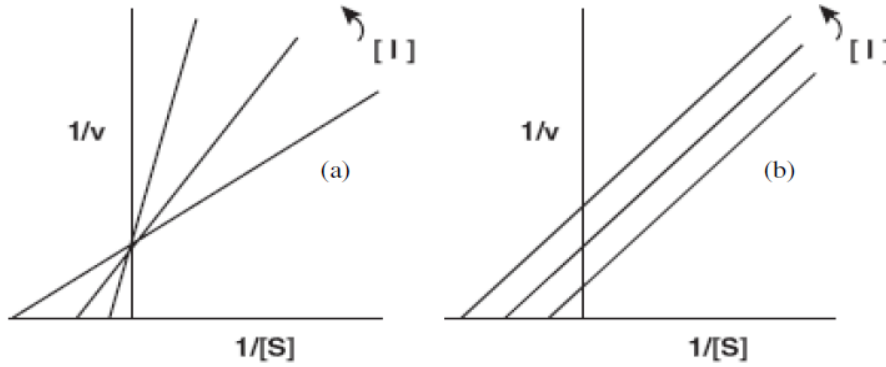
Şekil 2.4. Lineweaver-Burk Grafiğı [53,58]

2.6. Enzim İnhibisyonu

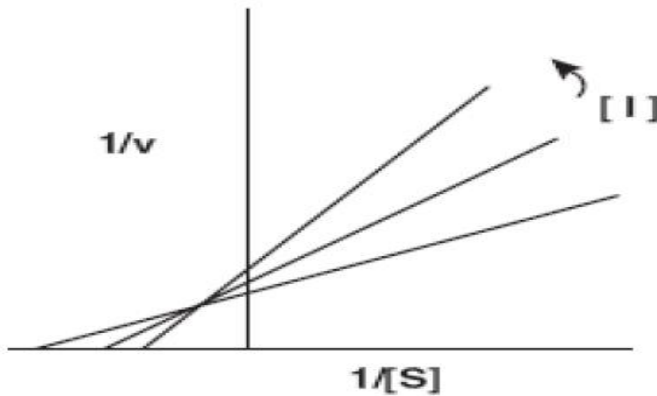
2.6.1. Enzim inhibisyon çeşitleri

Enzim-substrat maddesinin oluşmasını değişik şekillerde etkileyen enzim faaliyetlerinin azalmasına yol açan bileşiklere enzim inhibitörleri, bu olaya ise enzim inhibisyonu denir. Enzim inhibisyonu, tersinir veya tersinmez olarak iki grupta incelenir.

Enzim inhibitörleri düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşiklerdir. Tersinir inhibisyonda enzim ile inhibitör arasında bir denge söz konusudur. Tersinir inhibitörler kovalent etkileşimlerle enzimlere bağlanır. İnhibitör ile aktif bölge arasındaki birden çok zayıf bağ birleşip güçlü ve spesifik bir bağlanma meydana getirir. Tersinir inhibisyon çeşitleri kompetitif (yarışmalı), nonkompetitif (sınırlı yarışmalı) ve unkompetitif (yarışmasız) inhibisyon olmak üzere üç gruba ayrılır. Enzim inhibisyon türlerine özgü grafikler Şekil 2.5. ve Şekil 2.6.'da görüldüğü gibidir [54,59].



Şekil 2.5. (a) Yarışmalı ve (b) Yarışmasız inhibisyon çeşitleri [54].



Şekil 2.6. Sınırlı yarışmalı inhibisyon çeşidi [54].

Yarışmalı inhibisyonda, substrat ve inhibitör enzime aynı anda bağlanamaz. Substrat ve inhibitör enzimin aktif bölgesi için yarışır. Substrat konsantrasyonu yeterince artırılarak bu tip inhibisyonun üstesinden gelinir ve V_{maks} hızına ulaşılır. Sınırlı yarışmalı inhibisyonda, substratla yapısal benzerliği olmayan inhibitörler, substratla enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmazlar. Yüksek substrat derişiminde de enzimin inhibisyonu engellenemez. Sınırlı yarışmalı inhibitör, serbest enzime ya da ES maddesine bağlanarak reaksiyon hızını azaltır.

Yarışmasız inhibisyonda ise, inhibitör, enzim ve substratla aynı anda bağlanabilir substrat derişimi artırılarak inhibitörün enzime bağlanmasını azaltmak mümkün değildir, bu yüzden V_{maks} değişir ancak K_m sabit kalır [60, 61].

Çizelge 2.4. İnhibisyon çeşitleri.

İnhibisyon	Şematik Gösterimi	K_m, V_{maks}
Kompetitif (Yarışmalı) İnhibisyon	$ \begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel \quad \pm I \\ EI \end{array} $	V_{maks} değişmez K_m artar
Nonkompetitif (Sınırlı yarışmalı) İnhibisyon	$ \begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel \quad \pm I \quad \parallel \quad \pm I \\ EI \quad \quad \quad ESI \end{array} $	V_{maks} azalır K_m değişmez
Unkompetitif (Yarışmasız) inhibisyon	$ \begin{array}{c} E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P \\ \parallel \quad \pm I \\ ESI \end{array} $	V_{maks} azalır K_m azalır

Tersinmez inhibitörler genellikle bir enzimi kovalent olarak değişime uğratar ve dolayısıyla inhibisyon geri döndürülemez [62].

2.6.2. IC₅₀ ve K_i değerleri

Biyolojik bir etkinliğin inhibisyonu için gerekli olan inhibitör derişimine maksimum inhibitör konsantrasyonun yarısı (IC₅₀) denir. IC₅₀ değerleri farmakolojide yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyolojik işlemler sırasında, IC₅₀ derişimleri kantitatif ölçümlerle belirlenebilmektedir. Bir inhibitörün IC₅₀ etkisi, doz-doza yanıt eğrisi çizilerek ve geri dönüşen agonistler (hücre reseptörlerine bağlanarak hücrede bir tepki oluşturan bileşikler) üzerine farklı derişimlerdeki antagonistlerin (hücre reseptörlerine bağlanarak hücrede bir tepki oluşturulmasını engelleyen bileşikler) etkisi incelenerek belirlenir. IC₅₀ değerleri, agonistlerin inhibe edilen yarı maksimum biyolojik tepkisi için gerekli olan konsantrasyonların belirlenmesi ile hesaplanır.

IC₅₀ değerleri ölçüm alınan dış koşullara oldukça bağlıdır. Genel olarak inhibitör konsantrasyonu yüksek olduğunda agonist aktivitesi azalır. Agonist konsantrasyonu arttıkça IC₅₀ değeri de artar.

IC₅₀ değeri, Cheng-Prusoff denklemine göre yarışmalı agonist ve antagonistler ile ilişkili olmasına rağmen affinite için direk bir gösterge değildir. Bu denkleme göre;

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (2.10)$$

Bu eşitlikte K_i inhibitör affinitesi, IC₅₀ inhibitörün fonksiyonel gücü, S substrat konsantrasyonu, K_m enzim aktivitesinin IC₅₀ değerindeki substrat konsantrasyonudur. Diğer bir K_i değeri denklemi;

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[A]}{EC_{50}}} \quad (2.11)$$

Bu eşitlikte [A] agonistin sabit bir konsantrasyonu, EC₅₀ reseptörün yarısıyla etkileşen maksimum agonist konsantrasyonudur.

Bir bileşik için IC_{50} değeri deneysel koşullara bağlı olarak değişebilirken K_i değeri sabit bir değerdir ve deneysel koşullardan etkilenmez. Bir inhibitörün IC_{50} ve K_i değerleri ne kadar düşükse o inhibitörün inhibe edebilme özelliği o kadar iyidir.

2.7. Elektrokimyasal Yöntemler

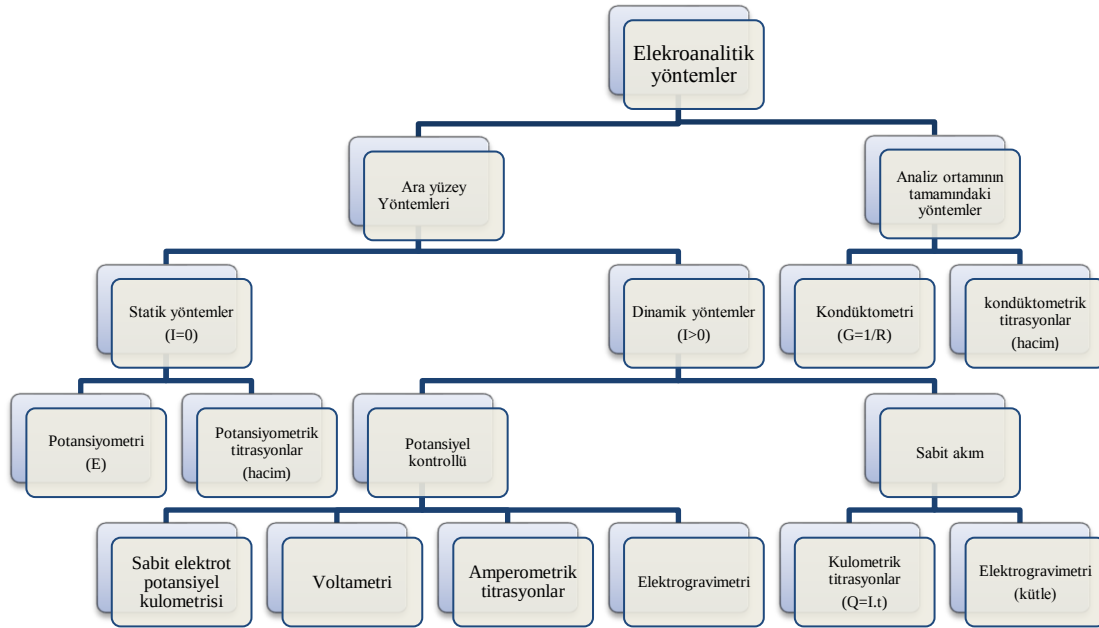
Elektrokimya, kimya biliminin bir dalı olup elektronik bir iletken ile iyonik bir iletken ara yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonları inceler. Genel anlamda elektrokimya elektrik enerjisi üreten veya harcayan redoks (indirgenme–yükseltgenme) tepkimelerini inceler. Eğer harici bir voltaj uygulanarak bir kimyasal reaksiyon meydana getiriliyor, pil de olduğu gibi, bir kimyasal reaksiyon voltaja neden oluyorsa bu bir elektrokimyasal reaksiyondur. Elektrokimya pratikte büyük öneme sahip bir konudur. Piller, akümülatörler kimyasal enerjiyi elektrik enerjisine dönüştüren düzeneklerdir ve günlük hayatımızda çok çeşitli amaçlar için elektrik enerjisi kaynağı olarak kullanılmaktadırlar.

Çeşitli elektrokimyasal işlemlerin analitik amaçlı kullanılması elektroanalitik yöntemleri oluşturur. Elektroanalitik yöntemler ile elektrot ara yüzeylerde meydana gelen yük aktarımının sitokiyometrisi ve hızı, kütle aktarım hızı, adsorbsiyon ve kemisorpsiyon derecesi, kimyasal tepkimelerin hızı ve denge sabitleri ile ilgili bilgilere ulaşılabilir.

Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılmasında izlenen farklı yollar vardır. En yaygın olarak kullanılan yöntem Şekil 2.7’de gösterilmiştir. Bu gösterimde elektroanalitik teknikler, ”ara yüzeyde gerçekleşen teknikler” ve “tüm analiz ortamında gerçekleşen teknikler” olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleri ve bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası arasındaki ara yüzeyde gerçekleşen olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemlerinde ise çözeltinin tamamında oluşan olaylara dayanmaktadır [63,64].

Elektroanalitik yöntemlerin diğer analitik yöntemlere göre bazı avantajları vardır. Birincisi, elektrokimyasal ölçümler elektro aktif bir türün, yükseltgenme veya indirgenme basamağına özgüdür. Hemen hemen bütün elektrokimyasal tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur. Elektrokimyasal yöntemlerin ikinci bir üstünlüğü ise kullanılan cihazların nispeten ucuz olmasıdır. Elektro analitik tekniklerle çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler. Duyarlılığı oldukça fazla olan bu yöntemlerde oldukça geniş bir

çalışma aralığı vardır (10^{-3} M – 10^{-8} M). Ayrıca bu analizlerin çoğu mikrolitre, hatta nanolitre seviyesindeki numune miktarıyla gerçekleştirilebilir. Gözlenebilme sınırları pikomol seviyesinde olabilir. Şekil 2.7’de gösterilen elektroanalitik yöntemlerin çoğu çeşitli kromatografik işlemlerde detektör olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. Elektroanalitik teknikler için bir sınıflandırma örneği. Ölçülen nicelikler parantez içinde verilmiştir. (I: Akım, E: Potansiyel, R: Direnç, G: İletkenlik, Q: Yük miktarı, t: zaman, Hacim: Standart çözelti hacmi, Ağırlık: Elektrokimyasal olarak biriktirilen türün ağırlığı)

2.8. Voltametri

Voltametri, bir indikatör elektrot ya da çalışma elektrotunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektro analitik yöntemlere verilen isimdir. Voltametri potansiyometrik ölçümlerden farklı olarak tam konsantrasyon polarizasyon şartlarında bir elektrokimyasal hücrede oluşan akımın ölçülmesine dayanır. (Potansiyometrik ölçümler, akımın sıfıra yaklaştığı ve polarizasyonun olmadığı şartlarda yapılır.) Ayrıca elektrogravimetri ve kulometriden farklı olarak konsantrasyon polarizasyonun etkilerini en aza indirmek için alınan önlemler daha farklıdır. Ayrıca bu iki yöneme göre voltametriye analit minimum miktarda harcanır.

Voltametrizde çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorbsiyon işlemlerinin araştırılması ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması, moleküler oksijen tayini, farmasötik açıdan önemli türlerin tayini gibi birçok uygulamada kullanılır. Voltametrizde yüzey alanı birkaç mm'den daha küçük çalışma elektrotları kullanılır. Hatta yüzey alanı birkaç mm'den birkaç cm'ye kadar ultra mikro elektrotlar kullanılmaktadır [63].

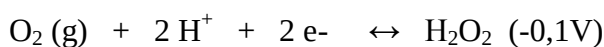
Uygulanan potansiyele karşı ölçülen akımın grafiğe geçirilmesi ile elde edilen akım-potansiyel eğrisine voltamogram denir.

Voltametrik metotlarda üçlü elektrot sistemi kullanılır. Bunlar:

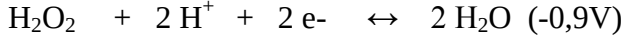
- I. Çalışma elektrodu olarak; camsı karbon elektrot, damlayan cıva elektrot, altın elektrot, platin elektrot gibi kolay polarize olan elektrotlar kullanılır.
- II. Referans elektrot olarak; Ag/AgCl elektrot, standart hidrojen elektrot ve doymuş kalomel elektrot gibi belirli bir yarı hücre potansiyeline sahip olan elektrotlar kullanılır.
- III. Karşıt elektrot olarak; platin elektrot ve altın elektrot gibi kolay polarize olan ve geniş yüzey alanına sahip elektrotlar kullanılır.

Üçlü elektrot sisteminde; potansiyel çalışma elektrotu ile referans elektrot arasına uygulanır, akım ise çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında ölçülür. Böylece çalışma ile referans elektrot arasından hemen hemen hiç akım geçmez. Çünkü referans elektrotun potansiyeli çok küçük akımlarda sabit olup akım arttığında potansiyeli sabit kalmaz. Başka bir ifadeyle referans elektrot polarize olmaz. Üçlü elektrot sisteminin kullanılması ile aynı sistemde hem gerilim uygulanabilir hem de oluşan akım ölçülebilir. Bu sayede akım geçişi esnasında ikili elektrot sisteminde karşılaştırılması muhtemel potansiyel kaymasının önüne geçilmiş olur.

Voltametrik çalışmalarda çözünmüş oksijen molekülünün ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bunun için hücreden inert bir gaz olarak azot veya argon gazı geçirilir. Çünkü çözünmüş oksijen molekülü elektro aktiftir ve elektrotta kolaylıkla indirgenerek girişime sebep olur. Bu olay iki adımlı bir indirgenmedir. Bunlardan birincisi, oksijenin hidrojen peroksite indirgenmesiyle gerçekleşir:



İkinci indirgenme ise hidrojen peroksitin suya indirgenmesidir:



Oksijenin hidrojen peroksit'e indirgenmesi $-0,1 \text{ V}$ ta ve peroksitin suya indirgenmesi $-0,9 \text{ V}$ ta (DKE' ye karşı) gerçekleşir. Eğer çözünmüş oksijen sulu çözeltiden uzaklaştırılmaz ise oluşan indirgenme dalgaları analiz edilecek olan maddenin vereceği pikleri örter. Ayrıca hem O_2 hem de bunun birinci indirgenme ürünü olan H_2O_2 incelenen madde veya bunun elektroliz ürünü ile tepkimeye girebilir.

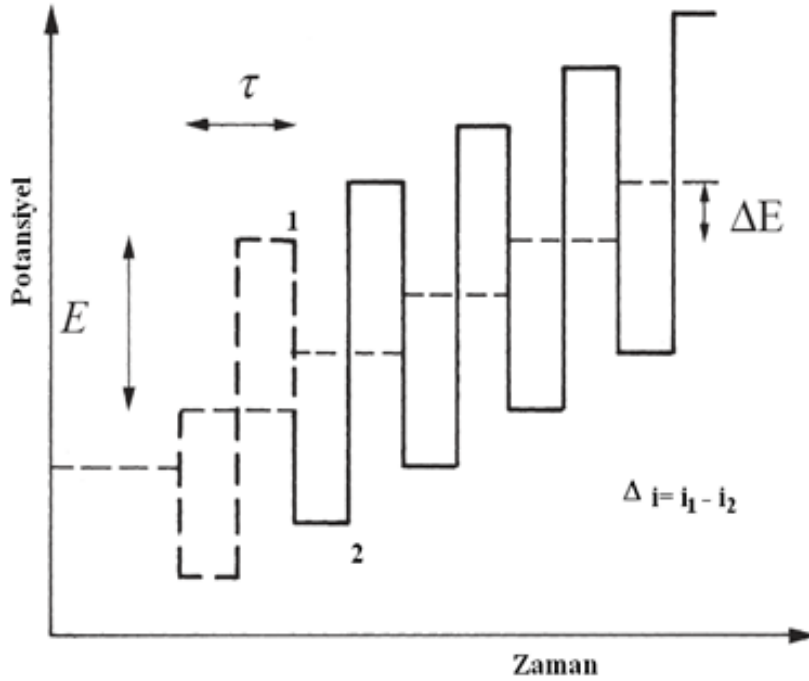
Voltametrde çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel negatif yönde arttırılırsa elektrottaki indirgenme tepkimesi hızlanır. Genelde çalışma elektrodu katot olarak kullanılır ve indirgenme ile katodik akım (i_k) oluşur. Eğer çalışma elektrotunun potansiyeli, pozitif yönde arttırılırsa, bu kez elektrot anot olarak davranır ve anodik akım (i_a) oluşur. Çalışma elektrotunun hangi potansiyel değerlerinde katot, hangi potansiyel değerlerinde anot olarak davranacağı, elektro aktif maddenin, ortamın ve elektrotun türüne göre belirlenir.

Voltametri çalışmalarında ortamın iletkenliği ve elektroaktif maddenin elektrot yüzeyine sadece difüzyonla aktarımını sağlamak için destek elektrolit kullanılır. Destek elektrolit bu göreve ek olarak bazı uygulamalarda ortamın pH' sını ayarlayan bir tampon ya da ortamda bazı iyonları kompleksleştiren bir ligand görevi de görebilir. Voltametrde destek elektrolit, analit çözeltisine fazla miktarda ilave edilen bir tuzdur. En yaygın tuzlar, analit tayininde kullanılan potansiyelde elektrotla reaksiyona girmeyen alkali metal tuzlarıdır.

Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi diferansiyel pulsdan daha sık tercih edilen bir elektroanalitik yöntemdir. Kısaca SWV olarak gösterilir ve çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, büyük genlikli bir diferansiyel teknik olmasını sağlayan simetrik kare dalgalar şeklindedir. Her iki kare döngüsü boyunca, akım iki kez ölçülür. Birincisi, ileri yöndeki pulsun sonunda (t_1) ikincisi ise geri yöndeki pulsun sonundadır (t_2). Bu iki akım arasındaki fark, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirildiğinde kare dalga voltamogramı elde edilir (Şekil 2.8.).

Kare dalga voltametrisi son derece hızlı ve duyarlı olması nedeniyle üstünlüğü olan bir voltametri tekniğidir. Etkin tarama hızı, kare dalganın frekansı (f) ve basamak yüksekliği (ΔE) değiştirilerek belirlenir. Böylece birkaç kare dalga voltametrisinin analiz süresini oldukça kısalttığının bir göstergesidir [65]. Voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az bir sürede elde edilir.



Şekil 2.8. Kare dalga voltametrisinde potansiyelin uygulanması.

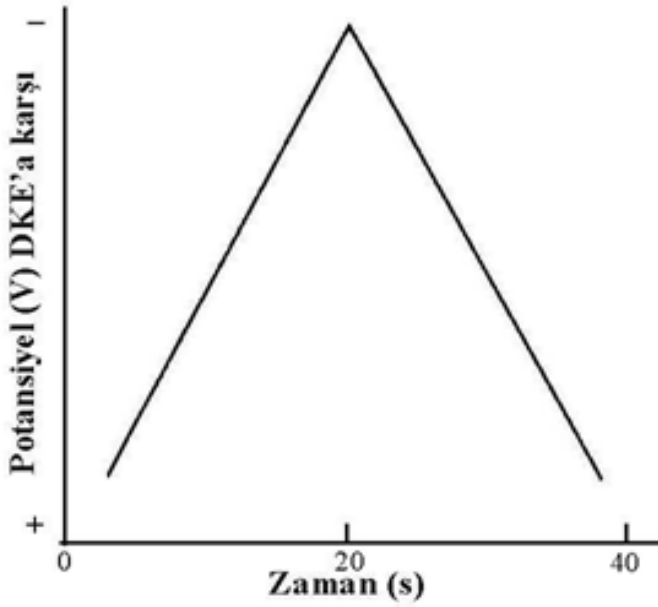
Kare dalga voltametrisinin ikinci büyük üstünlüğü de, kare dalga yoluyla toplam akıma kapasitif katkılarının en aza indirilmiş olmasıdır. Böylece tarama hızı çarpıcı bir şekilde artırılabilir, 1 V/s' lik tarama hızına kolaylıkla ulaşabilir.

Kare dalga voltametrisinde net akım (ΔI) hem ileri hem de geri puls akımlarından daha büyüktür. Bu nedenle, voltametrik pik genellikle çok kolay okunmaktadır. Bu da, yöntemin doğruluğunu arttırmakta ve diferansiyel puls voltametrısından daha yüksek duyarlılığın elde edilmesini sağlamaktadır. Böylece Kare dalga voltametrisinin duyarlılığı 10^{-7} ile 10^{-8} M sınırlarına inebilmektedir [66]. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğini artırmak mümkündür. Günümüzde birkaç firma kare dalga voltametri cihazlarını ticari olarak piyasaya sunmuştur. Bu tekniğin ilerde organik ve inorganik analizde büyük önem kazanacağı kesin

gibidir. Ayrıca, kare dalga voltametrisinin yüksek performans sıvı kromatografisi dedektörü olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [67].

Dönüşümlü voltametri

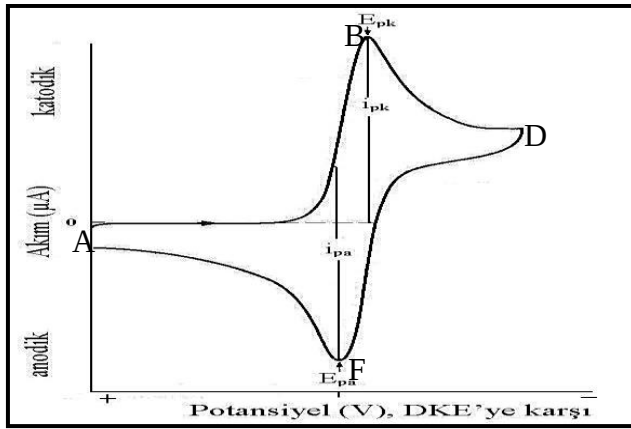
Dönüşümlü voltametri çoğunlukla CV şeklinde kısaltılır. Bu yöntemde, potansiyel üçgensel potansiyel döngüsü Şekil 2.9'deki gibi verecek şekilde ileri ve geri tarama yapılırken akım ölçülür.



Şekil 2.9. Dönüşümlü voltametri potansiyelin uygulanması.

Dönüşümlü voltametri belirli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır. Sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Bu çevrim birkaç kez tekrarlanarak çoklu taramalarda yapılabilir. Geri yöndeki potansiyellere dönüş potansiyelleri de denir. Dönüş potansiyellerinin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönündeki bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da geri tarama olarak adlandırılır.

Üçgen dalga uygulandığında Şekil 2.10.'daki gibi bir voltamogram elde edilir.

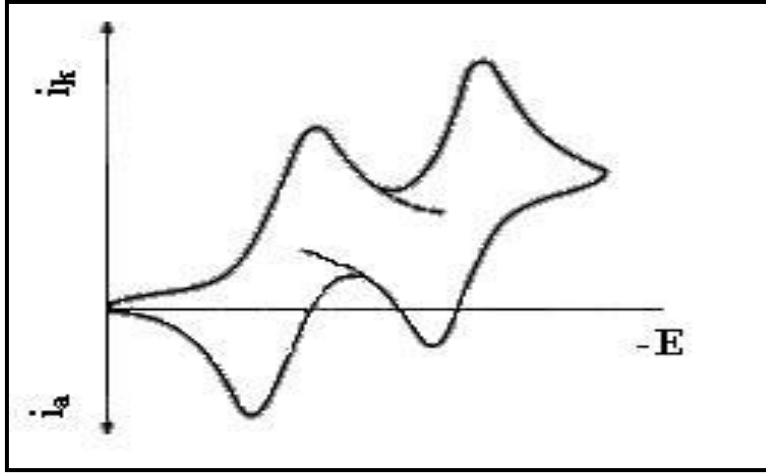


Şekil 2.10. CV ile elde edilen akım-potansiyel eğrisi.

Bu eğri izah edilmek istenirse, gittikçe artan bir katodik potansiyel uyguladığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B' den D'ye kadarki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Pikin tepe noktasından sonra difüzyon tabakası, elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla küçülür (D noktasından F noktasına). F' de uygulanan katodik potansiyel azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi devam eder. Ancak indirgenmiş madde derişimi azalmış olduğundan akım da azalır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğundan akım da azalır. Potansiyel değeri daha pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik şeklinde görülür sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyonu yoluyla harcanması nedeniyle azalır.

Bir dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleri, katodik pik potansiyeli E_{pk} , anodik pik potansiyeli E_{pa} , katodik pik akımı i_{pk} ve anodik pik akımı i_{pa} dır. Tersinir bir elektrot tepkimesi için anodik pik potansiyeli E_{pa} , ile katodik pik potansiyeli E_{pk} arasında $0,058/n$ V' luk bir potansiyel farkı olmalıdır. Buradaki n, aktarılan elektron sayısıdır.

