



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLER VARLIĞINDA METİYONİN  
TAYİNİ İÇİN OPTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**Malika HRETANİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya, Tezli Yüksek Lisans Programı**

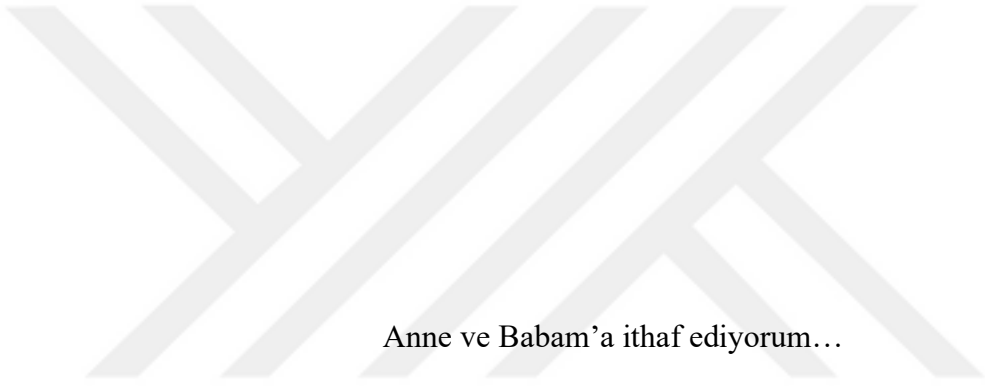
**Ağustos, 2025**

## TEZ KABUL VE ONAYI

**Malika HRETANİ** tarafından, **Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER** danışmanlığında hazırlanan " **ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLER VARLIĞINDA METİYONİN TAYİNİ İÇİN OPTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ** " başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **29/08/2025** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
<b>DANIŞMAN</b>	Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
<b>ÜYE</b>	Doç. Dr. Mustafa BENER İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
<b>ÜYE</b>	Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur ÖNEM İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Analitik Kimya Anabilim Dalı	<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret



Anne ve Babam'a ithaf ediyorum...

## **BÜTÇE DESTEKLERİ**

### **ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLER VARLIĞINDA METİYONİN TAYİNİ İÇİN OPTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI .....	ii
BEYAN .....	iii
BÜTÇE DESTEKLERİ .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....	2
2.1. AMİNO ASİTLER .....	2
2.1.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması .....	4
2.1.2. Amino Asit Üretimi.....	4
2.2. METİYONİN.....	5
2.2.1. Metiyoninin Önemi Ve Kullanımı .....	6
2.2.2. Metiyoninle İlişkili Hastalıklar .....	7
2.2.3. Metiyonin Kaynakları .....	7
2.2.4. Metiyonin Metabolizması .....	10
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	11

2.3.1. Sentetik Antioksidanlar .....	12
2.3.2. Doğal Antioksidanlar .....	14
2.3.3. Antioksidan Aktivite/Kapasite Analizlerinin Sınıflandırılması .....	17
2.4. METİYONİN TAYİNİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	23
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>26</b>
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER.....	26
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	26
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması .....	26
3.3.1. Sentetik Karışımları Hazırlanması .....	27
3.3.2. Gerçek Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	28
3.4.1. Metiyonin Tayini için Geliştirilen Modifiye AuRAC Yöntemi.....	28
3.4.2. HPLC Yöntemi.....	29
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>30</b>
4.1. METİYONİN TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN MODİFİYE AuRAC YÖNTEM.....	30
4.2. HPLC YÖNTEMİ.....	33
4.3. GERÇEK ÖRNEKLERE YÖNTEMİN UYGULANMASI .....	34
4.4. INTERFERANS ÇALIŞMALARI.....	34
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>36</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>
<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFAS .....</b>	<b>48</b>
<b>ETİK KURUL İZİN YAZISI .....</b>	<b>49</b>
<b>KURUM İZİN YAZILARI .....</b>	<b>50</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: Amino asitlerin yapısal özellikleri.....	2
Şekil 2.2