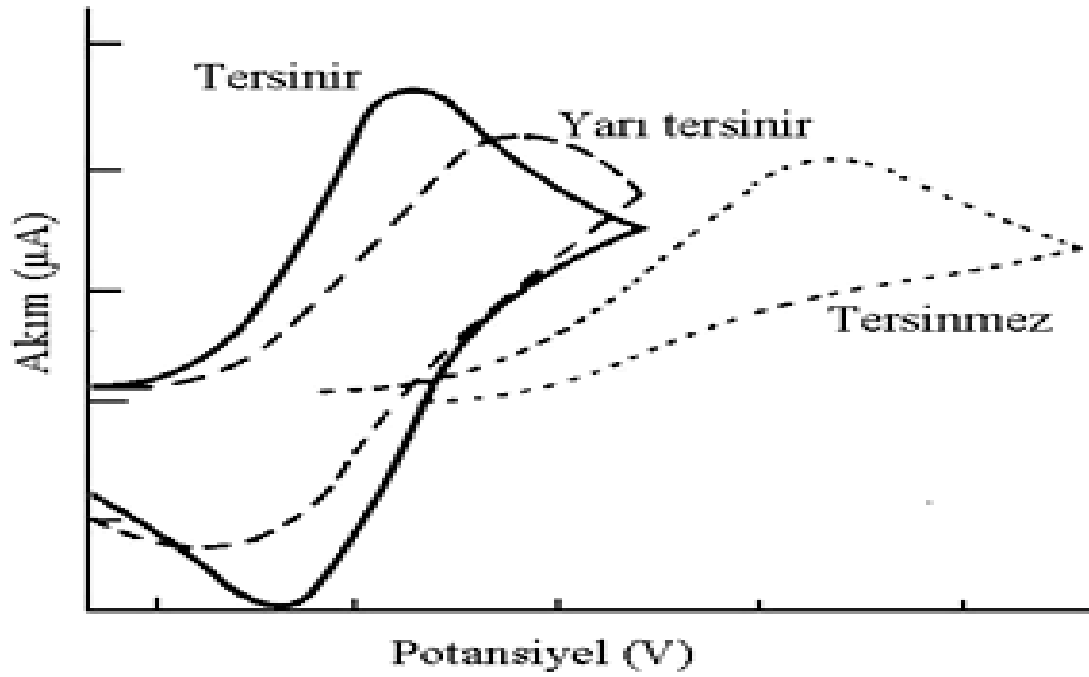
Ortamda iki aşamada indirgenebilen bir elektro aktif madde ya da iki ayrı potansiyelde indirgenen iki farklı elektro aktif madde bulunuyorsa elde edilecek dönüşümlü voltamogram Şekil 2.11'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.11. İki basamakta indirgenebilen bir maddenin CV' si.

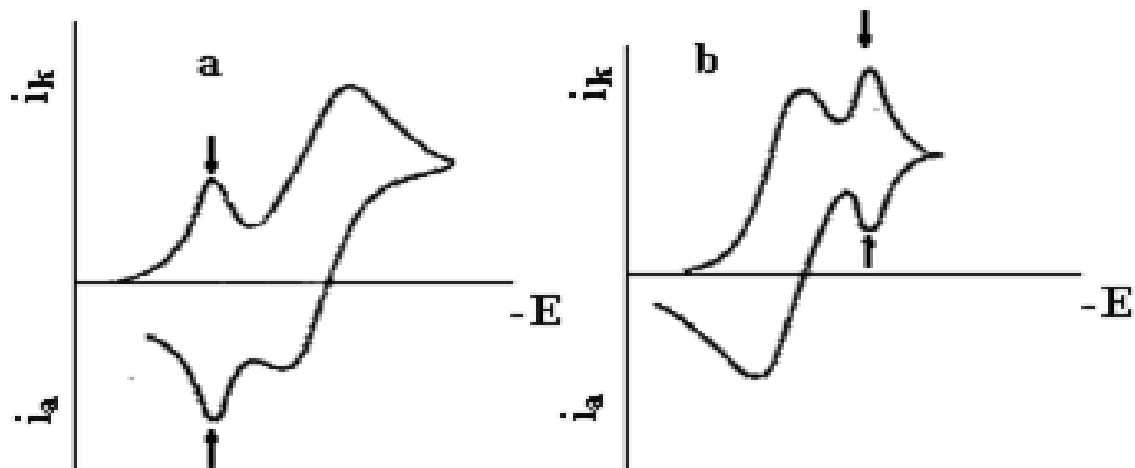
Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesi ile bir sistemin hangi potansiyellerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını kolayca anlamak mümkündür.

Elektrot tepkimesinin tersinirliği azaldıkça katodik ve anodik pikler birbirinden daha ayrı potansiyellerde ve daha yayvan olarak gözlenir. Bir başka deyişle ΔE_p değerleri elektrot tepkimesinin hız sabitinin bir ölçüsüdür. Tam tersinmez bir elektrot tepkimesinde ise geri taramada bir pik gözlenmez. Tam tersinmez elektrot tepkimelerinde ileri yöndeki pik akımı potansiyel tarama hızının karekökü ile orantılıdır ve pik potansiyeli potansiyel tarama hızı artınca negatif gerilimlere kayar. Yarı tersinir elektrot tepkimelerinde ise pik akımı belli bir tarama hızına kadar tersinir sistemlerdeki gibi tarama hızının kareköküyle doğru orantılı biçimde artar. Şekil 2.12'te tersinir, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için geri dönüşümlü voltamogramlar görülmektedir.



Şekil 2.12. Tersinir, tersinmez ve yarı tersinir sistemler için voltamogramlar.

Bazı durumlarda bir elektrot tepkimesini izleyen çözelti tepkimesinin ürünleri elektro aktif ise dönüşümlü voltamogramlarda bunlara ait pikler de gözlenir ve böylece elektron aktarımı olayının mekanizması aydınlatılır. Yüzeye tutunmuş bir maddenin elektrot tepkimesinde, ölçülen pik akımının değeri uygulanan gerilimin tarama hızının karekökü ile değil, tarama hızı ile doğru orantılıdır. Elektrot tepkimesine giren maddenin ve ürünün kuvvetli bir biçimde elektrot yüzeyine tutunduğu durumlarda elde edilen dönüşümlü voltamogramlar Şekil 2.13'te görülmektedir.



Şekil 2.13. (a) Elektrot tepkimesinde ürünün adsorpsiyonu
(b) Elektrot tepkimesinde tepkenin adsorpsiyonu

Dönüşümlü voltametri, rutin nicel analizlerde kullanılmazken organik ve inorganik yapıdaki elektro aktif türlerin yükseltgenme/indirgenme işlemlerinin mekanizma ve kinetik çalışmaları için önemli bir araçtır.

Tersinir reaksiyonlar

Elektrot – çözelti ara yüzeyinde meydana gelen heterojen reaksiyon, (Eşitlik 2.10.)



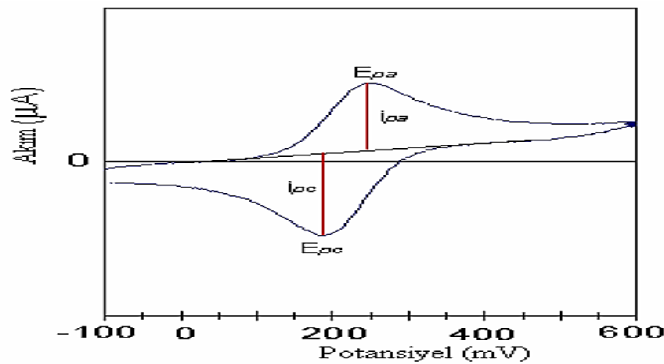
şeklinde gerçekleşen tersinir indirgenme reaksiyonu olduğu ve elektrot reaksiyonu başlamadan önce, çözelti ortamında sadece indirgenebilir “O” türünün bulunduğu kabul edilsin. Bu durumda, elektrokimyasal olayın öncesinde ve sonrasında, bu olaya eşlik eden herhangi bir kimyasal reaksiyonun da oluşmadığı düşünüldüğünde ve tarama hızının çok yavaş olması durumunda, akım–potansiyel grafiği belli bir potansiyelden sonra sınır akımına ulaşır ve akım potansiyelden bağımsız bir hal alır. Tarama hızı arttıkça, akım–potansiyel grafiği bir pik haline gelir ve bu pik yüksekliği tarama hızı ile doğrusal olarak artar. Elektrokimyasal sistemde, sabit şartlar altında ve tarama hızının yavaş olması durumunda, elektrot yüzeyinden belli uzaklıkta çözeltideki analit derişimi sabittir. Ayrıca Nernst difüzyon tabakasındaki analit derişiminde meydana gelen değişmede doğrusaldır. Difüzyon tabakasında meydana gelen tersinir bir reaksiyon için, [O]/[R] oranı Nernst eşitliği ile potansiyele bağlıdır. Sisteme, negatif yönde potansiyel uygulandıkça, analitin elektrot yüzeyindeki derişimi ([O]) azalır ve buna bağlı olarak derişimdeki fark yani akım artar. Bu durum aşağıdaki eşitlikten (Nernst eşitliği) kolayca görülebilir. (Eşitlik 2.11.)

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[R]}{[O]} \quad (2.11)$$

Uygulanan potansiyelin bir sonucu olarak, analitin elektrot yüzeyindeki derişimi belli bir süre sonra sıfır olur. Analit derişiminin sıfıra düştüğü bu potansiyelden sonra “O” ve “R” türleri için derişim farklılaşması ortadan kalkar ve bu durumun sonucu olarak akım sabit hale gelir.

Uygulanan potansiyelin zamanla değişme hızının yüksek olması durumunda, çözeltiden elektrot yüzeyine kütle aktarım hızı, denge koşullarının sağlanmasına yetecek kadar

yüksek olmaz. Böyle bir durumda, difüzyon tabakasındaki derişim farklılaşması doğrusallıktan sapma gösterir ve uygulanan potansiyel ile $[O]/[R]$ ilişkisi Nernst eşitliğine göre ifade edilemez. Uygulanan potansiyel, çözeltideki “O” türünü indirgemeye yetecek büyüklüğe eriştiğinde, henüz, elektrot yüzeyindeki analit derişimi ile çözeltideki analit derişimi birbirine eşittir. Elektrot yüzeyinde “O” türü indirgenmeye başladığı andan itibaren, elektrot yüzeyi ile çözeltideki “O” derişimi arasında bir fark oluşacaktır. Bu derişim farklılığına bağlı olarak, elektrot yüzeyi ile bulk çözelti arasında meydana gelen derişim farklılaşmasının bir sonucu olarak, elektroaktif tür elektrot yüzeyine doğru difüzlenecek ve elektrik bir akım oluşacaktır. Potansiyel negatife doğru kaydıkça, elektrot yüzeyindeki “O” türünün derişimi, çözeltideki “O” türü derişimine göre daha az olacaktır. Uygulanan negatif potansiyelin bir sonucu olarak, belli bir süre sonunda, “O” türünün elektrot yüzeyindeki derişimi sıfır olacaktır. Hızlı taramada, herhangi bir potansiyelde, elektrot yüzeyindeki derişim farkı, kararlı haldeki derişim farkına göre daha büyük ve bunun sonucu olarak da, akım daha fazla olacaktır. Elektrot yüzeyindeki “O” türü derişimi sıfır olduğunda, derişim farkının azalmasıyla birlikte akım da azalacaktır. Bu etkilerin bir sonucu olarak, akım – potansiyel grafiği pik haline dönüşecek ve pik yüksekliği (pik akımı) de tarama hızındaki artmaya bağlı olarak artacaktır. Potansiyel tarama yönü ters çevrildiğinde ve hızlı bir tarama yapıldığında, elektrot yüzeyinde yeteri kadar indirgenmiş “R” türü bulunacağından, daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. Bu yükseltgenmeye bağlı olarak, ters taramada da akım oluşacaktır. İndirgenme mekanizmasında gerçekleşen olaylar, yükseltgenme meydana gelirken de aynı şekilde tekrarlanacaktır. Ancak indirgenme sırasında elektrot yüzeyinde oluşan “R” türü, çözeltiye doğru difüzleneceğinden zıt yöndeki pik akımı (anodik akım) katodik akımdan biraz daha düşük olacaktır. Tersinir bir $O + ne^- \leftrightarrow R$ reaksiyonunun voltamogramı Şekil 2.14.’teki gibidir.



Şekil 2.14. Dönüşümlü voltametri akım potansiyel eğrisi.

Elektrokimyasal sistemde, kütle aktarımının yalnızca difüzyonla gerçekleştiği düşünülürse (olayın difüzyon kontrollü olması, CV tekniğinde en çok tercih edilen durumdur), “O” ve “R” türleri için, Fick yasaları geçerlidir. Böyle koşullarda, pik akımı (i_p), Randles - Sevcik eşitliği ile verilir (Eşitlik 2.12).

$$I_p = 0,4463 nF \left(\frac{nF}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} C_o \alpha D^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} \quad (2.12)$$

Bu eşitlik 25 °C için eşitliği aşağıdaki şekle dönüşür (Eşitlik 2.13)

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C_o D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.13)$$

Bu eşitlikte “A” elektrotun yüzey alanı (cm^2), “n” aktarılan elektron sayısı, C_o elektro aktif türün başlangıçtaki derişimi (mol/cm^3) ve v tarama hızıdır (V/s).

Fick yasalarından türetilen Randles - Sevcik eşitliğinin en önemli göstergelerinden biri, pik akımının, tarama hızının kareköküyle doğru orantılı olarak değişmesidir. Potansiyel taraması boyunca, bir redoks sistemi dengede kalıyorsa, böyle redoks prosesleri “tersinir” olarak adlandırılır. Söz konusu denge, “O” ve “R” türlerinin yüzey derişimlerinin Nernst bağıntısına uyan değerlerde, sabit tutulmasını gerektirir. Bir dönüşümlü voltamogram, aşağıdaki parametre değerlerini sağlıyorsa, tersinirdir.

- a) Bütün tarama hızlarında ve 25 °C’de, katodik ve anodik pik potansiyelleri arasındaki fark $\Delta E_p = (E_{pk} - E_{pa}) = (59 / n) \text{ mV}$.
- b) E_p : tarama hızı ile değişmez.
- c) Bütün tarama hızlarında pik akımları oranı $= i_{pa} / i_{pk} = 1$
- d) Pik akımının tarama hızının kareköküne oranı ($i_p / v^{1/2}$), tarama hızından (v) bağımsız.
- e) Dalga şekli tarama hızıyla değişmez.

Tersinmez reaksiyonlar

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeterli olmadığı için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Bu durumda CV voltamogramının şekli, tersinir durumdan farklıdır. Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük ise elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından yüksektir ve sistem tersinir gibi gözlenebilir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızıyla aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile belli olur. Tersinmez elektron aktarım standart hız sabiti tersinir reaksiyondakine göre daha küçüktür. Tamamen tersinmez piklerde anodik pik gözlenmez. Anodik pik gözlenmeyişi her zaman sistemin tersinmez olduğunu ispatlamaz. Elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı kimyasal bir reaksiyon varlığında yani oluşan ürün, hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüştüğünde de anodik pik gözlenmez.

Tersinmez sistemler için, 25 °C’de, Fick yasalarından türetilen pik akımı eşitliği aşağıdaki gibidir (Eşitlik 2.14).

$$I_p = (2,99 \times 10^5) \propto^{1/2} A C_o D_o^{1/2} v^{1/2} \quad (2.14)$$

Bir dönüşümlü voltamogram, aşağıdaki parametre değerlerini sağlıyorsa, tersinirdir.

- a) $i_p/v^{1/2}$ tarama hızına bağlı değildir.
- b) $i_{pa}/i_{pk} < 1$ ’ dir.
- c) E_{pk} ; tarama hızı ile değişir. Bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
- d) $E_{pk} - E_{pa}$ farkı tarama hızına bağlıdır.

Yarı tersinir tepkimeler

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Elektron transferinin yavaş olduğu yarı tersinir sistemler için, piklerin boyutu

tersinir sistemlere göre daha azalır ve pikler birbirinden epeyce ayrılır. Yarı tersinir sistemlerde, tarama hızıyla pik potansiyelinde kayma olur.

$$E_p = E^0 - \frac{RT}{\alpha n F} \left[0,78 - \ln \frac{k^0}{D^{\frac{1}{2}}} + \ln \left(\frac{\alpha n F v}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (2.15)$$

Burada α transfer katsayısıdır ve n yük-transfer basamağındaki elektron sayısıdır. Bu yüzden, E_p , E^0 'dan daha yüksek potansiyellerde oluşur. Pik potansiyeli ve yarı pik potansiyeli $48/\alpha n$ mV'tan farklı olur. Pik akımı, aşağıdaki eşitlikten (Eşitlik 2,16) görüldüğü gibi, çözeltinin derişimiyle orantılıdır fakat α transfer katsayısına bağlı olarak pik yüksekliği daha düşüktür. $A=0,5$ ise, tersinir pik akımının tersinmez pik akımına oranı 1,27'dir.

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n (\alpha n)^{\frac{1}{2}} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (2.16)$$

Standart hız sabitinin $10^{-1} > k^0 > 10^{-5}$ cm/s olduğu yarı tersinir sistemler için akım, hem yük transferi hem de kütle aktarımıyla kontrol edilir. Dönüşümlü voltamogramın şekli, $k^0/(\pi \alpha D)^{1/2}$ 'nin bir fonksiyonudur. ($\alpha = nFv/RT$). $k^0/(\pi \alpha D)^{1/2}$ arttıkça, sistem tersinirliğe yaklaşır. $k^0/(\pi \alpha D)^{1/2}$ 'nin, yüksek tarama hızlarındaki küçük değerleri için sistem tersinmez davranış gösterir. Yarı tersinir sistemlerde, pik potansiyelleri, tersinir sistemlerle karşılaştırıldığında, birbirinden oldukça ayrıdır.

Bir reaksiyonun yarı tersinir olduğunun belirlenmesinde de dönüşümlü voltametri çalışmalarından elde edilen verilerden yararlanılır. Bu amaçla, aşağıdaki kriterler incelenir [68-70].

Yarı tersinir bir tepkime için:

a) $i_p/v^{1/2}$ tarama hızına kısmen bağlıdır.

b) $i_{pa}/i_{pk} = 0,5$ 'dir. ($\alpha = 0,5$ ise)

c) E_{pk} ; tarama hızı ile değişir. Bu değişme genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.

d) $E_{pk} - E_{pa}$ farkı düşük tarama hızlarında $59/n$ 'e yaklaşır. Yüksek tarama hızlarında bu değerden daha büyüktür ve tarama hızı ile artar.

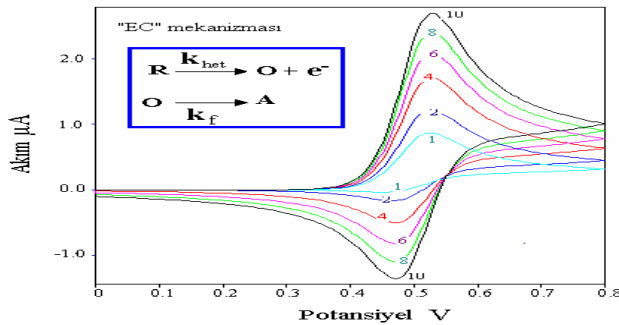
e) Tarama hızı arttıkça pik genişlemesi olur.

EC mekanizması

“EC” mekanizmasında, elektrokimyasal basamağı bir kimyasal basamak takip etmektedir. EC mekanizması şematik olarak aşağıdaki gibi gösterilmektedir;



İlk basamakta (E), indirgenmiş tür (R), elektrot yüzeyinde “O” türüne yükseltgenir. Elektrokimyasal basamağın ürünü olan “O” türü ve elektrokimyasal basamağı takiben başka bir “O” türüyle, komşu moleküllerle veya çözücü ile kimyasal reaksiyona girerek (C), “A” türünü oluşturur. “A” türü, elektroaktif olmadığı gibi, sadece çalışılan potansiyel aralığında elektroaktif olmayabilir. Şekil 2.15’de “EC” mekanizmasının bulunduğu bir proseste, pik akımlarının, tarama hızı ile nasıl değiştiğini göstermektedir.



Şekil 2.15. “EC” mekanizmasını gösteren çoklu tarama yapılmış voltamogram örneği ($v=1, 2, 4, 6, 8, 10$ V/s)

Elektrokimyasal reaksiyonun hız sabiti, heterojen hız sabiti adını alır ve k_{het} ile kimyasal reaksiyonun hız sabiti k_f ile gösterilir.

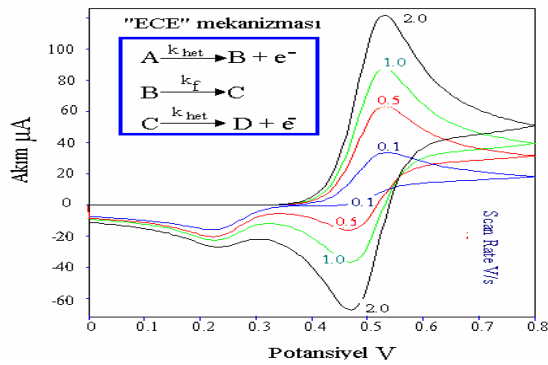
Elektrokimyasal indirgenme mekanizması, CV de tarama hızına karşı, pik akımının tarama hızının kareköküne oranı ($i_{pk}/v^{1/2}$) grafiğinden elde edilmektedir. Tarama hızındaki artışa karşı pik akımının tarama hızının kareköküne oranındaki azalma EC indirgenme (elektrokimyasal-kimyasal) mekanizmasının baskın olduğu anlamına gelmektedir.

Elektrokimyasal sistemde “EC” mekanizmasının varlığı, aşağıdaki parametrelerle de desteklenmelidir.

- a) $I_{pa}/I_{pk} < 1$ dir. Ancak v arttıkça 1’e yaklaşır.
- b) $I_{pk}/v^{1/2}$ oranı v arttıkça çok az da olsa azalır.
- c) E_{pk} , tersinir durumdakinden daha pozitiftir.
- d) Artan v ile E_{pk} negatif bölgeye kayar ve saf kinetik bölge için v ’deki 10 kat artış 30/n mV kaymaya neden olur.

ECE mekanizması

Dönüşümlü voltametri tekniğinde ile belirlenebilen bir diğer mekanizma ise “ECE” mekanizmasıdır. “ECE” harfleri, mekanizmanın üç basamakta gerçekleştiğini gösterir. İlk basamak, elektrot yüzeyinde elektron aktarımını içeren elektrokimyasal prosten oluşur. Bu basamakta oluşan ürün kararsız olup, kimyasal reaksiyon ile ikinci bir türe dönüşür ve oluşan bu yeni tür, çalışılan potansiyel aralığında elektro aktiftir. Potansiyel tarama yönü, başlangıç değerine doğru ters çevrildiğinde, oluşan bu yeni türe ait yeni bir pik tespit edilir.



Şekil 2.16. “ECE” mekanizmasını gösteren çoklu tarama yapılmış voltamogram örneği ($v = 0,1 \text{ } 0,5 \text{ } 1,0 \text{ } 2,0 \text{ V/s}$).

Kimyasal basamakta oluşan tür, başlangıçta çözeltide bulunan türden daha zor yükseltgeniyorsa, ikinci elektrokimyasal reaksiyon ileri taramada da gözlenebilir. Şekil 2.16’ da “ECE” mekanizmasının bulunduğu bir elektrokimyasal olayda, pik akımlarının, tarama hızı ile değişimi görülmektedir. ECE mekanizmasına göre yürüyen bir elektrot reaksiyonu aşağıdaki kriterlere uymalıdır.

- a) $[I_{pk}/v^{1/2}]$ değeri, tarama hızı ile değişir. Ancak yüksek ve düşük tarama hızlarında limit değere ulaşır ve $[I_{pk}/v^{1/2}]$ (düşük v) $>$ $[I_{pk}/v^{1/2}]$ (yüksek v) dir.
- b) I_{pa}/I_{pk} oranı, artan tarama hızı ile artar ve yüksek tarama hızlarında 1’e yaklaşır.

CE mekanizması

Bir elektrot reaksiyonunda elektron aktarım basamağından önce elektroaktif maddenin oluşmasına yol açan bir kimyasal reaksiyonun bulunması CE mekanizması olarak adlandırılır ve aşağıdaki genel reaksiyon ile gösterilir.



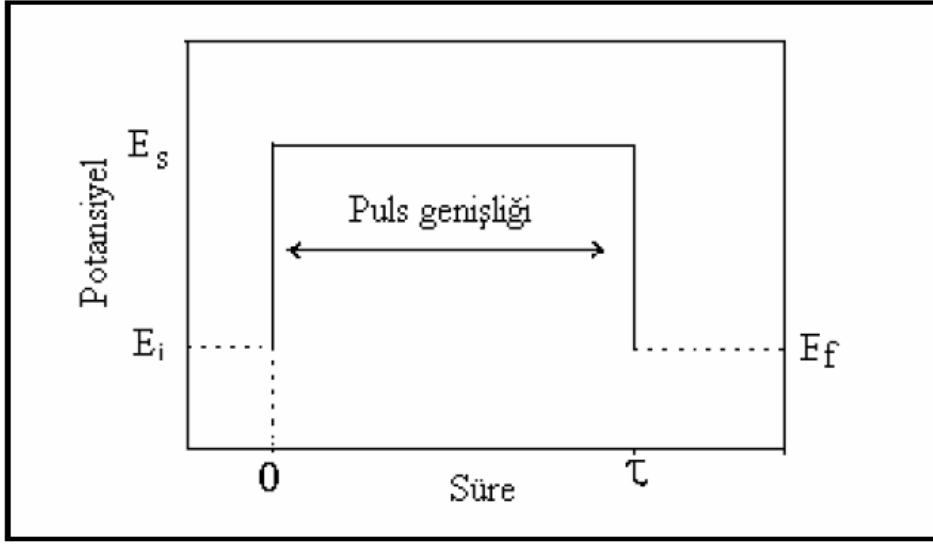
Bu eşitliklerde A, elektroaktif olmayan bir maddeyi ifade etmektedir. Bu maddenin elektrot yüzeyine ne indirgediği nede yükseltgediği kabul edilir. Elektroaktif tür O maddesidir. O ile gösterilen elektroaktif ürün, indirgenmesiyle konsantrasyonu azalır ve kimyasal reaksiyon sağa doğru kayar.

CE mekanizma kriterleri:

- a) Tarama hızındaki artış E_p' yi anodik yöne kaydırır.
- b) Tarama hızındaki artış ile $i_p^k/V^{1/2}$ oranı azalır.
- c) $\dot{I}_p^a/i_p^k$ oranı her zaman 1’e eşit veya 1’den büyüktür ve tarama hızındaki artış ile büyür.

Kronoamperometri (CA)

Kontrollü potansiyel tekniklerinden biri olan Kronoamperometri, karıştırılmayan bir çözeltide, çalışma elektrodunun potansiyelini, faradayik bir reaksiyonun gerçekleşmediği bir potansiyelden elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin neredeyse sıfır olduğu potansiyele kadar basamaklandırmaya dayanır. Kronoamperometri deneyi sonucunda, zamanın bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü, akım-zaman grafikleri elde edilir. Bu grafikler aynı zamanda, kütle aktarımı genellikle difüzyon kontrollü olduğu için, elektrot yüzeyinin yakınlardaki derişim farkını yansıtır.



Şekil 2.17. Kronoamperometride çalışma elektrotuna uygulanan potansiyelin zamanla değişimi.

Grafikte E_i başlangıç uygulama potansiyeli E_s basamak potansiyeli ve E_f bitiş potansiyelidir. Elektrot yüzeyinde; $O + e^- \longrightarrow R$ şeklinde bir elektrokimyasal olay gerçekleştiği düşünülürse, elektroda uygulanan potansiyel, bu olayın toplam hızını etkiler. Redoks potansiyelinden (E_0) daha pozitif potansiyellerde, “O” türünün “R” türüne dönüşmesi söz konusu değilken, bu potansiyelden daha negatif potansiyellerde elektrokimyasal olay, difüzyon kontrollüdür (yani, “O” molekülleri, elektrot yüzeyine ulaşır ulaşmaz elektroliz olur).

Başlangıçta çözeltide sadece “O” türü bulunmaktadır. Potansiyel basamağı uygulandıktan sonra, elektrot yüzeyindeki “O” türü derişimi sıfıra kadar azalır ve bu esnada elektrot ile

çözelti ara yüzeyinde bir derişim farklılaşması meydana gelir. Çözeltideki “O” türleri elektrot yüzeyine difüze olup, “R” türüne dönüşürken, difüzyon tabakası çözelti tarafına doğru genişler. Bu esnada oluşan akımın, zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilmesi tekniğı “kronoamperometri” olarak adlandırılır. Oluşan akımın zamanla değişimi Cottrell eşitliğı ile verilir (Eşitlik 2.17).

$$I = \frac{n F A D^{1/2} C_0}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad (2.17)$$

Cottrell eşitliğinden de görüldüğü gibi akım, geçen sürenin karekökü ile ters orantılıdır.

Kronoamperometri genellikle elektroaktif türlerin difüzyon katsayılarının veya çalışma elektrodunun yüzey alanının hesaplanmasında kullanılır. Aynı zamanda, elektrot reaksiyonlarının mekanizmasının belirlenmesiyle ilgili çalışmalarda da kronoamperometri verilerinden yararlanılır [65].

2.9. Elektrokimyasal Özelliklerin İncelenmesi

2.9.1. Maddenin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini

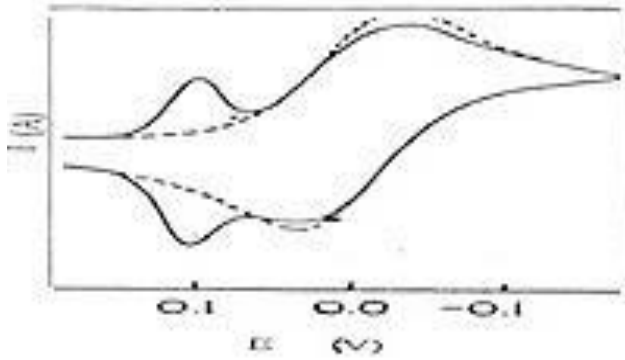
Dönüşümlü voltametrimin en önemli uygulamalarından biri kimyasal reaksiyonların redoks basamakları için nitel bilgiler elde edilmesini sağlamaktadır. Bu tip reaksiyon mekanizmalarında genellikle redoks basamağı için E ve kimyasal basamaklar için C harfleri kullanılır. Elektroaktif türlerin yüzey derişimlerini doğrudan etkileyen böyle kimyasal reaksiyonların varlığı, pek çok organik ve anorganik bileşiklerin redoks reaksiyonları için yaygın olarak bilinmektedir. Dönüşümlü voltametriden elde edilen voltamogramda elektrokimyasal aktif veya ürünün kimyasal olarak yarışması sonucu oluşan değişiklikler, bu reaksiyon basamaklarının açıklanması ve reaktif ara ürünlerle ilgili güvenilir kimyasal bileşikler elde edilir. Örneğın; bir redoks sistemi için EC mekanizması, yani elektron aktarım basamağından sonra bir kimyasal basamak gerçekleşiyorsa, dönüşümlü voltamogramda ters taramada küçük bir pik gözlenir. Çünkü indirgenme ürünü yüzeyden kimyasal olarak uzaklaşmaktadır.

Elektrokimyasal indirgenme mekanizması, CV de tarama hızına karşı, pik akımının tarama hızının kareköküne oranı ($i_{pk}/v^{1/2}$) grafiğinden elde edilmektedir. Tarama hızındaki artışa karşı $i_{pk}/v^{1/2}$ oranındaki azalma EC indirgenme (elektrokimyasal-kimyasal) mekanizmasının baskın olduğunu gösterir.

2.9.2. Adsorpsiyon kontrol tayini

Çözelti içerisindeki iyonlar ve moleküller elektrot yüzeyine çeşitli şekillerde adsorbe edilebilirler. Adsorbe olan iyon veya molekül yüzeyi arasında bir çeşit bağ meydana gelir. Bu bağ anyon veya katyonlarda elektrostatik karakterli olduğu gibi yüklü elektrot yüzeyi ile dipol özellikteki moleküller arasında yük – dipol etkileşmesi şeklinde de olabilir. Elektroaktif maddeler, ara ürünler veya nihai ürünlerin elektrot yüzeyine adsorplanması elektrot reaksiyonunu kuvvetli bir şekilde etkiler. Elektrot mekanizmasında doğrudan yer almayan iyon veya moleküllerin adsorplanması ise elektrot aktarım hızını etkilediği gibi elektrot reaksiyon mekanizmasını değiştirerek farklı ürün oluşumuna yol açabilir. Bu sebepten dolayı, beklenmeyen elektrokimyasal davranışlar adsorbsiyon olayına bağlanır.

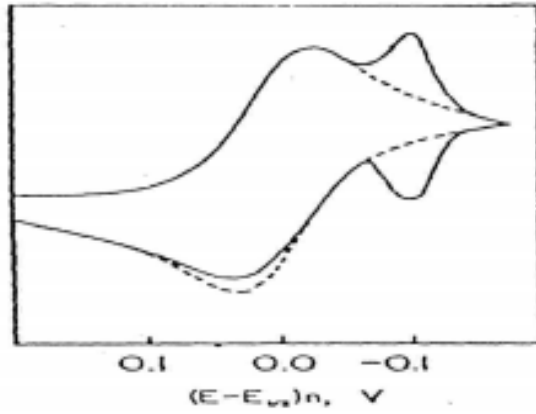
Ürün kuvvetli bir şekilde adsorbe oluyorsa aşağıdaki Şekil 2.18'den görüldüğü gibi voltamogramda bir ön pik gözlenir.



Şekil 2.18. Ürünün kuvvetli adsorbe olduğu durumda gözlenen voltamogram [71]

Bu ön pikin yüksekliği tarama hızıyla doğru orantılı olduğu için ve difüzyon pikinin akımı ise tarama hızının karekökü ile arttığı için $\frac{(i_p)_{ads}}{(i_p)_{dif}}$ oranı tarama hızı arttıkça artar.

Reaktant kuvvetli adsorbe olduğu zaman, difüzyon pikinden sonra bir arka pik gözlemlenir (Şekil 2.19.). Bu arka pik, adsorbe olmuş türün çözeltideki türe göre daha kararlı olmasından dolayı oluşur. Gözlenen arka pik tarama hızındaki artış ile artar [71].



Şekil 2.19. Reaktantın kuvvetli adsorpsiyonunda gözlenen arka pik

Eğer O türünün adsorbsiyonu zayıf ise adsorbe olmuş O'nun indirgenme enerjileri arasındaki fark küçüktür. Böyle bir durumda arka pik gözlenmez. Net etki adsorbsiyon olmadığı duruma göre katodik pikin daha yüksek olarak ortaya çıkmasıdır. Çünkü hem adsorbe olmuş hem de difüzlenen O'nun akıma katkısı vardır. Ters taramadaki anodik pik de aynı şekilde daha yüksektir ama katodik taramadaki kadar fazla değildir.

Eğer R türü zayıf bir şekilde adsorbe oluyorsa, katodik taramadaki pik çok az değişmesine rağmen anodik pik yüksekliği artar. Tarama hızının artması ile anodik pik pozitif potansiyellere kayar. Bunun nedeni elektrot yüzeyine yakın bölgedeki R'lerin adsorbe olmasıdır.

Dönüşümlü voltametri tekniği ile kuvvetli ve zayıf adsorbsiyonun varlığı aşağıdaki testlerle belirlenir [71].

- CV voltamogramların da ön pik veya arka pik gözlenmelidir.
- $\log(i_p) - \log(v)$ grafiğinin eğimi 0,5'ten büyük olmalıdır.
- Akım fonksiyonu $(i_p/Cv^{1/2})$ tarama hızı ile artmalıdır.

- d) Konsantrasyon artışı ile i_p/C oranı azalmalıdır
- e) $i_p/Cv-v$ değişimi sabit olmalıdır.

2.9.3. Difüzyon kontrolü tayini

Elektrokimyasal çalışmalarda, sonuçların değerlendirilmesi adına Fick yasalarından türetilen eşitlikler, olayın difüzyon kontrollü olduğu durum dikkate alınarak düzenlenmiştir. Bir elektrokimyasal çalışmada, analit veya ürün, elektrot yüzeyine adsorbe oluyorsa, elektrot reaksiyonu difüzyon kontrollü olmaz. Elektrokimyasal davranışları incelenen maddelerin, dönüşümlü voltametri kullanılarak alınan voltamogramlarından, reaksiyona adsorbsiyon etkisinin olup olmadığı anlaşılabilir. Difüzyon pikinden önce veya sonra, ilave olarak gözlenen bir pik, kuvvetli bir adsorbsiyonun varlığına işaret eder. Adsorbsiyonun şiddetli olmaması halinde ise, adsorbsiyon piki, difüzyon pikiyle çakışacağından, adsorbsiyon olup olmadığını anlamak için başka bir yönteme başvurulur. Ürün veya analit, elektrot yüzeyine adsorbe oluyorsa, voltamogramdaki ileri yönlü pikin akımı, tarama hızının karekökü ile orantılı olarak değişmez ve $\log i_p$ 'nin $\log v$ ile değişiminin eğimi 0,5 değerinden büyük olur.

2.9.4. Maddenin yükseltgenme veya indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayıları ve difüzyon katsayılarının tayini

Elektrot yüzeyinde meydana gelen heterojen reaksiyonlarda aktarılan elektron sayısı, Baranski ve arkadaşlarının kullandığı tekniğe göre hesaplanmıştır [72]. Bu teknikte aktarılan elektron sayısı ve difüzyon katsayısı, bir mikro elektrot ve bir ultra mikro elektrot (UME) kullanılarak hesaplanabilir. Baranski ve arkadaşları, Cottrell eşitliği ile ultra mikro elektrotlar için sınır akımını veren eşitliği, analit ve aktarılan elektron sayısı bilinen bir madde için yeniden düzenleyerek aşağıdaki eşitlikleri (Eşitlik 2.18 ve Eşitlik 2.19) türetmişlerdir. Bu tekniğin, kullanılan mikro elektrotun aktif yüzey alanının ayrıca hesaplanmasına ihtiyaç olmaması ve hassas sonuçlar elde edilmesi gibi üstünlükleri vardır.

$$n = \frac{n_s S^2 i_s C_s}{S_s^2 i C} \quad (2.18)$$

$$D = \frac{D_s S_s^2 i^2}{S_s^2 i_s^2} \quad (2.19)$$

Bu eşitliklerde n , S , C , i ve D sırası ile elektro aktif bileşiğin aktarılan elektron sayısı, Cottrel eğimi, derişimi (mol/cm^3), UME' deki sınır akımı ve difüzyon katsayısıdır. N_s , S_s , C_s , i_s ve D_s ise standart olarak kullanılan ferrosen bileşiğinin sırasıyla aktarılan elektron sayısı, Cottrel eğimi, derişimi (mol/cm^3), UME'deki sınır akımı ve difüzyon katsayısıdır. Standart madde olarak ferrosen kullanılmasının nedeni, bu bileşiğin çok net ve 1 elektronluk indirgenme piki vermesi ve çözünürlüğünün yüksek olmasıdır.

2.10. Moleküler Floresans Spektroskopisi

Floresans ve fosforesansta maddelerin elektron çekici gruplarında bulunan bir elektron, molekül üzerine gönderilen kısa dalga boylu ışın ile uyarılarak bir üst enerji düzeyine çıkar. Molekülün bir çift elektronundan birinin daha yüksek enerji seviyesine çıkması ile singlet ya da triplet hal meydana gelir. Uyarılma ile elektronun spininin değişmeden bir üst veya iki, üç üst enerji seviyelerine çıkması durumuna uyarılmış singlet hali denir. Bu uyarılmış singlet halinde bulunan bir molekül temel halinde olduğu gibi diyamanyetiktir yani molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyesinde hiçbir yarılma meydana gelmez. Uyarılmış bir elektronun spinini değiştirerek üst enerji seviyelerine çıktığı duruma triplet hali denir. Triplet halde iki ortaklanmamış elektron bulunur ve bu tür moleküller paramanyetiktir. Böyle moleküller manyetik alan içerisinde iki türlü yönelme gösterir ve iki farklı enerji hali vardır. Ancak temel haldeki bir molekülün ışınla uyarılmış triplet hale geçmesi düşük bir olasılıktır. Bazı moleküller uyarılmış singlet halinden uyarılmış triplet haline geçebilir ve bunun sonucu genellikle fosforesans ışımadır. Uyarılmış molekülün elektronları tekrar temel enerji seviyelerine değişik yollarla dönebilirler.

Florimetride, florometre denilen cihazlarla madde konsantrasyonu, floresans ışımının ölçümü ile tayin edilir. İlaç analizi, birçok organik aktif ilaç maddesinin floresansı yardımıyla yapılabilir. Metal iyonlarının analizi, bunların oluşturdukları bazı floresant kompleksleri yardımıyla yapılabilir. Biyolojik örneklerde bazı amino asitler florometrik yoldan tayin edilebilir. Bazı kimyasal bileşiklerin florometrik tayini, bunların bir floresant madde ile tepkimeye sokulup yeni bir floresant ürün veya etiketlenmiş ürün olarak yapılır.

2.11. Kaynak Araştırması

Beydemir ve arkadaşlarının 2000’de yaptığı çalışmada enzimler üzerine yapılan araştırmaların büyük bir kısmını ilaçların enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi oluşturmaktadır. Bundan yola çıkarak yeni ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. İlaçlar enzim sistemlerine inhibitör veya aktivatör olarak bir şekilde etki gösterir. Yapılan araştırmalarda ilaçların çoğunun hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak benzer etkiyi gösterdiği belirlenmiştir, fakat bazı ilaçların *In vivo* ve *in vitro* çalışmaları farklılık göstermektedir [73].

Erat ve arkadaşlarının 2005 de yaptığı çalışmada insan eritrosit GR enzimi üzerinde bazı antibiyotik ilaçların etkisi incelenmiştir. Bunlardan bazıları streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin, ampisilin, metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum’dur. Yapılan invitro çalışmalarda streptomisin sülfat, gentamisin sülfat, tiamfenikol, penisilin G, teikoplanin ve ampisilin ilaçlarının insan GR enzimini az veya çok aktive ettiği belirlenmiştir. Metronidazol, ofloksasin, siproflaksasin, sefazolin sodyum, sefepim, meropenem, sefotaksim sodyum ve sefodizim disodyum ilaçlarının da az veya çok inhibe ettiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisi gösteren ilaçlardan sefotaksim ve sefodizimin K_i ve I_{50} değerleri belirlenmiştir. Sefotaksim için I_{50} 12,179 mM ve K_i 6,5123 $\pm$ 4,1139, sefodizim için I_{50} 1,682 mM ve K_i 0,7446 $\pm$ 0,2216 olarak belirlenmiştir [74].

Siegel ve arkadaşları 1998 de yapılan çalışmada ilk yarı reaksiyonda, NADPH tarafından enzimin indirgenmesi sağlanır ve kararlı bir hal olan E(SH)₂ formu oluşur. İkinci yarı reaksiyonda ise GSSG, E(SH)₂ tarafından indirgenerek iki mol GSH oluşur [75].

Kizek ve arkadaşlarının 2003 yılında disülfid bağı içeren glutatyon ve indirgen tris(2-karboksiletıl)fosfın (TCEP) redoks sistemi dönüşümlü voltametri ile çalışılmıştır. Protein ve peptitlerin indirgenmiş halleri DNA-protein, DNA-genetik etkileşimlerinde önemlidir. Peptit ve proteinlerin indirgenmiş halleri –SH grupları tarafından karakterize edilmiştir. İndirgenmiş glutatyon (GSH) ve yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) formları dönüşümlü voltametri ile ölçülmüştür. Dönüşümlü voltametrde GSH’ın indirgenme potansiyeli pH:9,2 borat tamponunda asılı cıva elektrotunda belirlenmiştir. TCEP sulu ortamda disülfid bağlarının kolayca indirgendiği belirlenmiş. TCEP’in Ag-AgCl karşı indirgenme

potansiyeli -0,25V, GSH'un katodik ve anodik pik potansiyelleri sırasıyla -0,44V ve -0,37V, GSSG'un katodik ve anodik pik potansiyelleri sırasıyla -0,69V ve -0,40V olarak bulunmuştur [76].

Griffith ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada üç farklı bölgeden toplanan çim ve mısırdan saflaştırılan glutatyon redüktaz enziminin Km sabitinin sıcaklığa bağlılığı çalışılmıştır. Enzimin kinetik parametrelerinin sıcaklıkla ilişkisi, çeşitli sıcaklıklarda optimizasyonu ve sıcaklık limitleri çalışılmıştır. Ayrıca enzim sistemlerinin Micheal-Menten sabitinin (Km) sıcaklığa bağlı olduğu belirlenmiştir. Glutatyon redüktaz enzimini Km değeri yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG) substrat olarak kullanıldığı çalışmada 1-40°C aralığındaki sıcaklıklarda hesaplanmıştır. Glutatyon redüktaz için minimum Km değeri 1°C için belirlenmiş ve sıcaklığın azalması ile Km değerinin arttığı gözlenmiştir [77].

Raof ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada glutatyonun tayin edilebilmesi için modifiye ferrosen karbon pasta elektrot kullanılmıştır. Dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri teknikleri kullanılarak pH: 7 tamponunda 480 mV olarak tespit edilmiş. Farklı derişimlerde GSH çözeltileri hazırlanarak dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak kalibrasyon grafikleri çizilmiş. Bu iki yöntem için gözlenebilme sınırı CV için $1,8 \times 10^{-5}$ M, DPV için $2,1 \times 10^{-6}$ M olarak tespit edilmiştir [78].

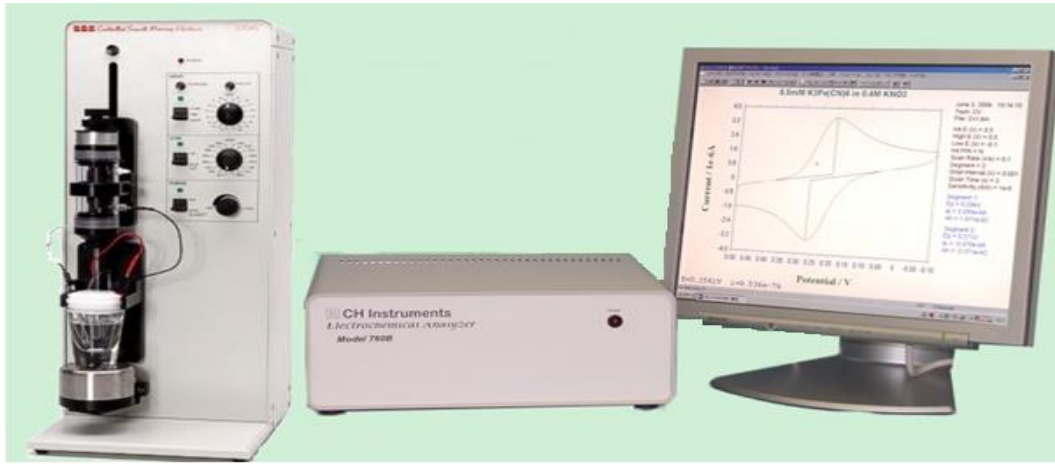
Carta ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı çalışmada bazı alifatik ve aromatik karboksilatların karbonik anhidraz enzimi inhibisyonu çalışılmıştır. Çalışmada alifatik karboksilatların milimolar düzeyde inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Aromatik karboksilatların ise patojenik mantar enzimlerinde nanomolar düzeyinde inhibisyonu tespit edilmiştir. Farklı uzunluktaki kimyasal dallanmaya sahip olan bileşikler karşılaştırıldığında dallanmanın ve metil grubu fazla olan bileşiklerin daha inhibitör özelliği olduğu belirlenmiştir [79].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Potansiyostat cihazı

Deneylerdeki kullanılan voltametri sistemi: Chi760d voltametri cihazı, BAS marka CGME model hücre standı ve bilgisayardan oluşmaktadır.



Resim 3.1. Bilgisayar Kontrollü CHI760d Potansiyostat / Galvanostat sistemi.

3.1.2. Floresans spektrofotometre cihazı

IC_{50} değerlerinin ölçümü için kullanılan emisyon değerleri için Hitachi marka F7000 floresans spektrofotometresi kullanılmıştır.



Resim 3.2. Hitachi F7000 floresans spektrofotometresi

3.1.3. Kullanılan elektrotlar

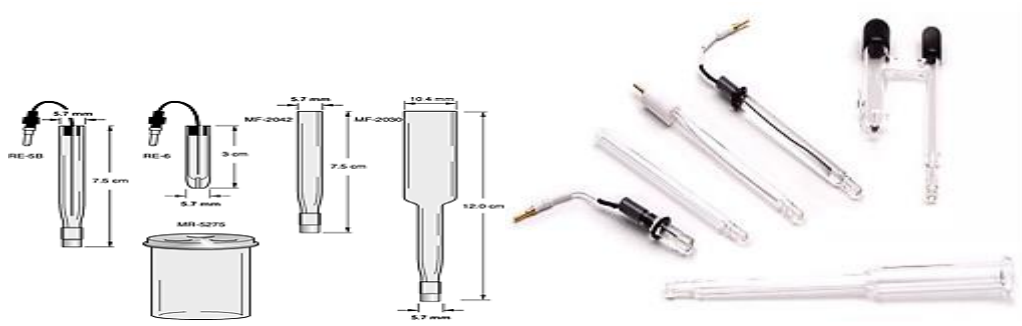
Asılı cıva damlası elektrodu

Kare dalga sıyırma ve dönüşümlü Voltametri çalışmalarında, çalışma elektrodu olarak kullanılan asılı cıva elektrot Merck firmasından sağlanmıştır.

Cıvanın temizlenmesi; Kirlenen cıva behere alındıktan sonra yaklaşık on dakika boyunca bagetle karıştırılarak, üzerinden çeşme suyu geçirilmiştir. Cıvanın üzerindeki çeşme suyu uzaklaştırıldıktan sonra bir litrelik cam mezüre doldurulmuş ve birkaç defa saf su ile çalkalanmıştır. Platin elek mezürün üst kısmında tutularak, cıva platin elekten geçirilerek ince zerrecikler halinde mezürde bulunan saf sudan geçirilmiştir. Bu işlem beş defa tekrarlanmıştır. Daha sonra derişik HNO_3 çözeltisi 1:4 oranında (HNO_3 : H_2O) seyreltilerek 3 M'lık HNO_3 çözeltisi (cıva yıkama suyu) hazırlanmıştır. Cıva yıkama suyu bir litrelik mezüre alınmış ve daha sonra yine platin elek mezürün üst kısmında tutularak, cıva platin elekten yıkama suyu içerisine zerrecikler halinde süzölmüştür. Bu işlemde beş kez tekrarlandıktan sonra mezüre saf su konularak aynı işlem tekrarlanmıştır. Saf sudan geçirme işlemi asitlik giderilinceye kadar tekrarlanmıştır. Cıvanın asitliğinin giderip giderilmediğı turnusol kâğıdı ile kontrol edilmiştir. Asitliği giderilen cıva süzgeç kâğıdı ile iyice kurutulduktan sonra cıvanın temizlenip temizlenmediğı voltamogramlar alınarak kontrol edilmiştir.

Standart gümüş/gümüş klorür elektrot

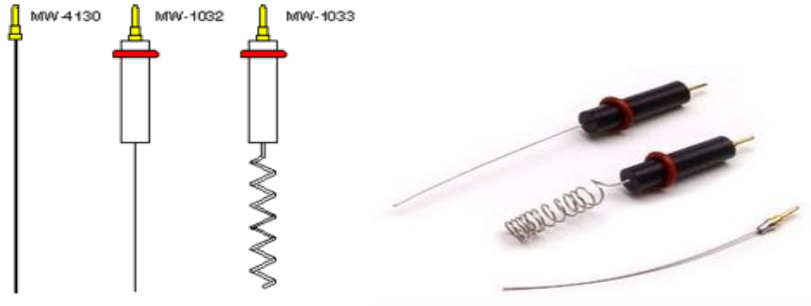
Hem gümüş klorür hem de potasyum klorür yönünden doymun bir çözeltiye daldırılmış bir gümüş elektrottan ibarettir. Bu elektrotun potansiyeli 25°C' da 0,199 V' dur. Bütün elektrokimyasal ölçümlerde referans elektrot olarak standart Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır.



Resim 3.2. Standart gümüş/gümüş klorür elektrot.

Karşıt elektrot

Karşıt elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.



Resim 3.3. Platin tel

Ultra mikro platin elektrot

Ultra mikro elektrot kronoamperometrik çalışmalarda Cottrell eğimlerini hesaplamada kullanılmıştır.



Resim 3.4. Ultra mikro platin elektrot

3.1.4. pH metre

Deneylerdeki pH ölçümleri için daha önceden kalibre edilmiş ORION marka 5 star model pH metre cihazı kullanılmıştır.

3.1.5. Ultra saf su cihazı

Deneylerde Millipore mili-q marka cihazla üretilen, iletkenliği 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ultra saf su kullanılmıştır.

3.1.6. Analitik terazi

Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin tartımları 0,1 miligrama duyarlı OHAUS marka EP214C model analitik terazi ile yapılmıştır.

3.1.7. Azot gazı

Deneylerde kullanılan %99,999 luk azot gazı Oksan firmasından temin edilmiştir.

3.2. Numuneler, Reaktifler ve Çözeltilerin Hazırlanmaları

0,001 M Yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) çözeltisinin hazırlanması

% 98 HPLC saflığında (Sigma) GSSG sodyum tuzundan 0,0066 g alınır, ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 10 mL' ye tamamlanmıştır.

0,001 M indirgenmiş β -nikotinamid adenin dinükleotid 2'-fosfat sodyum tuzu (NADPH) çözeltisinin hazırlanması

% 93-100 HPLC saflığında (Sigma) indirgenmiş NADPH sodyum tuzundan 0,0083 g alınır, ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 10 mL' ye tamamlanmıştır.

0,01 M indirgenmiş glutatyon (GSH) çözeltisini hazırlanması

% 98 HPLC saflığında (Sigma) indirgenmiş glutatyon (GSH) katısından 0,0307 g alınır, ultra saf su içerisinde çözülerek hacmi 10 mL' ye tamamlanmıştır.

0,5 unit Glutatyon redüktaz enzim çözeltisi hazırlanması

Sigma marka 500 unit 740 μ L enzim çözeltisi 3 eşit kısma bölünüp, her kısım 10 mL ultra saf su içerisinde çözülüp hücreye 30 μ L eklenmiştir.

Destek elektrolit olarak kullanılan 0,02 M (pH:7,2) fosfat tamponun hazırlanması

0,7798 g NaH_2PO_4 ve 0,5613 g Na_2HPO_4 tuzları ultra saf su içinde çözülüp hacmi 250 mL' ye tamamlanmıştır. Çözeltinin pH' ı pH metre ile kontrol edilmiştir.

0,01 M stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanması

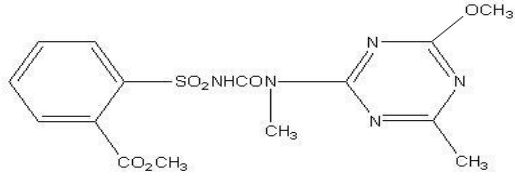
Türkiye Cumhuriyeti Ankara Tarım ve Köy İşleri Müdürlüğünden temin edilen TBM, MSM, TFS, TRS maddeleri kullanılmıştır.

0,0395 g TBM maddesi terazi ile tartılarak DMSO'da çözülüp, ultra saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır.

0,0381 g MSM maddesi analitik terazi ile tartılarak DMSO' da çözülüp, ultra saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır.

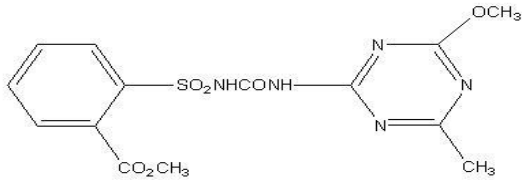
0,0374 g TFS maddesi analitik terazi ile tartılarak DMSO' da çözülüp, ultra saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır.

0,0445 g TRS maddesi analitik terazi ile tartılarak DMSO' da çözülüp, ultra saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır.



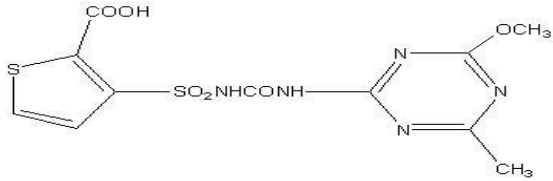
Şekil 3.1. Tribenuron metil (TBM) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il (metil) karbomil sülfomil]benzoat) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi

TBM: 395,4 g/mol



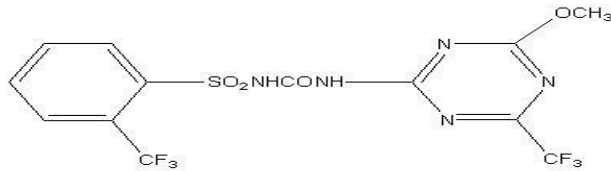
Şekil 3.2. Metsulfuron metil (MSM) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]benzoate) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi

MSM: 381,4 g/mol



Şekil 3.3. Thifensulfuron (TFS) (metil 2-[4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il karbomil sülfomil]tiyofen 2 karboksilat) maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi

TFS: 373,6 g/mol



Şekil 3.4. Tritosulfuron (TRS) (1-(4-metoksi-6-triflorometil-1,3,5-triazin-2-il)-3-(2-triflorometil benzensulfonil)üre maddesinin kimyasal yapısı ve mol kütlesi

TRS: 445,3 g/mol

3.3. TBM, MSM, TFS, TRS Maddelerin Deneyisel Çalışmaları

3.3.1 Elektrokimyasal özelliklerin belirlenmesi için dönüşümlü voltametri tekniğinin çalışma şartları

Elektrokimyasal özelliklerin belirlenmesi için hücreye destek elektrolit olarak 10 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) ilave ettikten sonra 10 dakika süre boyunca ortamda bulunan oksijeni uzaklaştırmak için azot gazı geçirildi ve 100 μL 1×10^{-2} M herbisit etken maddesi eklenerek arka arkaya asılı cıva damlası elektrotunda Ag/AgCl standart referans elektroda karşı 10, 50, 100, 500, 1000 ve 5000 mV/s tarama hızlarında dönüşümlü voltametri voltamogramları alındı.

Kronoamperometri; dönüşümlü voltametri ile elde edilen indirgenme pik potansiyel değerlerinde 0-0,25 s arasındaki akım değişimi ölçülerek, Cottrell eğimleri belirlendi.

UME sınır akım değerleri; platin ultra mikro elektrotlar kullanılarak başlangıç potansiyeli 0 V ve bitiş potansiyeli -1,8 V olacak şekilde dönüşümlü voltametri voltamogramları alındı.

3.3.2 Kare Dalga Voltametrisi kullanılarak enzim inhibisyon mekanizması, IC_{50} ve K_i değerlerinin belirlenmesi

Glutatyon redüktazın, inhibitör içermeyen ortamdaki enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH: 7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu, 100 μL 1×10^{-3} M GSSG, 100 μL 1×10^{-3} M NADPH ve 0,5 unit enzim çözeltisi için, 167 unit enzim çözeltisinden 30 μL eklenerek her 30 s de bir olmak üzere 10 kere kare dalga voltamogramları alındı. Alınan voltamogramlarda GSSG akımına ait pikteki azalmanın ölçümündeki kararsızlıktan dolayı GSH akımına ait pikteki artış değerleri hesaplamalarda kullanıldı. Aynı işlemler, GSH'ın inhibitörsüz ortamdaki tepkime hızlarını ve enzim inhibisyon mekanizmasını belirleyebilmek için 2×10^{-5} M GSSG, 4×10^{-5} M GSSG ve 8×10^{-5} M GSSG derişimlerin de tekrarlandı.

Glutatyon redüktazın inhibitör maddesi içeren ortamda enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH: 7,2 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu, 100 μL 1×10^{-3} M GSSG, 100 μL 1×10^{-3} M NADPH, 100 μL 2×10^{-4} M inhibitör ve 0,5 unit enzim çözeltisi için, 167 unit enzim

çözeltisinden 30 µL eklenerek her 30 s de bir olmak 10 kere kare dalga voltamogramları alındı. Aynı işlemler, GSH' ın 2×10^{-6} M inhibitör maddesi içeren ortamdaki tepkime hızlarını ve enzim inhibisyon mekanizmasını belirleyebilmek için 2×10^{-3} M GSSG, 4×10^{-3} M GSSG ve 8×10^{-3} M GSSG derişimlerinde tekrarlandı. Bütün bu işlemler, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M inhibitör varlığında, GSH'ın tepkime hızını belirleyebilmek için tekrarlandı.

GSH ürünün pik akımındaki artışa göre, GSH'ın 10. ölçümdeki pik akımı ile 1. ölçümdeki pik akımı farkının toplam geçen zamana bölümünün, GSH'ın kalibrasyon grafiğinden bulunan 1/eğim ile çarpılmasıyla tepkime hızı hesaplandı.

$$V = \frac{(ipk_{10} - ipk_1)}{300s} \times \frac{1}{m} \quad (3.1)$$

Hesaplanan hız değerlerine karşı GSSG substrat derişim, değerlerinin Lineweaver- Burk eşitliğine göre 1/V'ye karşı 1/S grafiği çizilerek K_m (x eksenini kestiği nokta) ve V_{maks} (y eksenini kestiği nokta) değerleri hesaplandı. İnhibitörlerin IC_{50} değerleri için, ard arda alınan 10 GSH pik akımlarının ortalaması alınarak, akım-derişim grafiği çizilerek akımın yarıya düştüğü noktadaki derişim belirlendi.

Maddelerin sulu ortamda K_i değerlerini hesaplamak için Eşitlik 3.2. kullanıldı.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (3.2)$$

Eşitlikte IC_{50} ; maddelerin akım veya floresans değerlerinin yarıya düştüğü derişim, S substrat derişimi ve K_m değeri ise Lineweaver-Burk grafiğinde x eksenini kesen değer.

3.3.3. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin IC_{50} değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi

TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin IC_{50} değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlemek için hücreye 160 µL 1×10^{-3} M GSSG, 80 µL 1×10^{-3} M NADPH, 0,5 unit enzim için 167 unit enzim çözeltisinden 30 µL ve 3,730 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) eklendikten sonra 30 s aralıklarla 340 nm ile 550 nm

arasında spektrumlar alındı. Oluşan indirgenmiş glutatyonun(GSH) floresans piki standart glutatyon eklemeleri ile tespit edildi. Bu işlemler hücrede 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M inhibitör varlığında da tekrarlandı.

Çizelge 3.1. Dönüşümlü voltametri için potansiyostatın çalışma şartları.

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	-1,50	V
Dönüm noktası potansiyeli	-2,10	V
Potansiyel tarama hızı	0,1	V/s
Tarama sayısı	2	-
Gaz geçirme süresi	30	s

Çizelge 3.2. Kare dalga voltametri için potansiyostatın çalışma şartları.

Parametre	Değer	Birim
Başlangıç potansiyeli	0	V
Bitiş potansiyeli	-1,8	V
Akım aralığı	10	μ A
Frekans	10	Hz
Puls genliği	25	mV
Eklemelerde gaz geçirme süresi	30	s

Çizelge 3.3 Floresans spektrofotometresi için çalışma şartları

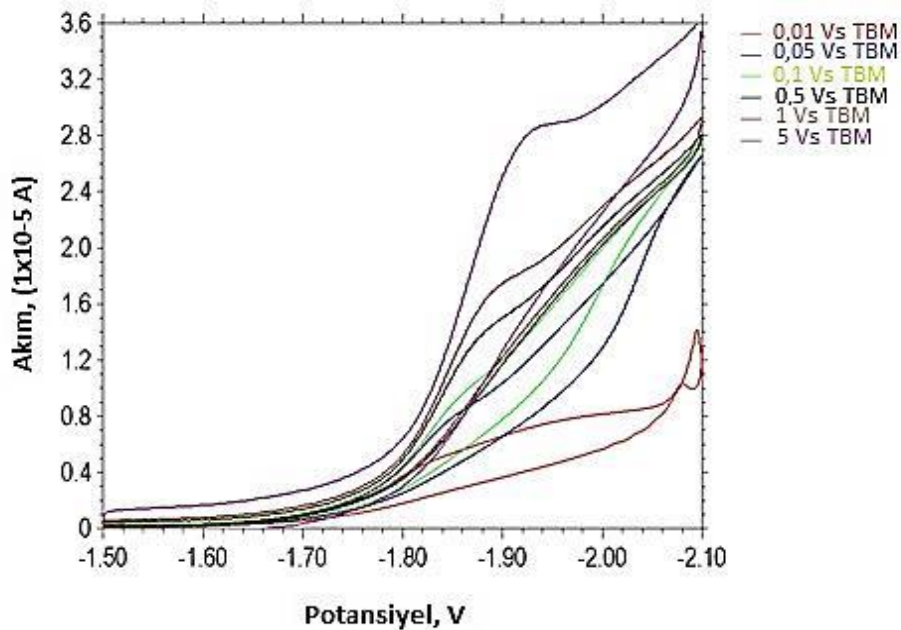
Parametre	Değer	Birim
Başlangıç Dalga Boyu	340	nm
Bitiş Dalga Boyu	550	nm
Uyarım Şiddeti	700	V
Slit Genişliği	5,0	nm

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. TBM, MSM, TFS ve TRS Maddelerinin Sulu Ortamdaki Bazı Elektrokimyasal Özellikleri

4.1.1. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin indirgenme-yükseltgenme potansiyelinin tayini

Sulu ortamda TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri farklı tarama hızlarında dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak belirlenmesi için hücreye destek elektrolit olarak 10 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) ilave ettikten sonra 10 dakika süre boyunca ortamda bulunan oksijeni uzaklaştırmak için azot gazı geçirildi ve $100 \mu\text{L } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ herbisit etken maddesi eklenerek arka arkaya asılı cıva damlası elektrotunda Ag/AgCl standart referans elektroda karşı 10, 50, 100, 500, 1000 ve 5000 mV/s tarama hızlarında dönüşümlü voltametri voltamogramları alındı, elde edilen voltamogramlar sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de verildi. Bu voltamogramlardan okunan potansiyeller Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’ te tablo halinde ifade edildi.

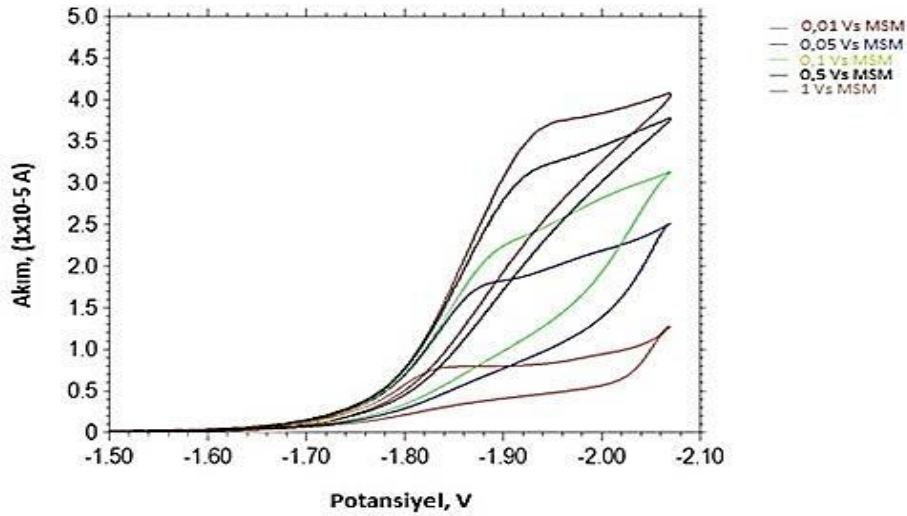


Şekil 4.1. TBM maddesinin pH: 7,2 ($0,02 \text{ M } \text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları

Çizelge 4.1. TBM maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları.

V, V/s	E_{p_k} , V	I_{p_k} , A
0,01	-1,83	$3,501 \times 10^{-6}$
0,05	-1,84	$5,304 \times 10^{-6}$
0,1	-1,86	$7,041 \times 10^{-6}$
0,5	-1,89	$1,203 \times 10^{-5}$
1	-1,89	$1,652 \times 10^{-5}$
5	-1,94	$3,010 \times 10^{-5}$

TBM maddesinin sulu ortamda 0,1 V/s tarama hızında indirgenme potansiyeli -1,86 V tur.

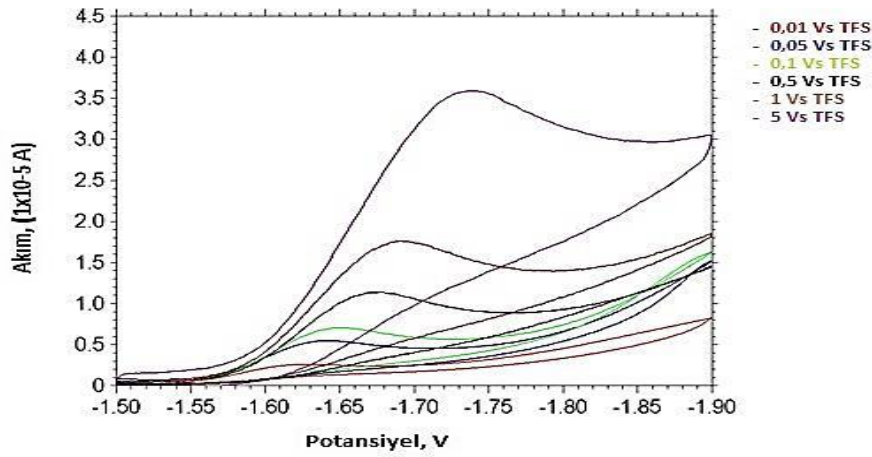


Şekil 4.2. MSM maddesinin pH: 7,2 (0,02 M $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$) tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları

Çizelge 4.2. MSM maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları.

V, V/s	E_{p_k} , V	I_{p_k} , A
0,01	-1,82	$8,502 \times 10^{-6}$
0,05	-1,87	$1,561 \times 10^{-5}$
0,1	-1,91	$2,240 \times 10^{-5}$
0,5	-1,97	$3,204 \times 10^{-5}$
1	-1,98	$3,813 \times 10^{-5}$

MSM maddesinin sulu ortamda 0,1 V/s tarama hızında indirgenme potansiyeli -1,91 V tur.

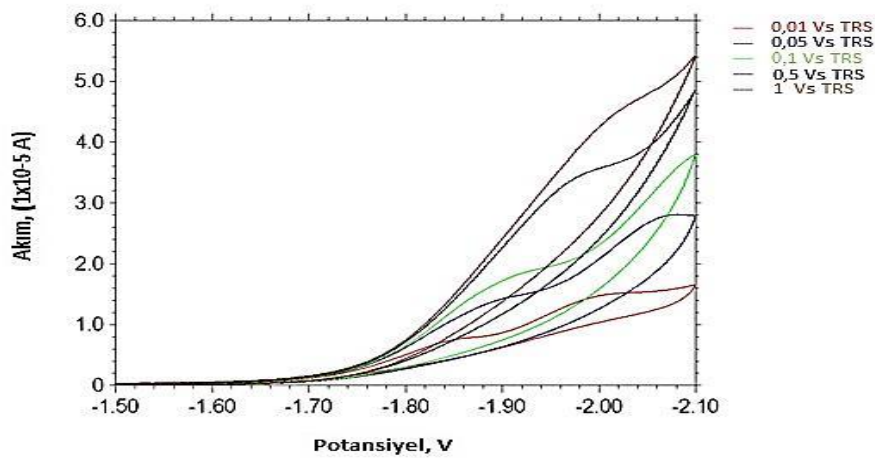


Şekil 4.3. TFS maddesinin pH: 7,2 (0,02 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları

Çizelge 4.3. TFS maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları.

V, V/s	E_{p_k} , V	I_{p_k} , A
0,01	-1,62	$2,591 \times 10^{-6}$
0,05	-1,64	$5,309 \times 10^{-6}$
0,1	-1,65	$7,041 \times 10^{-6}$
0,5	-1,66	$1,143 \times 10^{-5}$
1	-1,69	$1,798 \times 10^{-5}$
5	-1,73	$3,611 \times 10^{-5}$

TFS maddesinin sulu ortamda 0,1 V/s tarama hızında indirgenme potansiyeli -1,65 V tur.



Şekil 4.4. TRS maddesinin pH: 7,2 (0,02 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) tamponunda farklı tarama hızlarında alınan dönüşümlü voltamogramları

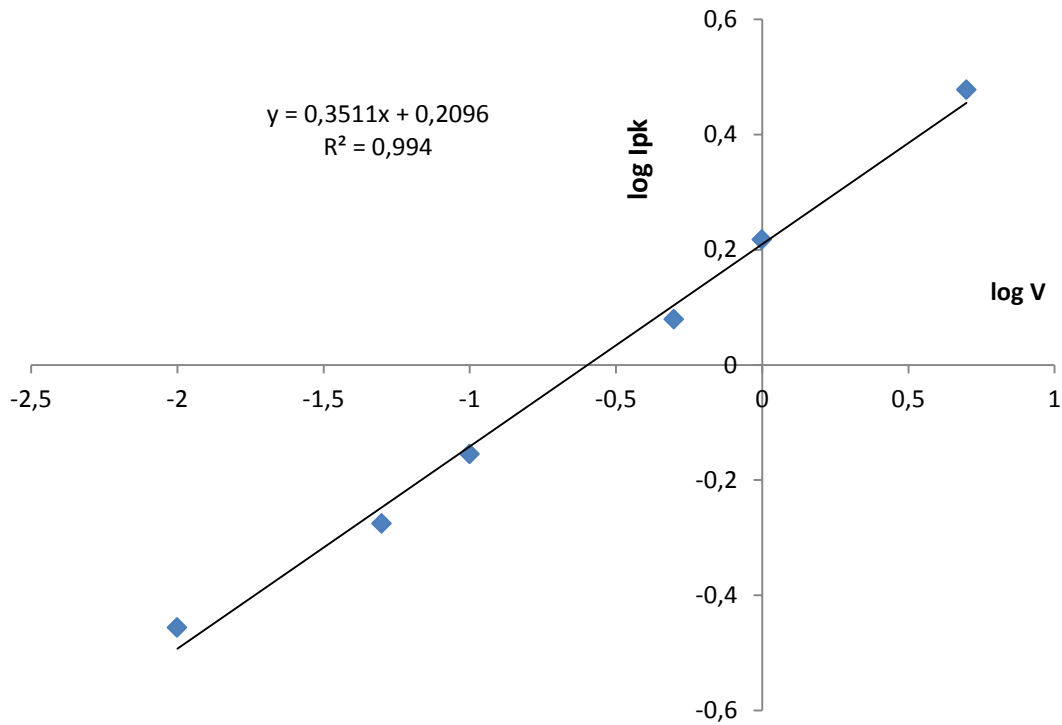
Çizelge 4.4. TRS maddesinin farklı tarama hızlarında indirgenme-yükseltgenme potansiyelleri ve pik akımları.

V, V/s	Ep _k , V	Ip _k , A
0,01	-1,86	$7,801 \times 10^{-6}$
0,05	-1,89	$1,433 \times 10^{-5}$
0,1	-1,92	$1,874 \times 10^{-5}$
0,5	-1,96	$3,519 \times 10^{-5}$
1	-2,01	$4,568 \times 10^{-5}$

TRS maddesinin sulu ortamda 0,1 V/s tarama hızında indirgenme potansiyeli -1,92 V tur.

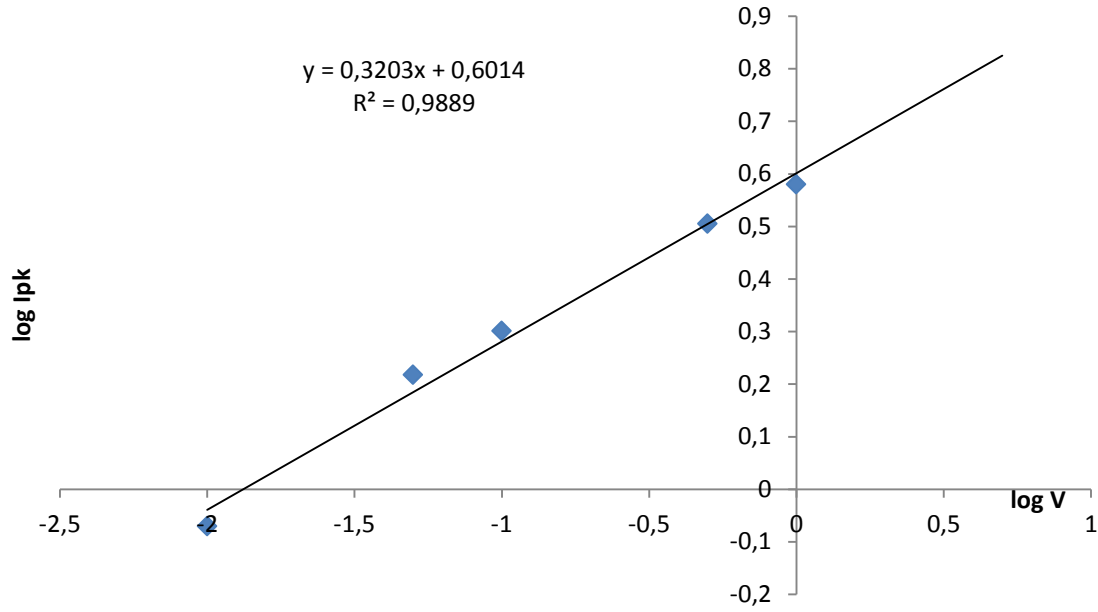
4.1.2. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin sulu ortamda elektrokimyasal davranışının tayini

Maddelerin elektrokimyasal davranışının difüzyon kontrollü veya adsorbsiyon kontrollü olduğunu belirlemek için $\log i_{pk}$ değerleri, $\log v'$ ye karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen grafikte (Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8.) eğimin 0,5 değerine yakın olur.



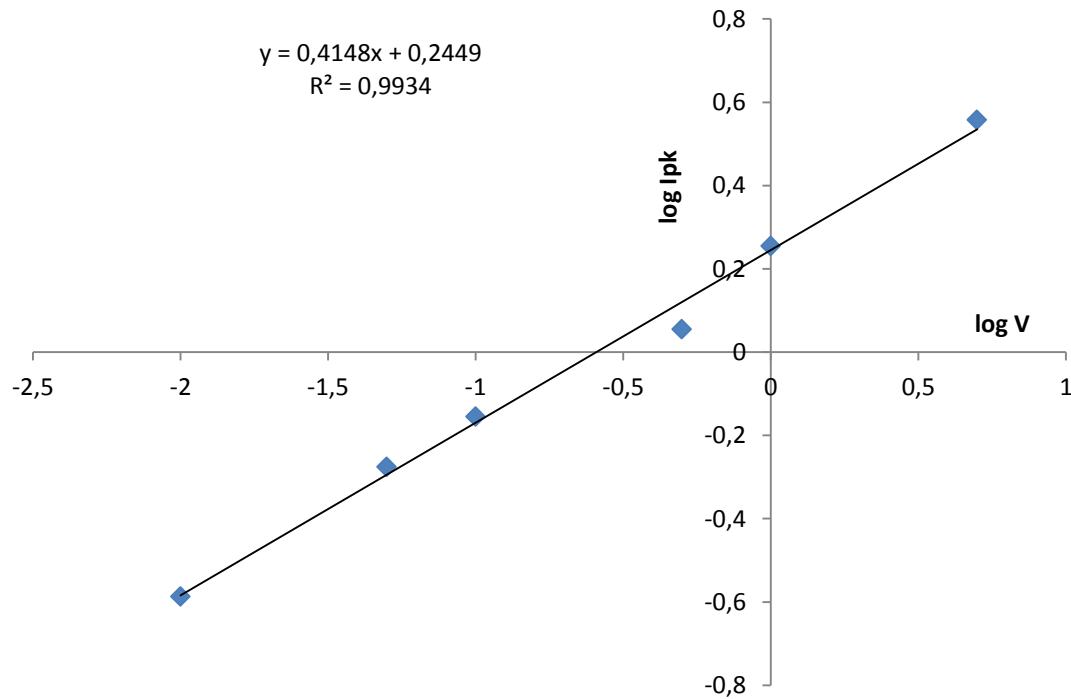
Şekil 4.5. TBM için $\log i_{pk}$ – $\log v$ grafiği.

Grafiğe ait eğimin 0,5 değerine yakın olması, TBM maddesinin asılı cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5).



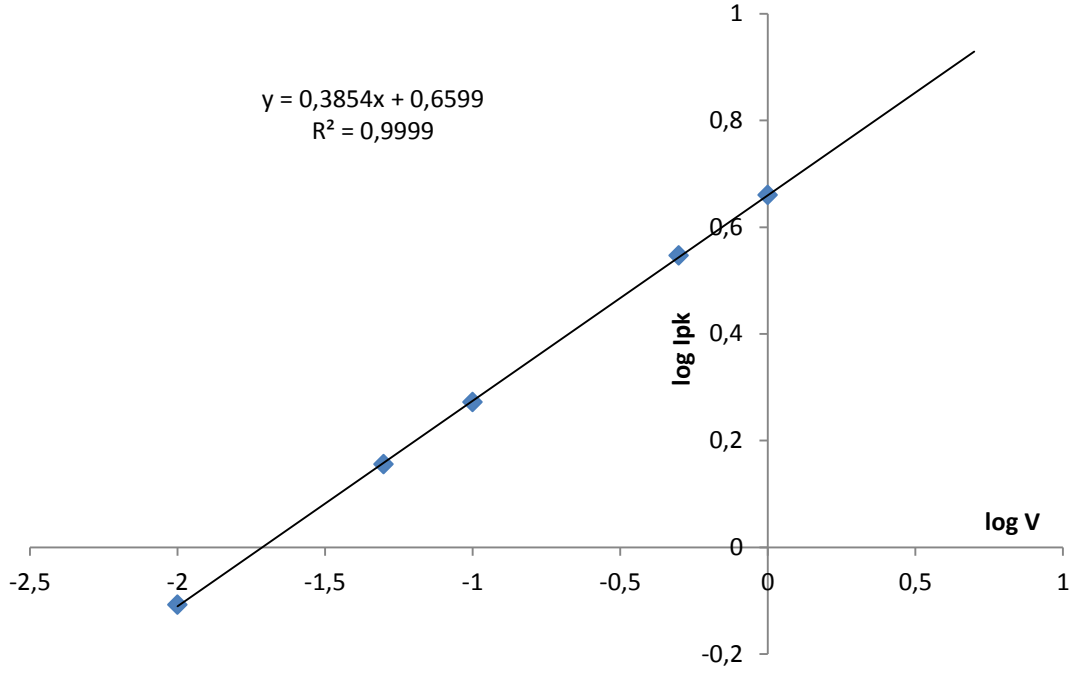
Şekil 4.6. MSM için $\log i_{pk} - \log v$ grafiği.

Grafiğe ait eğimin 0,5 değerine yakın olması, MSM maddesinin asılı cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.7. TFS için $\log i_{pk} - \log v$ grafiği.

Grafiğe ait eğimin 0,5 değerine yakın olması, TFS maddesinin asılı cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7).

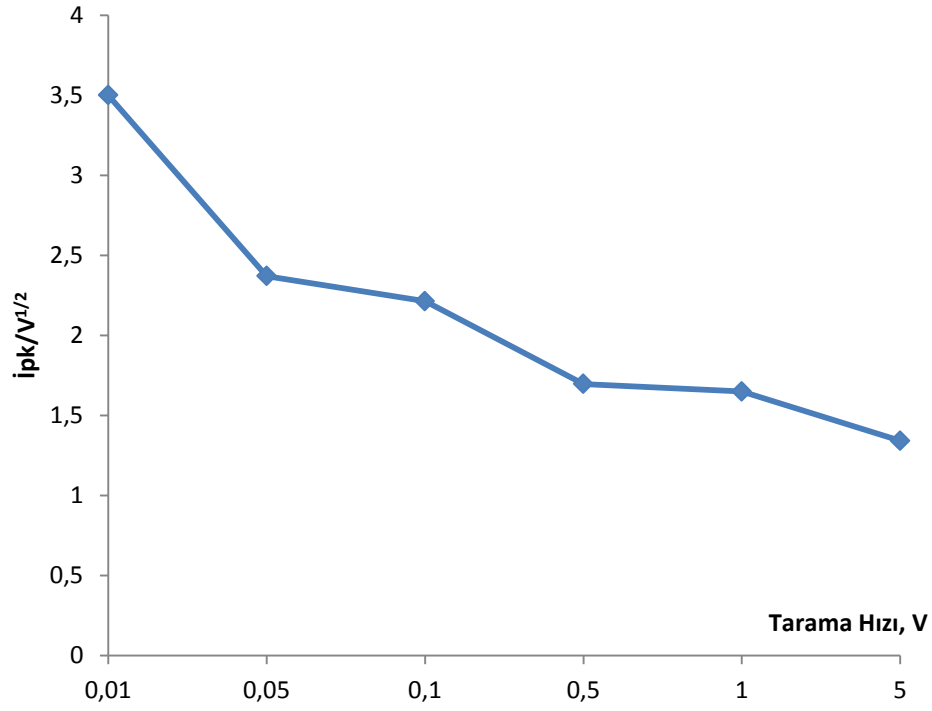


Şekil 4.8. TRS için log ipk – log v grafiği.

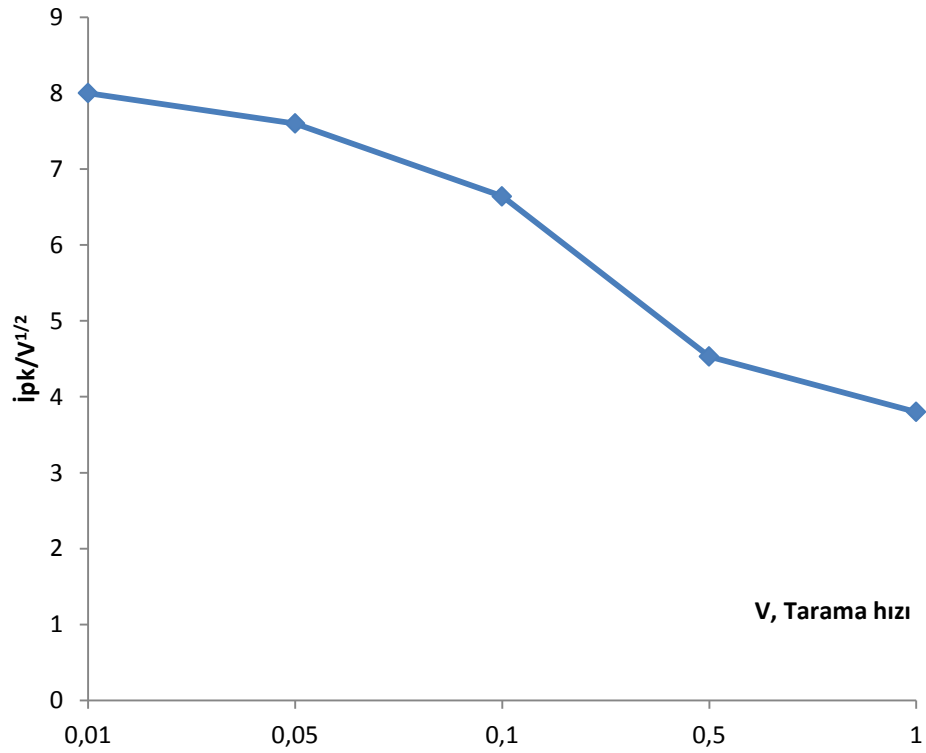
Grafiğe ait eğimin 0,5 değerine yakın olması, TRS maddesinin asılı cıva elektrot yüzeyinde indirgenmesinin difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir (Şekil 4.8).

4.1.3. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin elektrokimyasal indirgenme mekanizmasının tayini

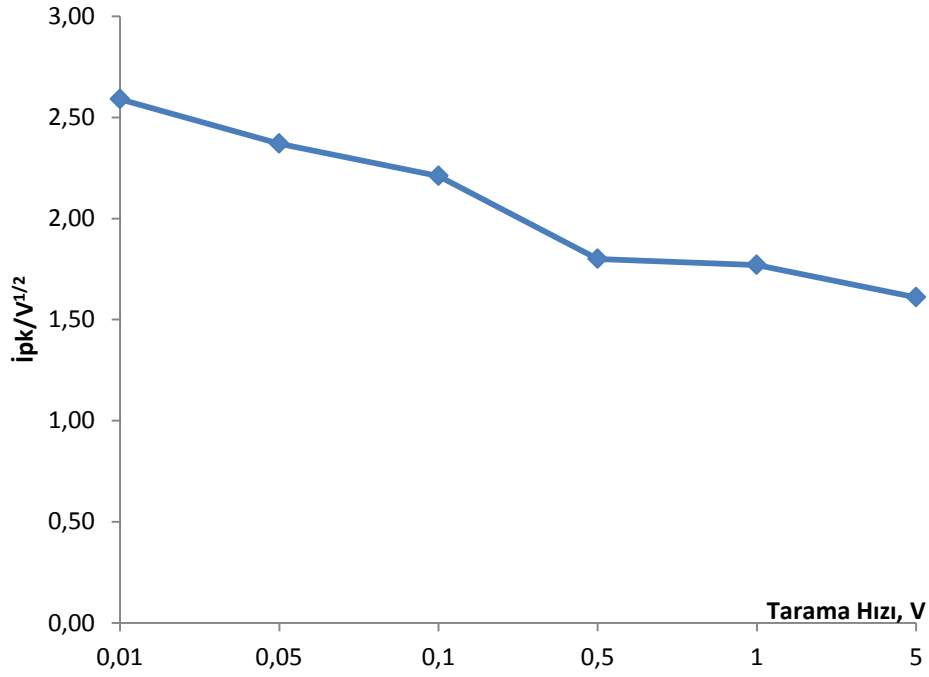
Elektrokimyasal indirgenme mekanizması, CV de, $(i_{pk}/v^{1/2})$ tarama hızına karşı çizilen grafiğinden tayin edilebilir. Tarama hızındaki artışa karşı $(i_{pk}/v^{1/2})$ grafiğinin (Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.) eğimindeki azalma EC indirgenme (elektrokimyasal–kimyasal) mekanizmasının göstergesidir.



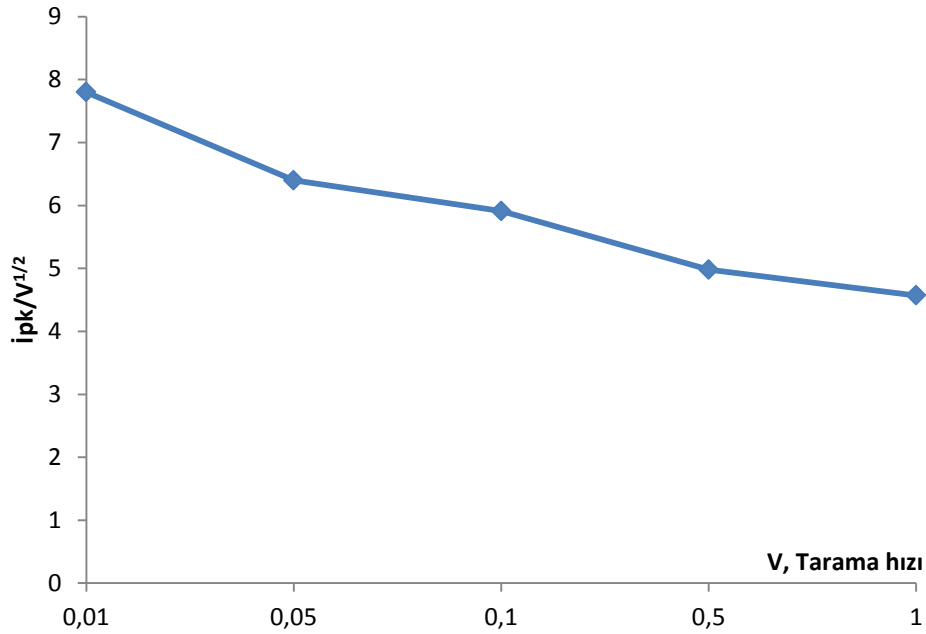
Şekil 4.9. TBM $i_{pk}/v^{1/2} - v$ grafiği.



Şekil 4.10. MSM $i_{pk}/v^{1/2} - v$ grafiği.



Şekil 4.11. TFS $i_{pk}/v^{1/2} - v$ grafiği.



Şekil 4.12. TRS $i_{pk}/v^{1/2} - v$ grafiği.

Yapılan çalışmalarda, maddelerin CV de tarama hızına karşı çizilen ($i_{pk}/v^{1/2}$) grafiklerine bakıldığında eğimdeki azalma, EC indirgenme (elektrokimyasal-kimyasal) mekanizmasının baskın olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla maddelerin indirgenmesi esnasında önce elektrokimyasal sonra kimyasal tepkime meydana gelmektedir.

4.1.4. Sulu ortamda TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin indirgenmesi esnasında transfer edilen elektron sayısı ve difüzyon katsayısının tayini

Maddelerin sulu ortamda Cottrell eğimlerini hesaplamak için dönüşümlü voltametri (CV) yöntemiyle Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'te belirlenen katodik piklerinin başlangıç ve bitiş potansiyel değerleri alınıp 25 mV'ta kronoamperometri (CA) ölçümleri yapıldı ve cottrell eğimleri hesaplandı. Daha sonra TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerin yükseltgenme ve indirgenmeleri esnasında transfer edilen elektron sayısı ve difüzyon katsayıları tayini için sınır akım değerleri tespit edildi ve değerler sırasıyla $3,20 \times 10^{-9}$, $7,14 \times 10^{-10}$, $9,10 \times 10^{-9}$, $8,52 \times 10^{-9}$ A bulundu. Bu değerler belirlenirken ultra platin mikro elektrotla dönüşümlü voltametri tekniği kullanıldı. Sulu ortamda pH:7,2 0,02 M fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) içerisinde inhibitör derişimi 1×10^{-4} M olacak şekilde ayarlandı, maddelerin sınır akımları ayrı ayrı belirlendi ve elde edilen değerler Çizelge 4.5.'te verildi.

Çizelge 4.5. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerin elektron sayısı, difüzyon katsayısı, sınır akımları ve cotrell eğimleri.

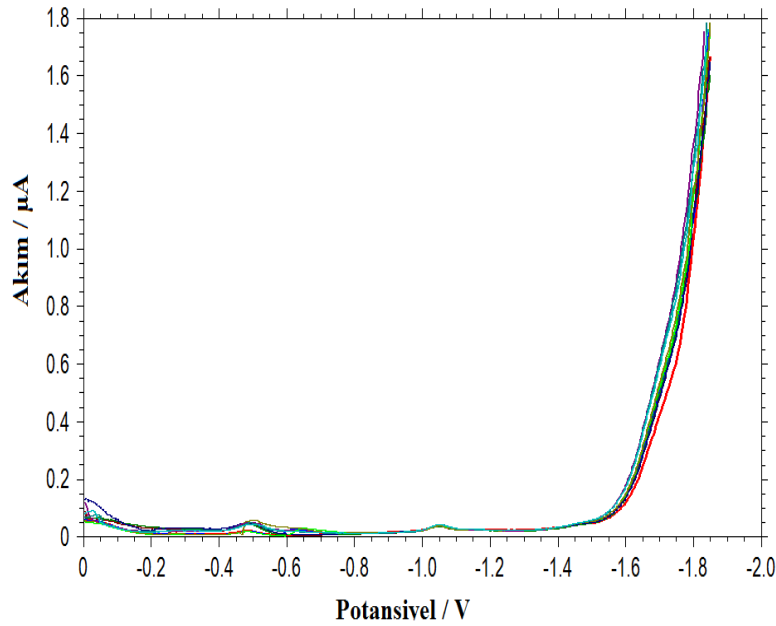
Maddeler	E_{pk} , (0,1 V/s)	Cottrell Eğimi, (S)	Sınır Akımı, (i, A)	Mol başına aktarılan elektron sayısı, (n)	Difüzyon katsayısı, (D, cm^2/s)
TBM	-1,86	$1,29 \times 10^{-6}$	$3,20 \times 10^{-9}$	1,23	$3,20 \times 10^{-6}$
MSM	-1,91	$6,40 \times 10^{-7}$	$7,14 \times 10^{-10}$	1,35	$5,63 \times 10^{-7}$
TFS	-1,65	$2,19 \times 10^{-6}$	$9,10 \times 10^{-9}$	1,26	$8,82 \times 10^{-6}$
TRS	-1,92	$1,85 \times 10^{-6}$	$8,52 \times 10^{-9}$	0,96	$1,11 \times 10^{-5}$

4.1.5. Sulu ortamda indirgenmiş glutatyon (GSH) için kalibrasyon grafiği, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırının (LOQ) belirlenmesi

Hücreye 10 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) ilave ettikten sonra sırayla 10 tarama olacak şekilde kare dalga voltametrisi yöntemiyle voltamogramlar alınarak belirlenen 10 artık akımın standart sapması ve ortalama değeri hesaplanarak Çizelge 4.6.'da verildi.

Çizelge 4.6. pH:7,2 fosfat tamponunun ($0,02 \text{ M H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) artık akım değerleri.

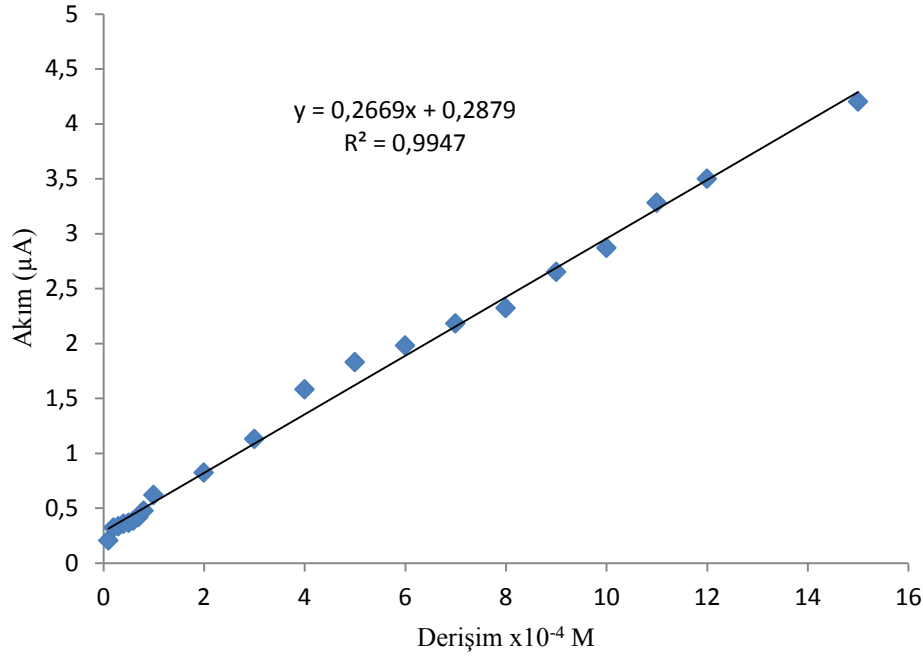
Tarama sayısı	Akım (nA)
1	1,91
2	1,33
3	1,55
4	1,56
5	3,08
6	3,91
7	5,16
8	4,96
9	3,80
10	5,28
Ortalama	3,22
Standart sapma	1,60



Şekil 4.13. pH:7,2 ($0,02 \text{ M H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) tamponunda 10 adet kare dalga voltamogramı.

Daha sonra hücre içerisine eklenen destek elektrolitin üzerine $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ - $1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ derişimlerinde indirgenmiş glutatyon (GSH) (ultra saf suyla hazırlanmış) ilave edilip kare dalga voltametrisi yöntemiyle ölçülen akımlara karşı derişim grafiği

oluşturuldu (Şekil 4.14). Elde edilen grafikte akımın derişimle doğrusal olarak arttığı noktalar belirlendi ve bu doğrusallığın olduğu yerlerin eğim değeri hesaplandı.



Şekil 4.14. İndirgenmiş glutatyon (GSH) kalibrasyon grafiği

$$C_{LOD} = 3s / m \quad (4.1)$$

$$C_{LOQ} = 10s / m \text{ veya } C_{LOQ} = 3 C_{LOD} \quad (4.2)$$

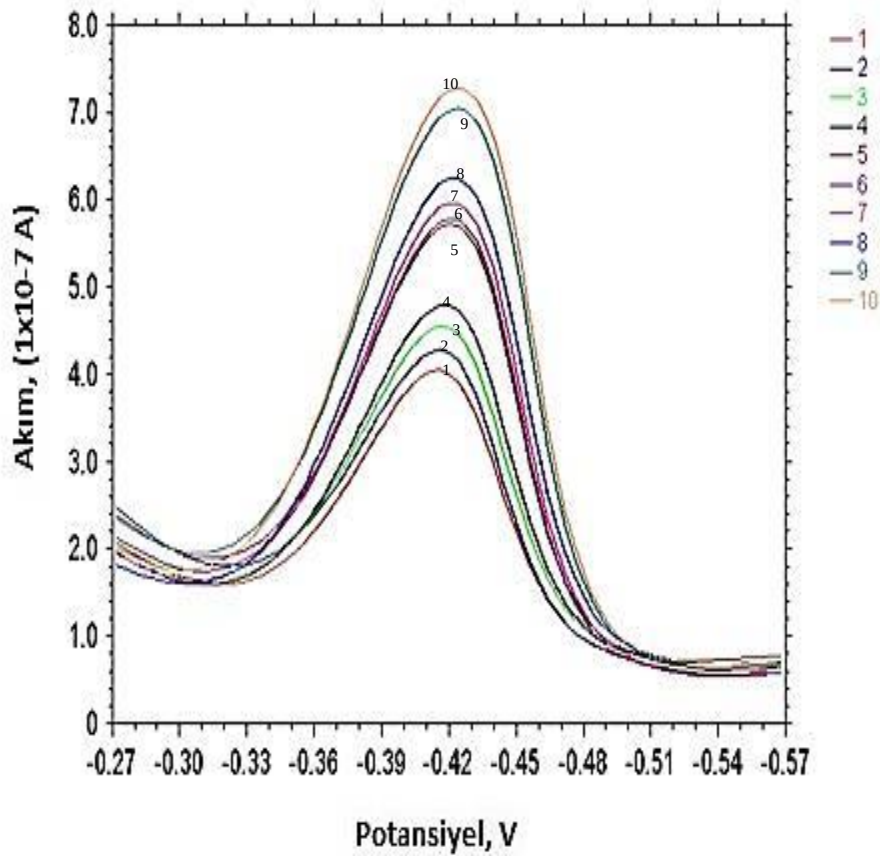
Kalibrasyon grafiğiyle elde edilen eğim Eşitlik 4.1.'de kullanıldı ve buradan gözlenebilme sınırı (C_{LOD}) hesaplandı. Daha sonra bulunan gözlenebilme sınırı değeri Eşitlik 4.2' te yerine konulup ve buradan da tayin sınırı (C_{LOQ}) elde edildi. Elde edilen C_{LOD} ve C_{LOQ} değerleri Çizelge 4.7.'de verildi.

Çizelge 4.7. Kalibrasyon grafiği eğim değeri, gözlenebilme ve tayin sınır değerleri.

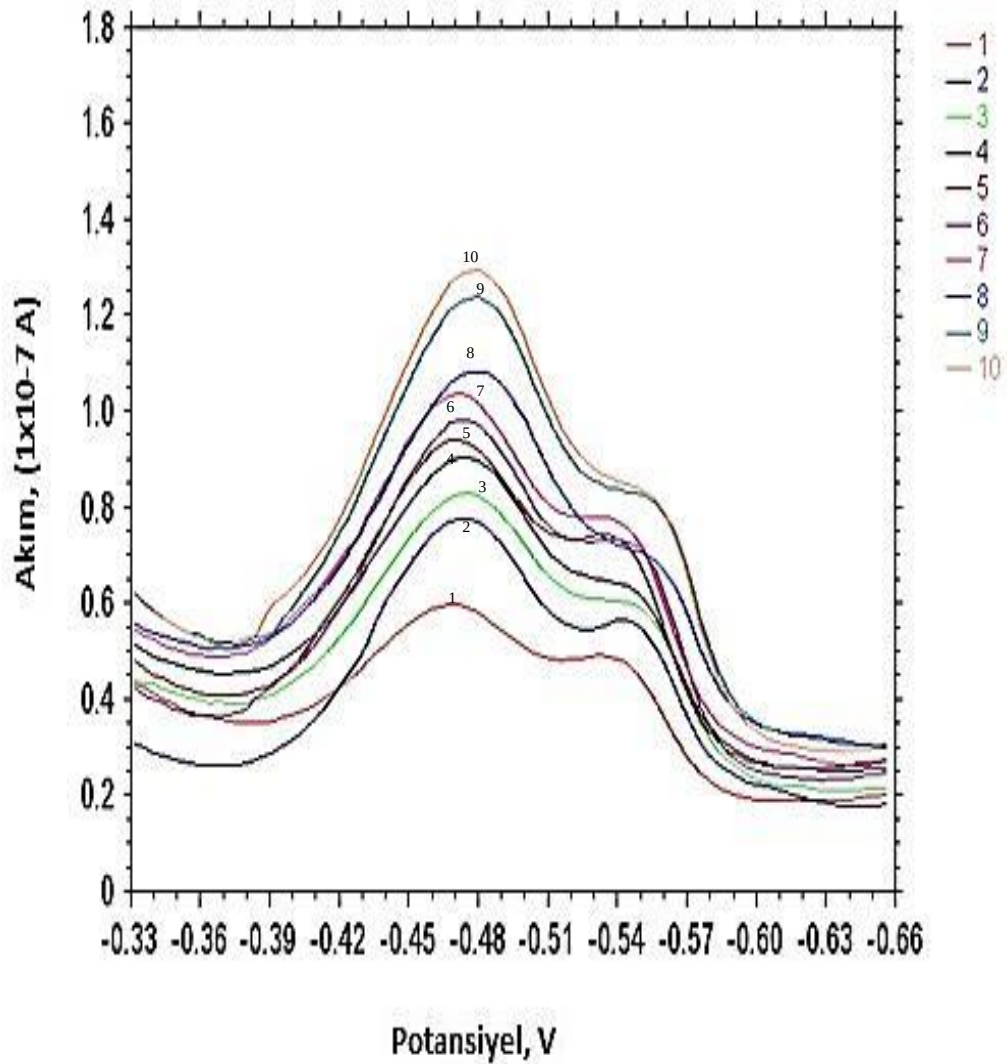
Kalibrasyon grafiği eğimi	Gözlenebilme sınır değeri (C_{LOD}) (mol/L)	Tayin sınır değeri (C_{LOQ}) (mol/L)
0,2669	$(1,798 \pm 0,002) \times 10^{-6}$	$(5,995 \pm 0,005) \times 10^{-6}$

4.2. Enzim İnhibisyonu

TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin enzim inhibisyon mekanizmasını belirlemek için GSH pik akımındaki artış takip edildi. Hücrede 4×10^{-5} M GSSG, 1×10^{-5} M NADPH ve 0,5 unit enzim(GR) varlığında kare dalga voltamogramları alınmıştır. Ard arda 30 s aralıklarla alınan 10 kare dalga voltamogramlarıyla elde edilen GSH pik akımındaki artış Şekil 4.15'te gösterilmektedir. Ayrıca hücrede 4×10^{-5} M GSSG, 1×10^{-5} M NADPH, 4×10^{-5} M TBM ve 0,5 unit enzim(GR) varlığında kare dalga voltamogramları alınmıştır. Ard arda 30 s aralıklarla alınan 10 kare dalga voltamogramlarıyla elde edilen GSH pik akımındaki artış Şekil 4.16'da gösterilmektedir. Reaksiyon sonunda oluşan GSH voltamogramları incelendiğinde TBM'siz ortamdaki GSH piklerinin, 4×10^{-5} M TBM ortamdaki GSH piklerinden yüksek akım değerlerine ulaştığı görülmektedir. TBM'siz ortamda oluşan GSH akımlarının, TBM'li ortamda oluşan GSH akımlarından daha yüksek olması, TBM maddesinin GR inhibisyonunu gerçekleştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.15. Tepkime sonucunda oluşan GSH'ın 30 s aralıklarla alınmış 10 kare dalga voltamogramı



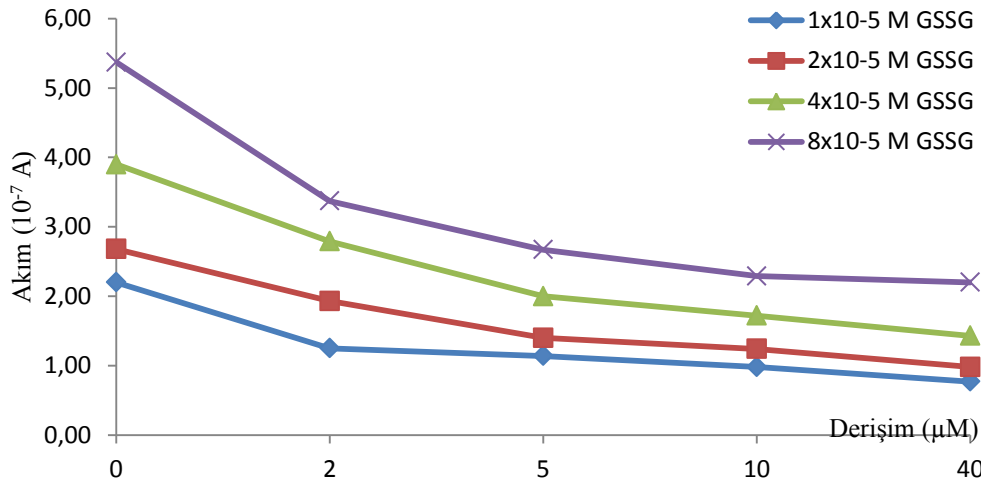
Şekil 4.16. Tepkime sonucunda oluşan GSH'nin 4×10^{-5} M TBM maddesi içeren ortamda 30 s aralıklarla alınmış 10 kare dalga voltamogramı

4.2.1. TBM maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi

Glutasyon redüktaz enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH: 7,2 fosfat tamponu 100 μ L 1×10^{-3} M NADPH ve 100 μ L 1×10^{-3} M GSSG (substrat) ve 0,5 unit enzim için 167 unit enzim çözeltisinden 30 μ L enzim eklenerek her 30 s de bir olmak üzere 10 kez kare dalga voltamogramları alındı. Aynı işlem enzim çözeltisi eklemeyen önce 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M 4×10^{-5} M TBM çözeltisi eklenerek tekrarlandı. TBM maddesinin dört farklı GSSG derişimi için IC_{50} değeri hesaplandı. Her bir GSSG derişimi için tespit edilen ortalama akım değerleri Çizelge 4.8'de verildi.

Çizelge 4.8. Dört farklı TBM ve GSSG derişimindeki ortalama akım değerleri.

TBM derişimi(mol/L) GSSG derişimi(mol/L)	0	2×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	4×10^{-5}
	Akım(1×10^{-7} A)				
1×10^{-5}	1,971 $\pm$ 0,23	1,249 $\pm$ 0,42	1,168 $\pm$ 0,11	0,982 $\pm$ 0,10	0,767 $\pm$ 0,13
2×10^{-5}	2,583 $\pm$ 0,22	1,933 $\pm$ 0,23	1,411 $\pm$ 0,16	1,243 $\pm$ 0,27	0,978 $\pm$ 0,10
4×10^{-5}	3,904 $\pm$ 0,41	2,794 $\pm$ 0,33	2,012 $\pm$ 0,36	1,723 $\pm$ 0,18	1,432 $\pm$ 0,23
8×10^{-5}	5,372 $\pm$ 0,50	3,371 $\pm$ 0,13	2,673 $\pm$ 0,29	2,291 $\pm$ 0,28	2,201 $\pm$ 0,22

Şekil 4.17. TBM için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.

Dört farklı GSSG miktarı için IC_{50} değerleri aşığıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.9. TBM için farklı GSSG derişimlerindeki IC_{50} değerleri.

GSSG derişimi (mol/L)	1×10^{-5}	2×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-5}	Ortalama IC_{50} (mol/L)
IC_{50} (mol/L)	$5,20 \times 10^{-6}$	$4,90 \times 10^{-6}$	$4,60 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$(4,90 \pm 0,22) \times 10^{-6}$

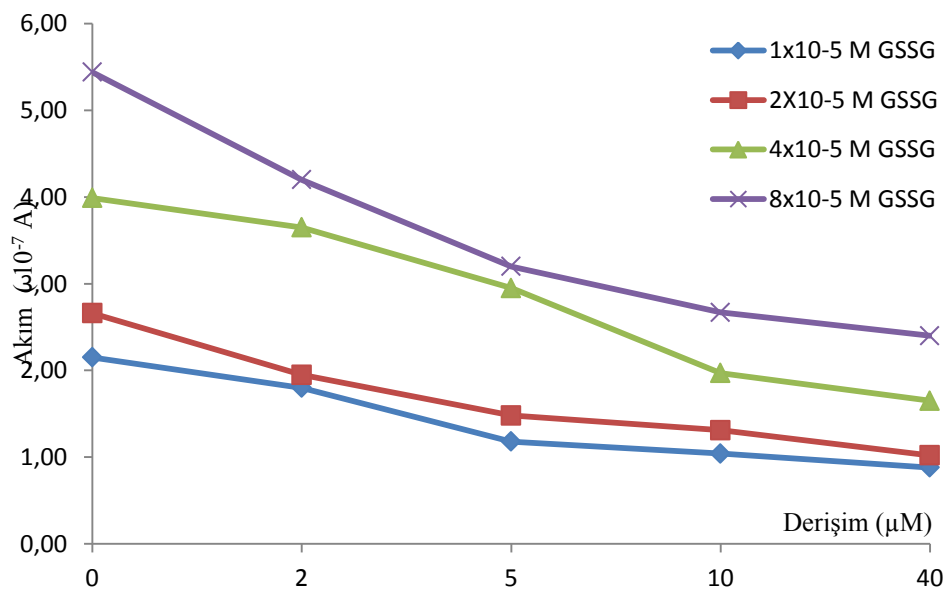
Farklı TBM derişimlerinde belirlenen TBM' in ortalama IC_{50} değeri $(4,90 \pm 0,22) \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiştir.

4.2.2. MSM maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi

Glutasyon redüktaz enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH:7,2 fosfat tamponu 100 μL 1×10^{-3} M NADPH ve 100 μL 1×10^{-3} M GSSG (substrat) ve 0,5 unit enzim için 167 unit enzim çözeltisinden 30 μL enzim çözeltisi eklenerek her 30 s de bir olmak üzere 10 kez kare dalga voltamogramı alındı. Aynı işlem enzim çözeltisi eklemeyen önce 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 4×10^{-5} M MSM çözeltisi eklenerek tekrarlandı. MSM maddesinin dört farklı GSSG derişimi için IC_{50} değeri hesaplandı. Her bir GSSG derişimi için tespit edilen ortalama akım değerleri Çizelge 4.10'da verildi.

Çizelge 4.10. Dört farklı MSM ve GSSG derişimindeki ortalama akım değerleri.

MSM derişimi(mol/L) GSSG Derişimi(mol/L)	0	2×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	4×10^{-5}
n=10	Akım(1×10^{-7} A)				
1×10^{-5}	2,151 $\pm$ 0,26	1,231 $\pm$ 0,39	1,179 $\pm$ 0,14	1,042 $\pm$ 0,14	0,885 $\pm$ 0,10
2×10^{-5}	2,664 $\pm$ 0,23	1,953 $\pm$ 0,29	1,478 $\pm$ 0,16	1,309 $\pm$ 0,38	1,023 $\pm$ 0,12
4×10^{-5}	3,991 $\pm$ 0,45	2,952 $\pm$ 0,20	2,139 $\pm$ 0,27	1,970 $\pm$ 0,19	1,652 $\pm$ 0,21
8×10^{-5}	5,443 $\pm$ 0,54	3,196 $\pm$ 0,34	2,847 $\pm$ 0,24	2,670 $\pm$ 0,18	2,397 $\pm$ 0,16



Şekil 4.18. MSM için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.

Dört farklı GSSG miktarı için IC_{50} değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.11. MSM için farklı GSSG derişimlerindeki IC_{50} değerleri.

GSSG derişimi (mol/L)	1×10^{-5}	2×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-5}	Ortalama IC_{50} (mol/L)
IC_{50} (mol/L)	$9,70 \times 10^{-6}$	$9,80 \times 10^{-6}$	$9,90 \times 10^{-6}$	$9,60 \times 10^{-6}$	$(9,75 \pm 0,13) \times 10^{-6}$

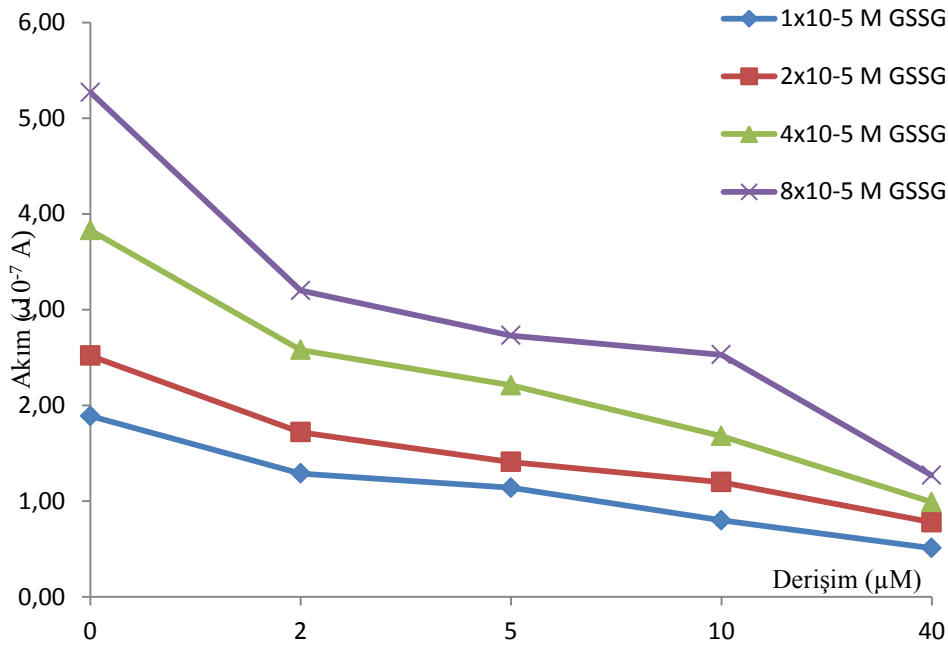
Farklı MSM derişimlerinde belirlenen MSM'nin ortalama IC_{50} değeri $(9,75 \pm 0,13) \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirlenmiştir.

4.2.3. TFS maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametrisiyle belirlenmesi

Glutatyon redüktaz enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH:7,2 fosfat tamponu 100 μ L 1×10^{-3} M NADPH ve 100 μ L 1×10^{-3} M GSSG (substrat) ve 0,5 unit enzim için 167 unit enzim çözeltisinden 30 μ L enzim çözeltisi eklenerek her 30 s de bir olmak üzere 10 kez kare dalga voltamogramı alındı. Aynı işlem enzim çözeltisi eklemeyen önce 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 4×10^{-5} M TFS çözeltisi eklenerek tekrarlandı. TFS maddesinin dört farklı GSSG derişimi için IC_{50} değeri hesaplandı. Her bir GSSG derişimi için tespit edilen ortalama akım değerleri Çizelge 4.12'de verildi.

Çizelge 4.12. Dört farklı TFS ve GSSG derişimlerindeki ortalama akım değerleri.

TFS derişimi (mol/L) GSSG Derişimi (mol/L)	0	2×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	4×10^{-5}
n=10	Akım(1×10^{-7} A)				
1×10^{-5}	1,893 $\pm$ 0,18	1,288 $\pm$ 0,41	1,143 $\pm$ 0,11	0,801 $\pm$ 0,64	0,513 $\pm$ 0,66
2×10^{-5}	2,521 $\pm$ 0,22	1,718 $\pm$ 0,11	1,411 $\pm$ 0,17	1,203 $\pm$ 0,86	0,779 $\pm$ 0,59
4×10^{-5}	3,829 $\pm$ 0,40	2,584 $\pm$ 0,19	2,209 $\pm$ 0,37	1,679 $\pm$ 0,16	1,133 $\pm$ 0,16
8×10^{-5}	5,274 $\pm$ 0,59	3,199 $\pm$ 0,36	2,732 $\pm$ 0,53	2,533 $\pm$ 0,34	1,967 $\pm$ 0,27



Şekil 4.19. TFS için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.

Dört farklı GSSG miktarı için IC_{50} değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.13. TFS için farklı GSSG derişimlerin deki IC_{50} değerleri.

GSSG derişimi (mol/L)	1×10^{-5}	2×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-5}	Ortalama IC_{50} (mol/L)
IC_{50} (mol/L)	$7,60 \times 10^{-6}$	$8,30 \times 10^{-6}$	$7,70 \times 10^{-6}$	$7,50 \times 10^{-6}$	$(7,78 \pm 0,36) \times 10^{-6}$

Farklı TFS derişimlerin de belirlenen TFS'nin ortalama IC_{50} değeri $(7,78 \pm 0,36) \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirlenmiştir.

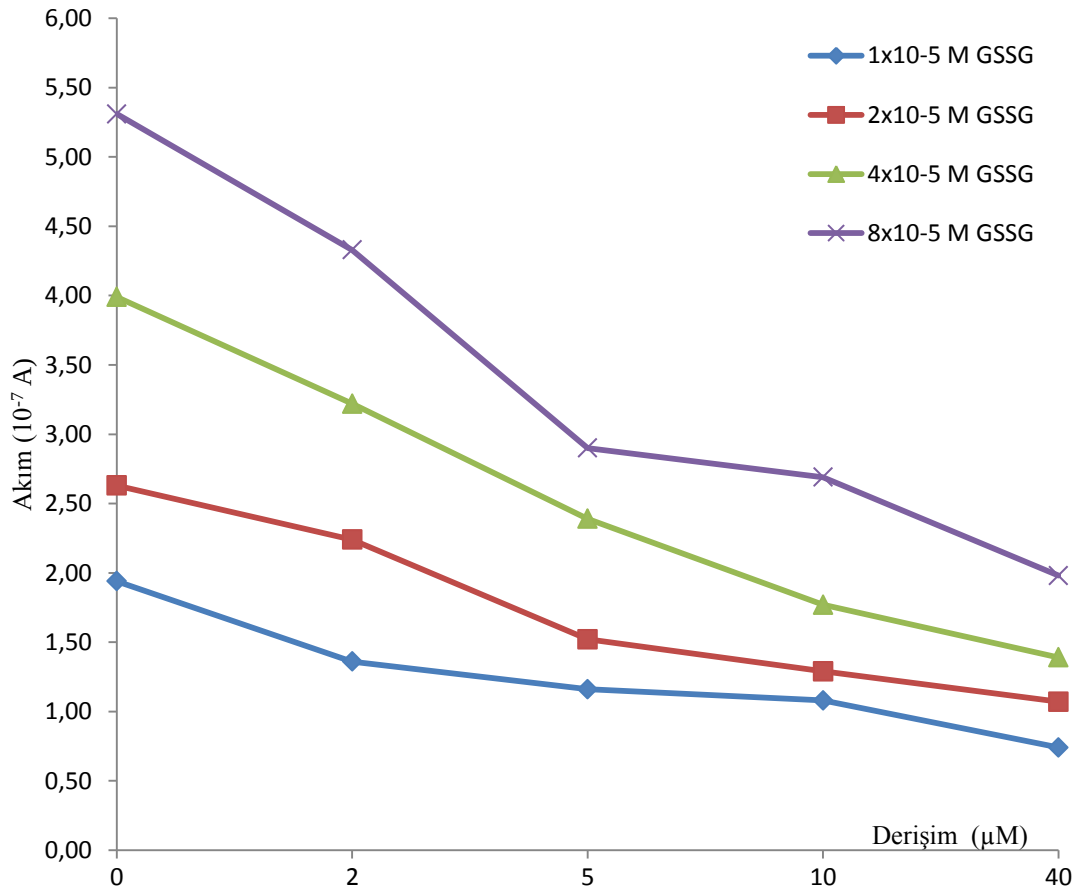
4.2.4. TRS maddesinin enzim inhibisyonunun kare dalga voltametriyle belirlenmesi

Glutasyon redüktaz enzim aktivite tayini için hücreye 10 mL pH:7,2 fosfat tamponu 100 µL 1×10^{-3} M NADPH ve 100 µL 1×10^{-3} M GSSG (substrat) ve 0,5 unit enzim için 167 unit enzim çözeltisinden 30 µL enzim çözeltisi eklenerek her 30 s de bir olmak üzere 10 kez kare dalga voltamogramı alındı. Aynı işlem enzim çözeltisi eklemeyen önce 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 4×10^{-5} M TRS çözeltisi eklenerek tekrarlandı.. TRS maddesinin dört

farklı GSSG derişimi için IC_{50} değeri hesaplandı. Her bir GSSG derişimi için tespit edilen ortalama akım değerleri Çizelge 4.14'te verildi.

Çizelge 4.14. Dört farklı TRS ve GSSG derişimlerindeki ortalama akım değerleri.

TRS derişimi(mol/L) GSSG derişimi (mol/L)	0	2×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	4×10^{-5}
n=10	Akım(1×10^{-7} A)				
1×10^{-5}	1,936±0,30	1,361±0,45	1,163±0,12	1,083±0,13	0,742±0,10
2×10^{-5}	2,629±0,26	2,038±0,20	1,522±0,13	1,287±0,11	1,071±0,21
4×10^{-5}	3,991±0,47	2,792±0,23	2,391±0,15	1,771±0,24	1,386±0,23
8×10^{-5}	5,312±0,50	3,414±0,24	2,901±0,14	2,689±0,22	1,979±0,25



Şekil 4.20. TRS için 1×10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} , 8×10^{-5} mol/L GSSG için IC_{50} grafiği.

Dört farklı GSSG miktarı için IC_{50} değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 4.15. TRS için farklı GSSG derişimlerindeki IC₅₀ değerleri.

GSSG derişimi mol/L	1×10^{-5}	2×10^{-5}	4×10^{-5}	8×10^{-5}	Ortalama IC ₅₀ (mol/L)
IC ₅₀ (mol/L)	$8,00 \times 10^{-6}$	$8,50 \times 10^{-6}$	$7,70 \times 10^{-6}$	$9,00 \times 10^{-6}$	$(8,30 \pm 0,57) \times 10^{-6}$

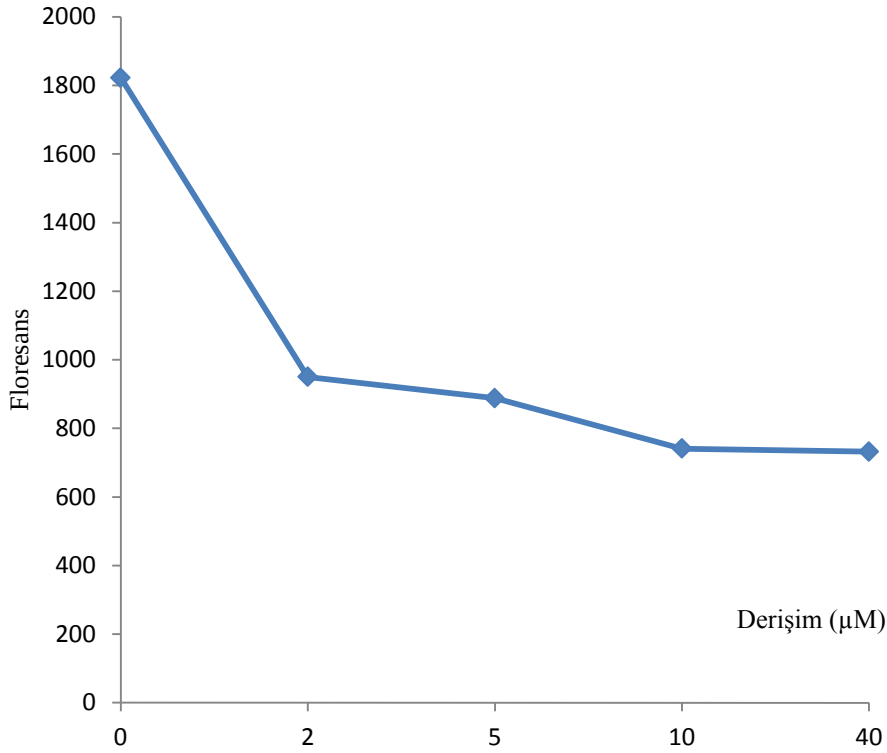
Farklı TRS derişimlerin de belirlenen TRS'nin ortalama IC₅₀ değeri $(8,30 \pm 0,57) \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirlenmiştir.

4.2.5 TBM maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi

TBM maddesinin IC₅₀ değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlemek için hücreye 160 µL 1×10^{-3} M GSSG, 80 µL 1×10^{-3} M NADPH, 0,5 unit enzim çözeltisi için 30 µL 167 unit enzim çözeltisinden ve 3,730 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) eklendikten sonra 30 s aralıklarla ard arda 5 kere 340 nm ile 550 nm arasında spektrumlar alındı. Oluşan indirgenmiş glutatyonun(GSH) emisyon piki standart glutatyon eklemeleri ile tespit edildi. Bu işlem farklı inhibitör derişimlerin de tekrarlandı. Bu işlemler hücrede 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M TBM varlığında da tekrarlandı.

Çizelge 4.16. TBM için farklı madde derişimlerindeki ortalama floresans değerleri.

TBM derişimi mol/L	Floresans
0	1822±15
2×10^{-6}	1157±91
5×10^{-6}	1077±94
1×10^{-5}	741±28
4×10^{-5}	732±34



Şekil 4.21. TBM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı.

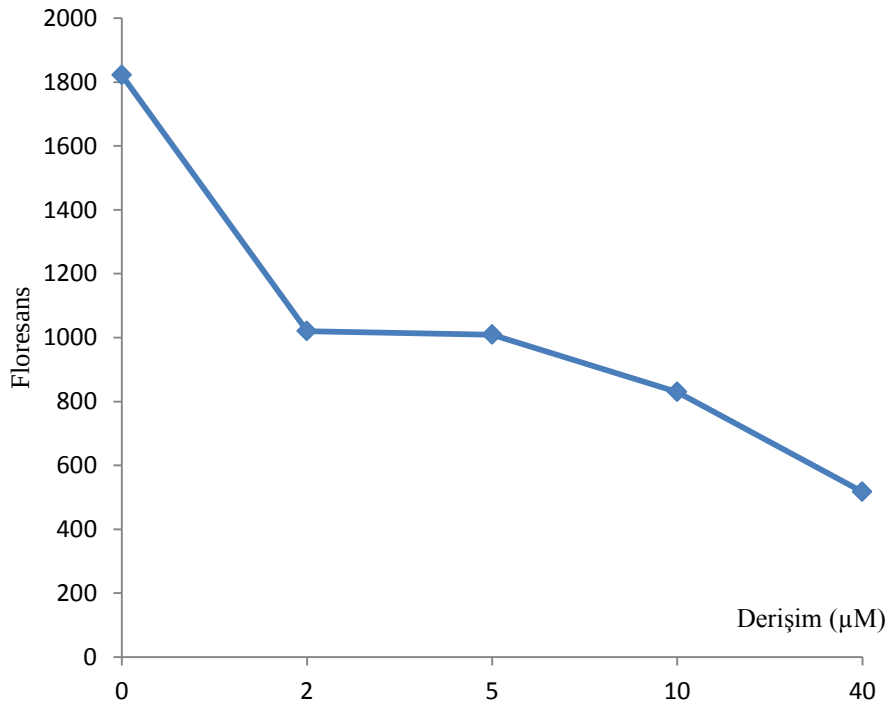
TBM maddesinin 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) varlığında 340-550 nm arasındaki spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti-inhibitör derişimi grafiğinden IC_{50} değeri $3,50 \times 10^{-6}$ M olarak belirlendi.

4.2.6 MSM maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi

MSM maddesinin IC_{50} değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlemek için hücreye 160 µL 1×10^{-3} M GSSG, 80 µL 1×10^{-3} M NADPH, 0,5 unit enzim çözeltisi için 30 µL 167 unit enzim çözeltisinden ve 3,730 mL 0,02 M pH:7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) eklendikten sonra 30 s aralıklarla 340-550 nm arasında spektrumlar alındı. Oluşan indirgenmiş glutatyonun(GSH) emisyon piki standart glutatyon eklemeleri ile tespit edildi. Bu işlem farklı inhibitör derişimlerin de tekrarlandı. Bu işlemler hücrede 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M MSM varlığında da tekrarlandı.

Çizelge 4.17. MSM için farklı madde derişimleriindeki ortalama floresans değeri.

MSM derişimi mol/L	Floresans
0	1822±15
2×10^{-6}	1019±161
5×10^{-6}	1009±77
1×10^{-5}	730±17
4×10^{-5}	517±23



Şekil 4.22. MSM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiği.

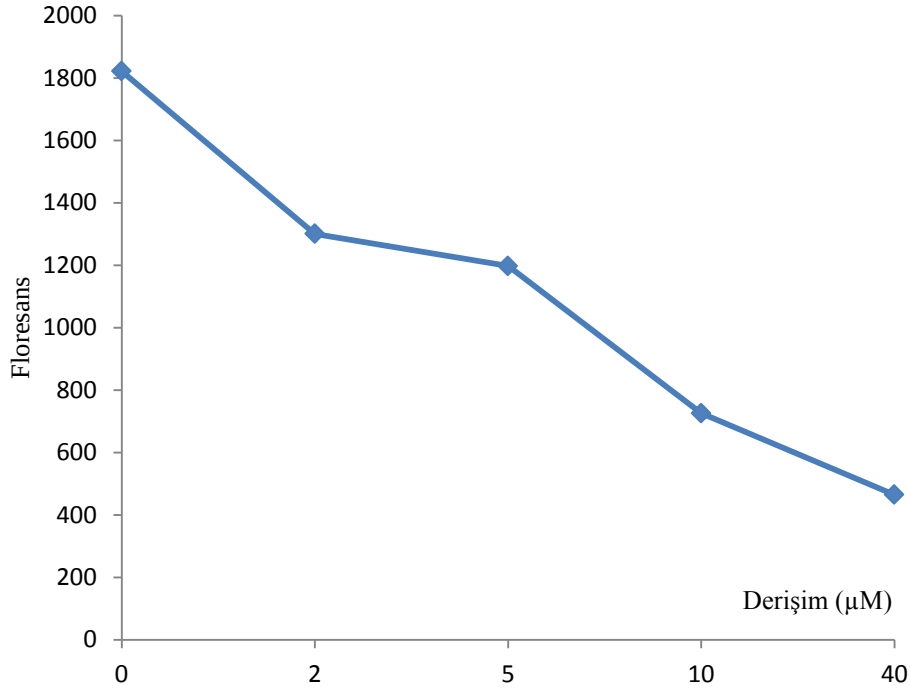
MSM maddesinin 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) varlığında 340–550 nm arasındaki spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti-inhibitör derişimi grafiğinden IC_{50} değeri $7,35 \times 10^{-6}$ M olarak belirlendi.

4.2.7 TFS maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi

TFS maddesinin IC_{50} değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlemek için hücreye 160 μ L 1×10^{-3} M GSSG, 80 μ L 1×10^{-3} M NADPH, 0,5 unit enzim çözeltisi için 30 μ L 167 unit enzim çözeltisinden ve 3,730 mL 0,02 M pH:7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) eklendikten sonra 30 s aralıklarla 340-550 nm arasında spektrumlar alındı. Oluşan indirgenmiş glutatyonun(GSH) emisyon piki standart glutatyon eklemeleri ile tespit edildi. Bu işlem farklı inhibitör derişimlerin de tekrarlandı. Bu işlemler hücrede 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M TFS varlığında da tekrarlandı.

Çizelge 4.18. TFS için farklı madde derişimlerindeki ortalama floresans değerleri.

TFS derişimi mol/L	Floresans
0	1822±15
2×10^{-6}	1301±72
5×10^{-6}	1198±29
1×10^{-5}	726±16
4×10^{-5}	465±28



Şekil 4.23. TFS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı.

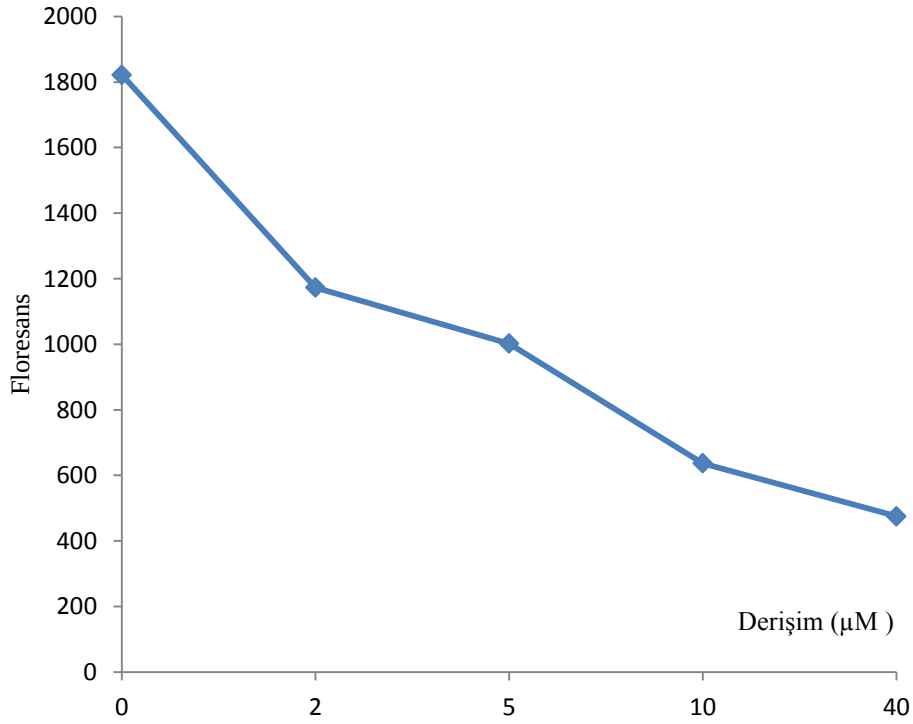
TFS maddesinin 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) varlığında 340–550 nm arasındaki spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti-inhibitör derişimi grafiğınden IC_{50} değeri $7,70 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirlendi.

4.2.8 TRS maddesinin enzim inhibisyonunun floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmesi

TRS maddesinin IC_{50} değerlerinin floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlemek için hücreye 160 µL 1×10^{-3} M GSSG, 80 µL 1×10^{-3} M NADPH, 0,5 unit enzim çözeltisi için 30 µL 167 unit enzim çözeltisinden ve 3,730 mL 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) eklendikten sonra 30 s aralıklarla 340-550 nm arasında spektrumlar alındı. Oluşan indirgenmiş glutatyonun(GSH) emisyon piki standart glutatyon eklemeleri ile tespit edildi. Bu işlemler hücrede 2×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M ve 4×10^{-5} M TRS varlığında da tekrarlandı.

Çizelge 4.19. TRS için farklı madde derişimleriindeki ortalama floresans değeri.

TRS derişimi mol/L	Floresans
0	1822±15
2×10^{-6}	1173±73
5×10^{-6}	1002±15
1×10^{-5}	637±19
4×10^{-5}	475±87

Şekil 4.24. TRS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L derişimleri için IC_{50} grafiğı.

TRS maddesinin 0,02 M pH: 7,2 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) varlığında 340–550 nm arasındaki spektrumlarından elde edilen floresans şiddeti-inhibitör derişimi grafiğınden IC_{50} değeri $6,85 \times 10^{-6}$ mol/L olarak belirlendi.

Çizelge 4.20. Maddelerin kare dalga ve floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenen IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.

İnhibitör	IC ₅₀ (Kare dalga voltametrisi) mol/L	IC ₅₀ (Floresans spektroskopisi) mol/L	K _i (Kare dalga voltametrisi)	K _i (Floresans spektroskopisi)
TBM	$4,90 \times 10^{-6}$	$3,50 \times 10^{-6}$	$2,54 \times 10^{-6}$	$1,82 \times 10^{-6}$
MSM	$9,75 \times 10^{-6}$	$7,35 \times 10^{-6}$	$6,54 \times 10^{-6}$	$4,93 \times 10^{-6}$
TFS	$7,78 \times 10^{-6}$	$7,70 \times 10^{-6}$	$4,69 \times 10^{-6}$	$4,64 \times 10^{-6}$
TRS	$8,30 \times 10^{-6}$	$6,85 \times 10^{-6}$	$4,02 \times 10^{-6}$	$3,32 \times 10^{-6}$

4.2.9. Enzim için inhibitörsüz ortamda ve farklı inhibitör derişimlerinde Km ve Vmaks değerlerinin hesaplanması

TBM için farklı derişimlerde Km ve Vmaks hesaplamaları

Enzim için substrat derişimi ve zamana karşı ölçülen akım değerlerinden hesaplanan hız değerleri Çizelge 4.21.'da verildi.

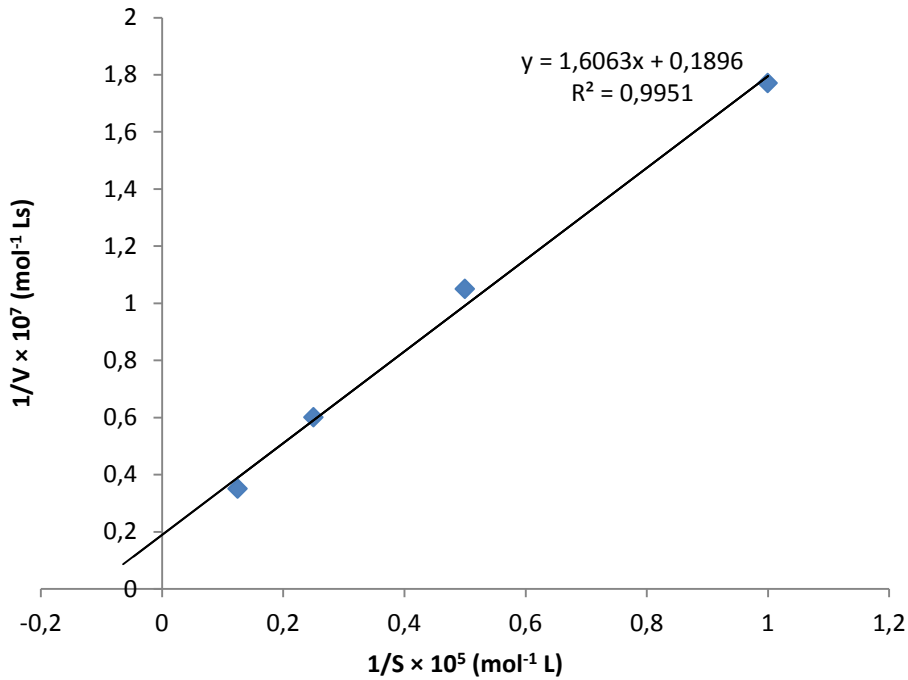
Çizelge 4.21. TBM için 1/S ve 1/Vmaks değerleri.

TBM derişimi mol/L	GSSG derişimi (substrat) Mol/L	Hız Vmaks Mol/L.s	1/S (10 ⁴) L/mol	1/Vmaks (10 ⁷) L.s/mol
0	1×10^{-5}	$5,64 \times 10^{-8}$	1,000	1,77
	2×10^{-5}	$9,49 \times 10^{-8}$	0,500	1,05
	4×10^{-5}	$1,65 \times 10^{-7}$	0,250	0,60
	8×10^{-5}	$2,90 \times 10^{-7}$	0,125	0,35
2×10^{-6}	1×10^{-5}	$3,88 \times 10^{-8}$	1,000	2,58
	2×10^{-5}	$5,62 \times 10^{-8}$	0,500	1,78
	4×10^{-5}	$8,54 \times 10^{-8}$	0,250	1,17
	8×10^{-5}	$1,27 \times 10^{-7}$	0,125	0,88

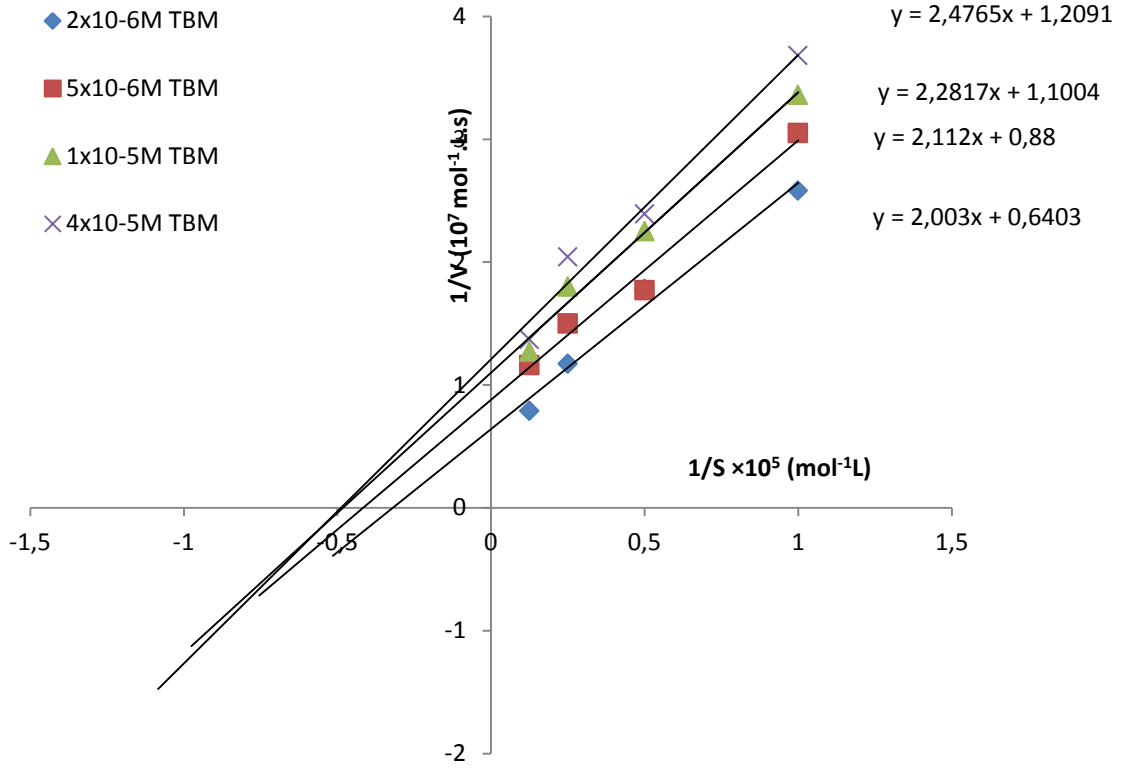
Çizelge 4.21. (Devamı) TBM için $1/S$ ve $1/V_{\text{maks}}$ değerleri.

5×10^{-6}	1×10^{-5}	$3,28 \times 10^{-8}$	1,000	3,05
	2×10^{-5}	$5,65 \times 10^{-8}$	0,500	1,77
	4×10^{-5}	$6,66 \times 10^{-8}$	0,250	1,50
	8×10^{-5}	$8,704 \times 10^{-8}$	0,125	1,16
1×10^{-5}	1×10^{-5}	$2,98 \times 10^{-8}$	1,000	3,36
	2×10^{-5}	$4,45 \times 10^{-8}$	0,500	2,25
	4×10^{-5}	$5,56 \times 10^{-8}$	0,250	1,80
	8×10^{-5}	$7,89 \times 10^{-8}$	0,125	1,27
4×10^{-5}	1×10^{-5}	$2,72 \times 10^{-8}$	1,000	3,68
	2×10^{-5}	$4,18 \times 10^{-8}$	0,500	2,39
	4×10^{-5}	$4,90 \times 10^{-8}$	0,250	2,04
	8×10^{-5}	$7,31 \times 10^{-8}$	0,125	1,37

Lineweaver-Burk grafiğine göre, doğrunun x eksenini ($-1/K_m$) ve y eksenini ($1/V_{\text{maks}}$) kestiği noktalardan yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. K_m ve V değerleri için Lineweaver-Burk grafikleri inhibitörsüz ortam için Şekil 4.25.'te, farklı inhibitör derişimleri için Şekil 4.26.'da verildi.



Şekil 4.25. TBM için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.26. TBM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.

Çizelge 4.22. TBM için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve hız (Vmaks) değerleri.

TBM Derişimi mol/L	Km (mol/L)	Vmaks mol/L.s
0	$8,47 \times 10^{-5}$	$5,27 \times 10^{-7}$
2×10^{-6}	$3,13 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	$2,41 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-7}$
1×10^{-5}	$2,29 \times 10^{-5}$	$9,98 \times 10^{-8}$
4×10^{-5}	$2,04 \times 10^{-5}$	$8,83 \times 10^{-8}$

İnhibitör derişimi arttıkça Michaelis-Menten sabiti (Km) değerleri ve hız (Vmaks) azalmıştır. Bu durum gerçekleşen inhibisyonun, yarışmasız (unkompetitif) inhibisyon şeklinde gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.22).

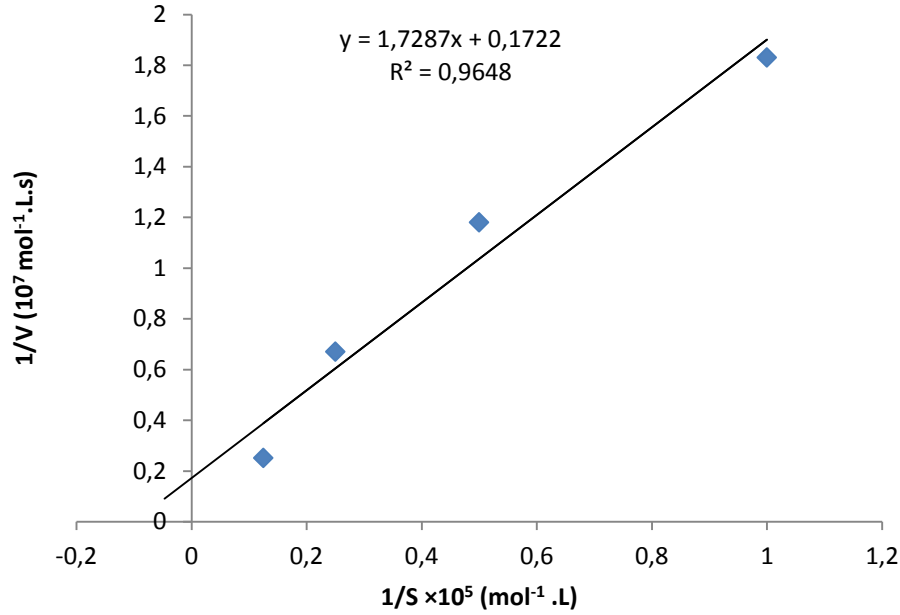
MSM için farklı derişimlerde Km ve Vmaks hesaplamaları

Enzim için substrat derişimi ve zamana karşı ölçülen akım değerlerinden hesaplanan hız değerleri Çizelge 4.23.'te verildi.

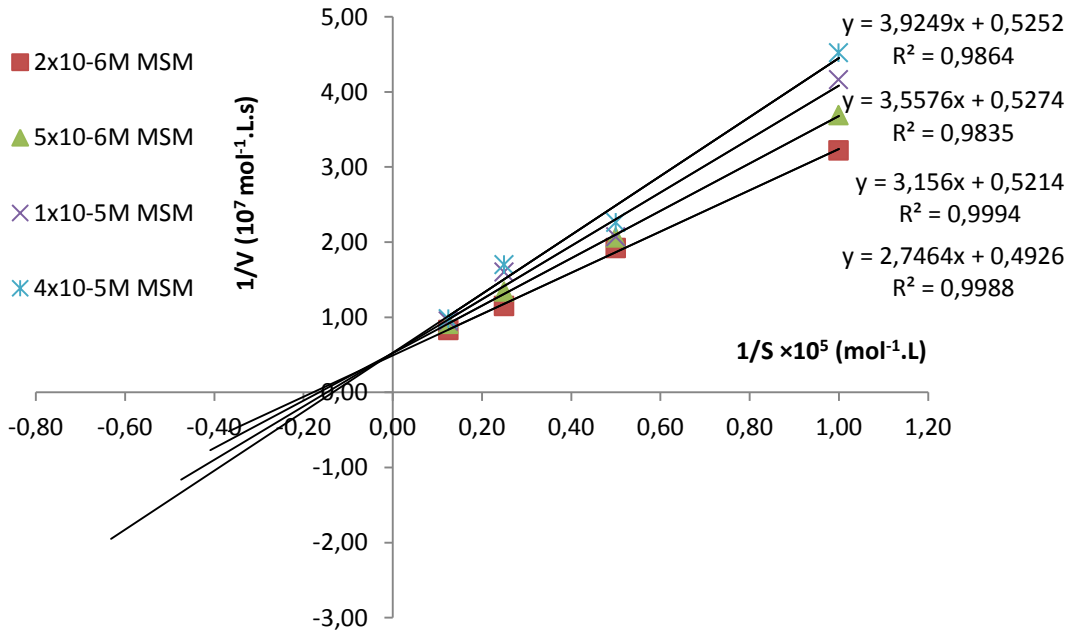
Çizelge 4.23. MSM için 1/S ve 1/Vmaks değerleri.

MSM derişimi mol/L	GSSG derişimi (substrat) mol/L	Hız Vmaks Mol/L.s	1/S (10 ⁴) L/mol	1/Vmaks (10 ⁷) L.s/mol
0	1×10 ⁻⁵	5,45×10 ⁻⁸	1,000	1,83
	2×10 ⁻⁵	8,46×10 ⁻⁸	0,500	1,18
	4×10 ⁻⁵	1,49×10 ⁻⁷	0,250	0,67
	8×10 ⁻⁵	3,97×10 ⁻⁷	0,125	0,25
2×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	3,11×10 ⁻⁸	1,000	3,22
	2×10 ⁻⁵	5,20×10 ⁻⁸	0,500	1,92
	4×10 ⁻⁵	8,73×10 ⁻⁸	0,250	1,15
	8×10 ⁻⁵	1,20×10 ⁻⁷	0,125	0,83
5×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	2,70×10 ⁻⁸	1,000	3,69
	2×10 ⁻⁵	4,85×10 ⁻⁸	0,500	2-06
	4×10 ⁻⁵	7,46×10 ⁻⁸	0,250	1,34
	8×10 ⁻⁵	1,10×10 ⁻⁷	0,125	0,91
1×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁵	2,40×10 ⁻⁸	1,000	4,16
	2×10 ⁻⁵	4,80×10 ⁻⁸	0,500	2,07
	4×10 ⁻⁵	6,26×10 ⁻⁸	0,250	1,60
	8×10 ⁻⁵	1,05×10 ⁻⁷	0,125	0,95
4×10 ⁻⁵	1×10 ⁻⁵	2,22×10 ⁻⁸	1,000	4,52
	2×10 ⁻⁵	4,42×10 ⁻⁸	0,500	2,26
	4×10 ⁻⁵	5,87×10 ⁻⁸	0,250	1,70
	8×10 ⁻⁵	1,03×10 ⁻⁷	0,125	0,98

Lineweaver-Burk denkleminde göre, doğrunun x eksenini ($-1/K_m$) ve y eksenini ($1/V_{maks}$) kestiği noktalardan yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri için Lineweaver-Burk grafikleri inhibitörsüz ortam için Şekil 4.27.'de, farklı inhibitör derişimleri için Şekil 4.28.'de verildi.



Şekil 4.27. MSM için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.28. MSM için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.24. MSM için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve hız (V_{maks}) değerleri.

MSM Derişimi mol/L	K_m mol/L	V_{maks} mol/L.s
0	$9,76 \times 10^{-5}$	$5,64 \times 10^{-7}$
2×10^{-6}	$5,58 \times 10^{-5}$	$2,03 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	$6,05 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-7}$
1×10^{-5}	$6,75 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-7}$
4×10^{-5}	$7,47 \times 10^{-5}$	$1,90 \times 10^{-7}$

İnhibitör derişimi arttıkça Michaelis-Menten sabiti (K_m) değerleri artmış, hız (V_{maks}) ise sabit kalmıştır. Bu durum gerçekleşen inhibisyonun, yarışmalı (kompetitif) inhibisyon şeklinde gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.24).

TFS için farklı derişimlerde K_m ve V_{maks} hesaplamaları

Enzim için substrat derişimi ve zamana karşı ölçülen akım değerlerinden hesaplanan hız değerleri Çizelge 4.25.'de verildi.

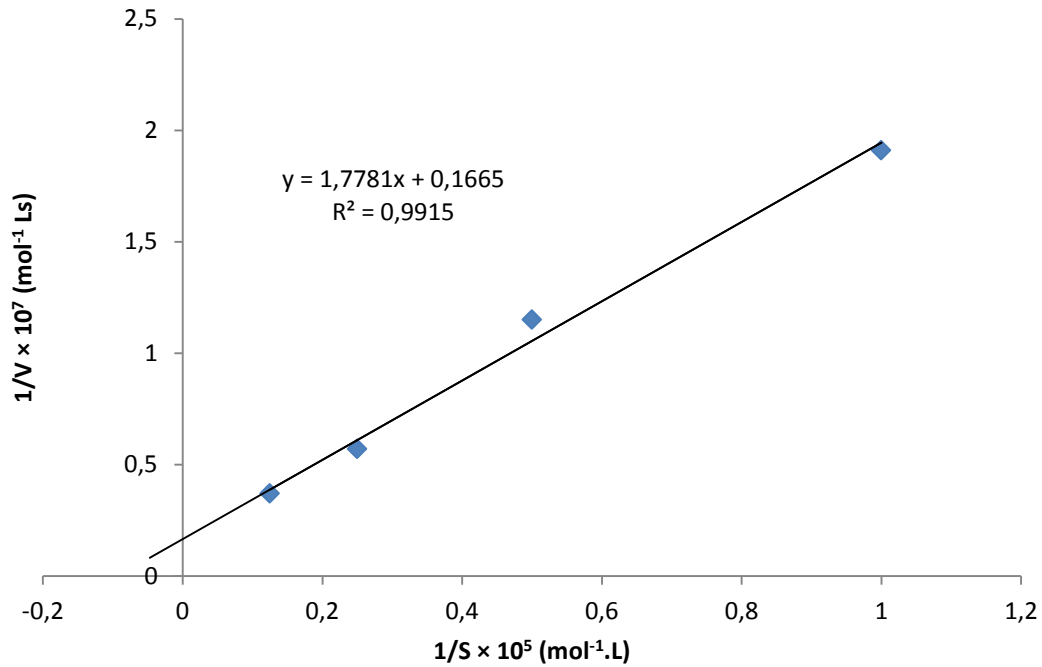
Çizelge 4.25. TFS için $1/S$ ve $1/V_{maks}$ değerleri.

TFS derişimi mol/L	GSSG derişimi (substrat) mol/L	Hız V_{maks} Mol/L.s	$1/S$ (10^4) L/mol	$1/V_{maks}$ (10^8) L.s/mol
0	1×10^{-5}	$5,24 \times 10^{-8}$	1,000	1,91
	2×10^{-5}	$8,70 \times 10^{-8}$	0,500	1,15
	4×10^{-5}	$1,74 \times 10^{-7}$	0,250	0,57
	8×10^{-5}	$2,70 \times 10^{-7}$	0,125	0,37
2×10^{-6}	1×10^{-5}	$3,15 \times 10^{-8}$	1,000	3,20
	2×10^{-5}	$6,08 \times 10^{-8}$	0,500	1,64
	4×10^{-5}	$8,82 \times 10^{-8}$	0,250	1,13
	8×10^{-5}	$1,21 \times 10^{-7}$	0,125	0,83

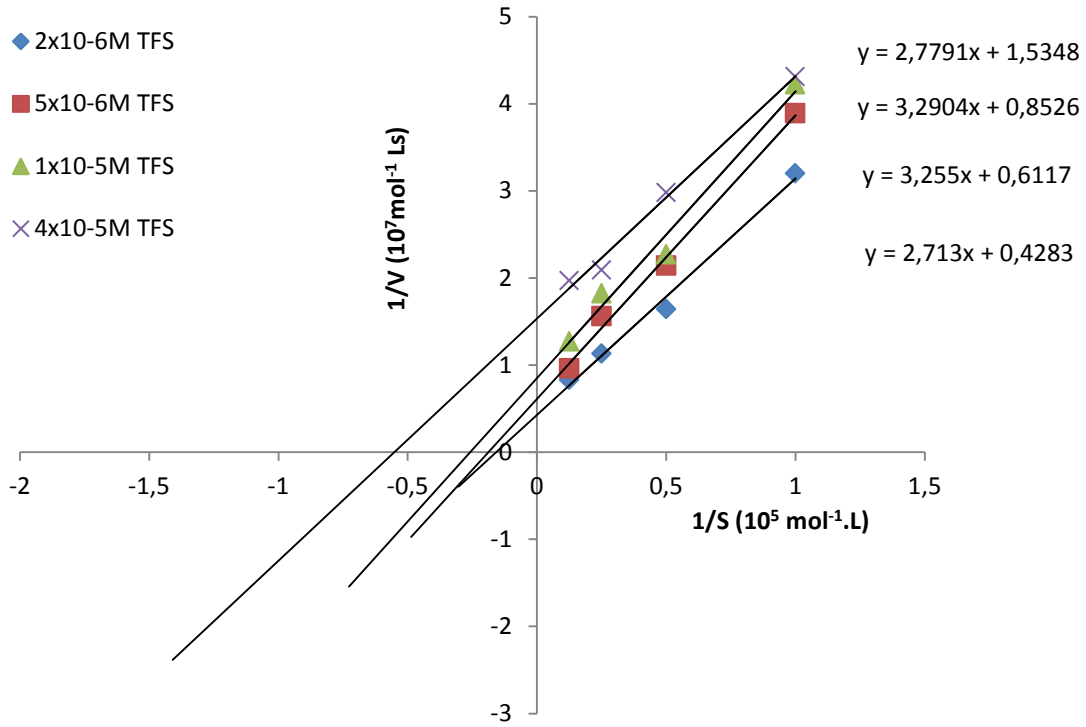
Çizelge 4.25. (Devamı) TFS için $1/S$ ve $1/V_{\text{maks}}$ değerleri.

5×10^{-6}	1×10^{-5}	$2,57 \times 10^{-8}$	1,000	3,84
	2×10^{-5}	$4,67 \times 10^{-8}$	0,500	2,14
	4×10^{-5}	$6,37 \times 10^{-8}$	0,250	1,56
	8×10^{-5}	$1,04 \times 10^{-7}$	0,125	0,96
1×10^{-5}	1×10^{-5}	$2,37 \times 10^{-8}$	1,000	4,22
	2×10^{-5}	$4,40 \times 10^{-8}$	0,500	2,27
	4×10^{-5}	$5,50 \times 10^{-8}$	0,250	1,82
	8×10^{-5}	$7,84 \times 10^{-8}$	0,125	1,27
4×10^{-5}	1×10^{-5}	$2,32 \times 10^{-8}$	1,000	4,31
	2×10^{-5}	$3,36 \times 10^{-8}$	0,500	2,98
	4×10^{-5}	$4,78 \times 10^{-8}$	0,250	2,09
	8×10^{-5}	$5,08 \times 10^{-8}$	0,125	1,97

Lineweaver-Burk denklemine göre, doğrunun x eksenini ($-1/K_m$) ve y eksenini ($1/V_{\text{maks}}$) kestiği noktalardan yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri hesaplanır. K_m ve V değerleri için Lineweaver-Burk grafikleri inhibitörsüz ortam için Şekil 4.29.'da, farklı inhibitör derişimleri için Şekil 4.30.'da verildi.



Şekil 4.29. TFS için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.30. TFS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , 4×10^{-5} mol/L inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiğı.

Çizelge 4.26. TFS için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve hız (V_{maks}) değerleri.

TFS Derişimi (mol/L)	K_m mol/L	V_{maks} mol/L.s
0	$1,07 \times 10^{-4}$	$6,01 \times 10^{-7}$
2×10^{-6}	$6,33 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	$5,32 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-7}$
1×10^{-5}	$3,44 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-7}$
4×10^{-5}	$1,81 \times 10^{-5}$	$6,5 \times 10^{-8}$

İnhibitör derişimi arttıkça Michaelis-Menten sabiti (K_m) değerleri ve hız (V_{maks}) azalmıştır. Bu durum gerçekleşen inhibisyonun, yarışmasız (unkompetitif) inhibisyon şeklinde gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.26).

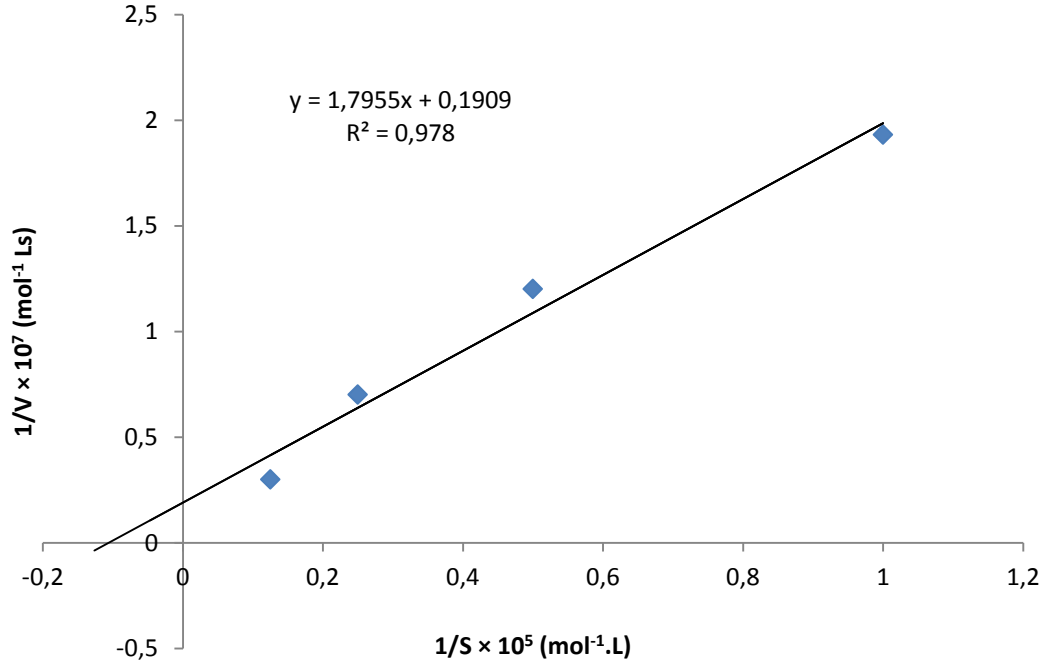
TRS için farklı derişimlerde Km ve Vmaks hesaplamaları

Enzim için substrat derişimi ve zamana karşı ölçülen akım değerlerinden hesaplanan hız değerleri Çizelge 4.27.'da verildi.

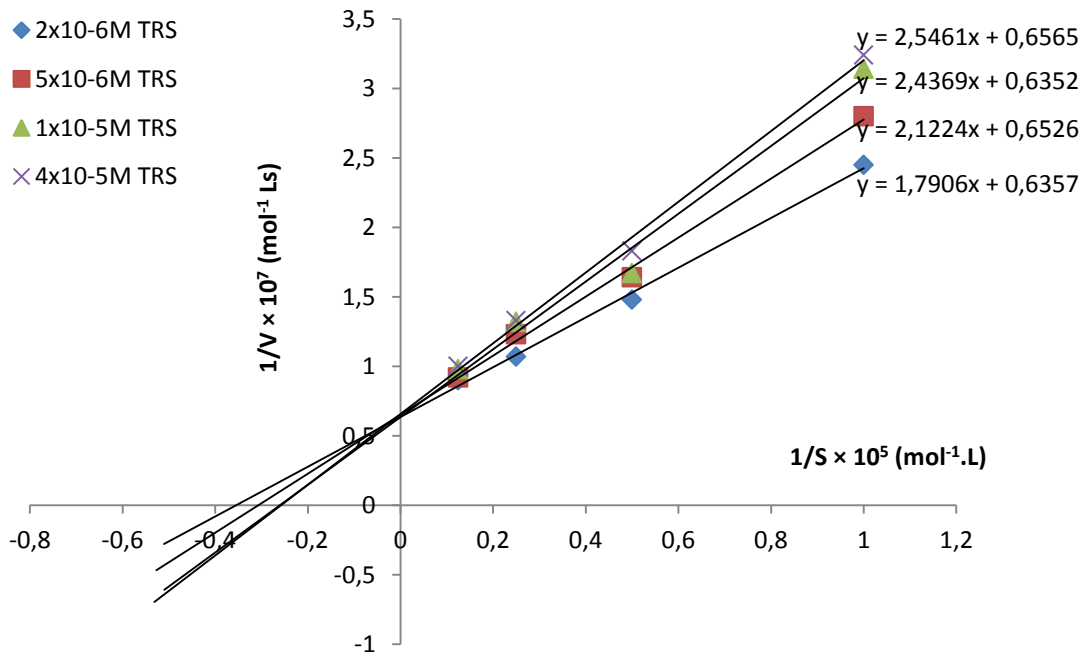
Çizelge 4.27. TRS için 1/S ve 1/Vmaks değerleri.

TRS derşimi (mol/L)	GSSG derişimi (substrat) mol/L	Hız Vmaks Mol/L.s	1/S (10⁴) L/mol	1/Vmaks (10⁷) L.s/mol
0	1×10^{-5}	$5,24 \times 10^{-8}$	1,000	1,93
	2×10^{-5}	$8,24 \times 10^{-8}$	0,500	1,20
	4×10^{-5}	$1,44 \times 10^{-7}$	0,250	0,70
	8×10^{-5}	$3,26 \times 10^{-7}$	0,125	0,30
2×10^{-6}	1×10^{-5}	$4,07 \times 10^{-8}$	1,000	2,45
	2×10^{-5}	$6,73 \times 10^{-8}$	0,500	1,48
	4×10^{-5}	$9,32 \times 10^{-8}$	0,250	1,07
	8×10^{-5}	$1,11 \times 10^{-7}$	0,125	0,90
5×10^{-6}	1×10^{-5}	$3,57 \times 10^{-8}$	1,000	2,80
	2×10^{-5}	$6,11 \times 10^{-8}$	0,500	1,64
	4×10^{-5}	$8,14 \times 10^{-8}$	0,250	1,23
	8×10^{-5}	$1,09 \times 10^{-7}$	0,125	0,92
1×10^{-5}	1×10^{-5}	$3,18 \times 10^{-8}$	1,000	3,14
	2×10^{-5}	$5,98 \times 10^{-8}$	0,500	1,67
	4×10^{-5}	$7,61 \times 10^{-7}$	0,250	1,32
	8×10^{-5}	$1,03 \times 10^{-7}$	0,125	0,98
4×10^{-5}	1×10^{-5}	$3,09 \times 10^{-8}$	1,000	3,24
	2×10^{-5}	$5,55 \times 10^{-8}$	0,500	1,83
	4×10^{-5}	$7,54 \times 10^{-8}$	0,250	1,33
	8×10^{-5}	$1,00 \times 10^{-7}$	0,125	1,00

Lineweaver-Burk göre, doğrunun x eksenini ($-1/K_m$) ve y eksenini ($1/V_{maks}$) kestiği noktalardan yola çıkarak K_m ve V_{maks} değerleri hesaplanır. K_m ve V_{maks} değerleri için Lineweaver-Burk grafikleri inhibitörsüz ortam için Şekil 4.31.'de, farklı inhibitör derişimleri için Şekil 4.32.'de verildi.



Şekil 4.31. TRS için inhibitörsüz ortamda Lineweaver-Burk grafiği.



Şekil 4.32. TRS için 2×10^{-6} , 5×10^{-6} , 1×10^{-5} , $4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ inhibitör derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği.

Çizelge 4.28 TRS için Michaelis-Menten sabiti (Km) ve hız (Vmaks) değerleri.

TRS Derişimi (mol/L)	Km mol/L	Vmaks mol/L.s
0	$9,43 \times 10^{-5}$	$5,23, \times 10^{-7}$
2×10^{-6}	$3,25 \times 10^{-4}$	$1,57 \times 10^{-7}$
5×10^{-6}	$3,83 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-7}$
1×10^{-5}	$3,85 \times 10^{-5}$	$1,57 \times 10^{-7}$
4×10^{-5}	$3,88 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-7}$

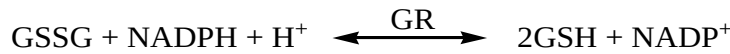
İnhibitör derişimi arttıkça Michaelis-Menten sabiti (Km) değerleri artmış, hız (Vmaks) ise sabit kalmıştır. Bu durum gerçekleşen inhibisyonun, yarışmalı (kompetitif) inhibisyon şeklinde gerçekleştiğini göstermiştir (Çizelge 4.28).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Glutasyon redüktaz (GR) enzimini inhibe edebilen TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin indirgenme potansiyeli, transfer edilen elektron sayısı, difüzyon katsayısı gibi elektrokimyasal parametreleri tespit edildi. TBM, MSM, TFS ve TRS maddeleri için indirgenme potansiyelleri -1,86, -1,91, -1,65 ve -1,92 V olarak belirlendi. Elektron sayıları sırasıyla 1,23, 1,35, 1,26 ve 0,95 olarak belirlendi. Difüzyon katsayıları $3,20 \times 10^{-6}$, $6,53 \times 10^{-7}$, $8,82 \times 10^{-6}$ ve $1,11 \times 10^{-5}$ olarak hesaplandı. Ayrıca maddelerin indirgenme sırasında elektrot yüzeyine taşınımının difüzyon kontrollü olduğu ve EC indirgenme mekanizmasına göre indirgenme reaksiyonlarının gerçekleştiği tespit edildi.

Enzimatik reaksiyonda GSH ürünü takip edildiği için, GSH için kalibrasyon grafiği çizilip; doğrusal çalışma aralığı belirlenip, gözlenebilirlik sınırı (LOD) $1,798 \times 10^{-6}$ mol/L ve tayin sınırları (LOQ) $5,995 \times 10^{-6}$ mol/L olarak hesaplandı.

Maddelerin glutasyon redüktazın katalizlediği ve GSH fazlalığında ilaç direncine neden olan enzimatik reaksiyonun inhibisyon çalışmaları kare dalga voltametrisi ve floresans spektroskopisi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.



Bu amaçla farklı madde derişimlerinde GSH'ın akım ve floresans değeriindeki azalma takip edildi. Akımın ve floresansın yarıya düştüğü madde derişimi için IC_{50} ve K_i değeri belirlendi. IC_{50} ve K_i değeri incelenmiştir. TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin IC_{50} değeri kare dalga voltametrisiyle ve floresans spektroskopisiyle sırasıyla $4,90 \times 10^{-6}$ M, $9,75 \times 10^{-6}$ M, $7,78 \times 10^{-6}$ M, $8,30 \times 10^{-6}$ M ve $3,50 \times 10^{-6}$ M, $7,35 \times 10^{-6}$ M, $7,70 \times 10^{-6}$ M, $6,85 \times 10^{-6}$ M olarak belirlenmiştir. Ayrıca TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin K_i değeri kare dalga voltametrisiyle ve floresans spektroskopisiyle sırasıyla $2,54 \times 10^{-6}$, $6,54 \times 10^{-6}$, $4,69 \times 10^{-6}$, $4,02 \times 10^{-6}$ ve $1,82 \times 10^{-6}$, $4,93 \times 10^{-6}$, $4,64 \times 10^{-6}$, $3,32 \times 10^{-6}$ olarak belirlenmiştir.

TBM, MSM, TFS, TRS maddelerinin her iki yöntemle de belirlenen IC_{50} ve K_i değeri incelendiğinde IC_{50} ve K_i değeri düşük olan TBM maddesinin en iyi inhibitör özelliği olduğu tespit edilmiştir. TBM maddesinin düşük IC_{50} değeri belirlenmesi TBM maddesinin daha düşük konsantrasyonlarda bile etkili bir inhibitör olduğunu ispat etmektedir. Ayrıca TBM maddesinin K_i değeri düşük olması da TBM maddesi ile GR

enziminin kuvvetli bir bağlanma gösterdiğini ve bu sayede GSH ürün verimini azalttığı tespit edilmiştir. Diğer maddelere göre TBM maddesinin düz zincirinde fazladan var olan dallanma ve metil grubu TBM maddesinin diğer maddelere göre inhibitör özelliğinin daha iyi olmasını sağladığı belirlenmiştir.

Enzimatik reaksiyonda gerçekleşen inhibisyonun çeşidini belirlemek için Lineweaver-Burk grafiğine göre K_m ve V_{maks} değerleri belirlenip, TBM, MSM, TFS ve TRS maddelerinin inhibisyon mekanizmaları sırasıyla yarışmasız, yarışmalı, yarışmasız ve yarışmalı inhibisyonu şekilde gerçekleştiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Stetter J. (2002). Pesticide Innovation: Trends In Research And Development. **Chemistry In Agriculture**, 89-23,
2. K.A.S. Solmaz., Azak H., Üstün G. ve Morsünbül T. (2010). Pestisit Gideriminde Fenton Proseslerinin Kullanımına Yönelik Bir Envanter Çalışması. **Uludağ Üniversitesi Mimarlık Fakültesi Dergisi**, 15-1.
3. Maurino V., Minero C., Pelizzetti E. and Vincenti M. (1999). Photocatalytic Transformation Of Sulfonyl Urea Herbicides Over Irradiated Titanium Dioxide Particles. **Colloids and Surfaces**. 329-338.
4. Boschini G., D'Agostina A., Antonioni C., Locati, D. and Arnoldi A. (2007). Hydrolytic Degradation Of Azimsulfuron, a Sulfonylurea Herbicide. **Chemosphere**, 1312-1317.
5. Çankaya S. ve Sulak O. (2008). Gebelik Esnasında Diazona Maruz Kalan Gebe Rantların Yeni Doğan Yavrularının Akciğer Dokusunda Oluşan Morfolojik Değişikler Ve Bu Değişikliklere Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)' in Etkisinin Araştırılması. **Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**.
6. Ögüt S., Küçüköner E. ve Gültekin F. (2012). Isparta Yöresinde Kullanılan Bazı Pestisitlerin Elma-Kirazlardaki Pestisit Kalıntıları ve Bu Ürünlerin Tarımında Çalışan Tarım İşçilerinin Kan Parametrelerine Etkilerin Belirlenmesi” **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**.
7. Soyöz M. ve Özçelik N. (2003). Ziraî Mücadele Kullanılan Pestisitlerin Sinogenetik Etkileri. **Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 6-9,
8. Karakaya M. ve Boyraz N. Gıda Kirlenmesinde Pestisitler ve Korunma Yolları. **Çevre Dergisi**, 11-15.
9. Pestisitler. (2012). **Millî Eğitim Bakanlığı Çevre Sağlığı Dergisi**.
10. Ağar S., Aydınoglu H., Temel O., İkizunal K. ve Ece H. (1991). Pestisit Kullanımının Tarihçesi, Bugünü Ve Geleceği. **Türk Entomoloji Dergisi**, 247-256.
11. MRL Uygulanacak Bitkisel ve Hayvansal Ürünler. (2013). **Türk Gıda Kodeksi**.
12. Tepge C.F. ve Yüksel Y.N. (2012). Gıda Güvenliği ve Pestisitler. **Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü**, 4, 1303-8346,
13. Tiryaki O., Canhilal R. ve Horuz S. (2010). Tarım İlaçları Kullanımı ve Riskleri. **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 26(2), 154-169.
14. Führ F. (1982). Fate of Herbicide Chemical in Agricultural Environment with Particular Emphasis on the Application of Nuclear Techniques. **Agrochemicals Fate in Food and Environment**.

15. Führ F. (1991). Radiotracers in Pesticide Studies-Advantages Limitations. **Science Cultura**, 211-216.
16. Sexton E.S., Lei Z. and Zilberman D.(2007). The Economics of Pesticides and Pest Control. **International Review of Environmental and Resource Economics**, (1)271-326.
17. Delen N., Durmuşoğlu E., Güncan A., Güngör N., Turgut C. ve Burçak A.(2005). Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. **Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi**.
18. Altıkat A., Turan T., Torun E.F. ve Bingül Z. (2009). Türkiye’ de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 40(2), 87-92,
19. Tarakçı Ü. ve Türel İ. (2009). Halk Sağlığı Amaçlı Kullanılan Pestisitlerin Güvenilirlik Standartlarının Karşılaştırılması. **Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi**, 20(1) 11 – 18.
20. Şık B., Certel M. ve Yıldız G. (2011). Pestisitler ve Gıda Güvenliği. **Gıda Mühendisliği Dergisi 34. Sayı**.
21. Güler Ç. ve Çobanoğlu Z.(1997). Pestisitler. **İlköz Matbaası**.
22. Çaylak E.(2011). Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ile Antioksidanlar. **Tıp Araştırma Dergisi**, 9(1): 73-83.
23. Yerer B.M. ve Aydoğan S.(2000). Oksidatif stres ve Antioksidanlar. **Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**, 9(1) 59-53.
24. Öğüt S. ve Atay E. (2012). Yaşlılık ve Oksidatif Stres. **SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi**, 19(2)/68-74
25. Hugon J., Hugon F., Esclaire F., Lesort M. and Diop A.G. (1996). The Presence of Calbindin in Rat Cortical Neuronal Proteins Protects in Vitro From Oxidative Stress. **Brain Research**, 208-292.
26. Desport J.C. and Couratiner P. (2002). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Nutrition Clinica in Metabolism**, 253-259,
27. Keyse, S. (1997). Oxidative stress responses in mammalian cells. **In Molecular Genetics of Drug Resistance**, 335-372,
28. Collins, A. (1999). Oxidative DNA Damage, Antioxidants, and Cancer. **Bioessays**, 21, 238-246,
29. Atmaca E. ve Aksoy A. (2009). Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tayine Edilmesi. **YYU Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 20(2), 79-83,
30. Rice-Evans, C. and Burdon, R. (1994). **Free Radical Damage and Control**.

31. Willcox, J. K., Ash, S. L. and Catignani, G. L. (2004). Antioxidants And Prevention Of Chronic Disease. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 44, 275-295,
32. Aslan R, Şekeroğlu M.R. ve Bayiroğlu F. (1995). Serbest Radikal Türlerin Membran Lipit Peroksidasyonuna Etkileri ve Antioksidan Savunma. **Y.Y.Ü Sağlık Bil. Dergisi**, 137-142.
33. Koca N. ve Karadeniz F. (2003). Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vucuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. **Gıda Mühendisleri Dergisi**.
34. Patsoukis, N., Georgiou, C. (2004). Determination Of The Thiol Redox State Of Organisms: New Oxidative Stress Indicators. **Anal Bioanal Chem**. 378, 1783-1792,
35. Zubay, G. (1988). Biochemistry. (Second Edition). **Macmillan Publishing Company**.
36. Gözükar E.M. (1989). Biyokimya. **İ.Ü. Yayınları**.
37. Açı, L. (1990). Koyun Beyni Glutasyon Redüktazının Saflaştırılması ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**.
38. Karataş F., Bektaş İ., Birişik A., Aydın Z. ve Kurtul A. (2011). Çiriş Otunda Suda Çözünen Bazı Bileşiklerin Araştırılması. **SDU Journal of Science**, (1) 6, 35-39,
39. Poyraz İ., Kutlu M. and Aydoğan G. Purification and Biochemical Characterization of Glutathione Reductase Enzym in Gammurus Pulex. **Afyon Kocatepe University Journal of Science**, 7(1), 49-54.
40. Knapen, M. F.C.M., Zusterzeel, P.L.M, Peters, W.H.M. and Steegers, E.A.P. (1990). Glutathione And Glutathione-Related Enzymes In Reproduction. **European Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology**, 82, 171-184.
41. Murray R.K., Mayes P.A., Granner D.K. and Rodwell V.W. (1993). Harper'in Biyokimyası (Çev. Menteş G. ve Menteş B.). **Barış Kitapevi**.
42. Stryer L. (1981). Biochemistry. **W.H. Freeman Company**.
43. Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ. (2012). **Biyokimya**. (9.Baskı). Aktif Yayınevi, Erzurum.
44. McCallum J.M, Barret J. (1995). The Purification and Properties of Glutathione Reductase From The Cestode *Moniezia ezpansa*. **Institute of Biology Science**, 27(4), 393-401,
45. Ası T. (1999). **Tablolarla Biyokimya**.
46. Beutler, E. (1969). Effect of Flavin Compound on Glutathione Reductase Activity; In Vivo and In Vitro Studies. **J. Clin Invest** 48(10), 1957-1966.
47. Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L.(2002). Biochemistry. (5. edition). **W.H. Freeman and Company**.

48. Topal Ş. (1985). Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Reninin Yeri. **Tübitak Marmara Araştırma Enstitüsü.**
49. Gilbert, H.F.(1999). **Basic Concepts in a Student's Survival Guide Biochemistry**, (Second Edition).
50. Bispo C.A.J., Bonafe C.F.S., Souza V.B.D., Silva J.B.B. and Carvalho G.B.M. (2011). Extending the Kinetic Solution of The Classic Michelis-Menten Model of Enzyne Action. **J.Math. Chem.**,
51. Oudenaarden V.A. (2004). Michelis-Menten. **System Biology.**
52. Gonzo D. and Kaufman M. (2013). Chemical and Enzyme Kinetics. **Master in Bioformatic.**
53. Wagner F.G. (1972). Properties of the Michaelis-Menten Equation and Its Integrated from Which are Useful in Pharmacokinetics. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharma Ceutics**, (1),2
54. Sorensen R. and Novak N.(1995). The Use of Michaelis-Menten Kinetics in Cell Biology and Pysiology Teaching Laboratories. **Biochemical Education**, 0307-4412
55. Internet: <http://wikipedia.com> adresinden 15 Ocak 2014 tarihinde alınmıştır.
56. Internet: www.cardiff.ac.uk/biosi/staffinfo/kille/dentals/dental4
57. Internet: www.mustafaaltinisik.org.uk/89-1-09.pdf 15 Ocak 2014 tarihinde alınmıştır.
58. Internet: <http://curvefit.com> 15 Ocak 2014 tarihinde alınmıştır.
59. Prather K. (2004). Enzyme Inhibition and Toxicity. **Integrated Chemical Engineering**,
60. Bisswanger, H. (2003). Enzyme Kinetics, Biochemistry, **Willey**, 8(1), 11-14,
61. Sharma R. (2012). Enzyme Inhibition Mechanisms and Scope. **Enzyme Inhibition and Bioapplications**,
62. Zhang Z.Y.and Wong Y.N. (2005). Enzyme Kinetics for Clinically Relevant CYP Inhibition. **Current Drug Metabolism**, 6, 241-257.
63. Erik, E.Z. (2007). Thifensülfüron–metil Herbisitinin Diferansiyel Puls Polarografisiyle Tayini. Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.**
64. Skoog A. D., Holler F.C.and Nieman T.A. (2004). Principles of Instrumental Analysis. **Estern Press Pvv. Ltd.**, 798-808.
65. Wang J. (2002). Analytical Electrochemistry. (Second Edition). **John Willey and Verlag GmbH**, 206-214,

66. Borman S.A., Osteryoung R.A., Osteryoung J.G. and O' Dea J.J. (1982). Pulse Voltammetry – Today and Tomorrow. ***Anal. Chem.***,
67. Osteryoung J., O' Dea J.J. and Bard A.J. (1986). Electroanalytical Chemistry. ***Makel Dekker***, 209 – 308.
68. Bard A.J. and Faulkner L.R. (2001). Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications. ***John Wiley and Sons. Inc.***,
69. Nicholson R.S. and Shain I. (1964). Theory of Stationary Electrode Polarography: Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. ***Anal. Chem.***, 706-724.,
70. Greef R., Peat R., Peter L.M., Pletcher D. and Robinson J. (1990). Instrumental Methods in Electrochemistry” ***Ellis Horwood Ltd.***,
71. Çekirdek P. (2005). Voltametik Metotlarla Ditiyofosfanat Anyonlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi. Doktora Tezi. ***Ankara Üniversitesi.***
72. Baranski, A.S., Fawcett, W. R. and Gilbert, C. M. (1985). Use of Microelectrodes For The Rapid Determination of The Number of Electrons Involved in an Electrode Reaction. ***American Chemical Society*** 57, 1, 166.
73. Beydemir, Ş., Çiftçi, M., Özmen, İ., Büyükkuroğlu, M. E., Özdemir, H. ve Küfrelioğlu, Ö.İ. (2000). Effects of Some Medical Drugs on Enzyme Activities of Carbonic Anhydrase from Human Erythrocytes in Vitro and from Rat Erythrocytes in Vivo. ***Pharmacol. Res.*** 42, 187-191,
74. Erat, M., Sakıroğlu, H. ve Çiftçi, M. (2005) “Effect of Some Antibiotic on glutathione Reductase from Bovine Erythrocytes.” ***Vet. Med.Czech.*** 48, 305-312.
75. Siegel, R.L.K., Arscott, L.D., Janas, A.S., Schirmer, R.H. and Williams, C.H. (1998). Role of Active Site Tyrsine Residues in Catalysis by Human Glutathione Reductase. ***Biochemistry.*** 37, 13968-13977,
76. Kizek, R., Vacek, J., Trbkova, L. and Jelen, F. (2004). Cyclic Voltammetric Study of The Redox System of Glutathione Using The Disulfide Bond Reductant Tris(2-carboxyethyl) Phosphine. ***Bioelectrochemistry***, 63, 19-24,
77. Griffith, S. M., Brewer, T. G. and Steiner, J. J. (2001). Thermal Dependence of The Apparent Km of Glutathione Reductase From Three Wetland Grasses and Maize. ***Annals of Botany***, 87, 599-603,
78. Raoof, J. B., Ojani, R. and Baghayeri, M. (2009). Simultaneous Electrochemical Determination of Glutathione and Tryptophan on a Nano-TiO₂/Ferrocene Carboxylic Acid Modified Carbon Paste Electrode. ***Sensors and Actuators B: Chemical*** 143, 261-269.
79. Carta F., Innocenti A., Hall A.R., Mühschlgel A.F., Scozzafava A. and Supuran T.C. (2011). Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of the β -class Enzymes from the

Fungal Pathogens Candida Albicans and Cryptococcus Neoformans With Branched Aliphatic/Aromatic Carboxylates and their Derivates”, ***Bioorganic and Medical Chemistry Letters***, 21, 2521-2526

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SEL, Sedat
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.12.1988 Salıpazarı/SAMSUN
Medeni hali : Bekar
Cep Telefon : 0 (506) 547 59 15
e-mail : sedatsel@hotmail.com.tr



Eğitim

Lisans Akdeniz Üniversitesi/ Kimya Bölümü 2011

Lise Bağcılar Orrhan Gazi Lisesi (YDA) 2006

İş Deneyimi

- -

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Kitap, Bilgisayar teknolojileri,



GAZİ GELECEKTİR..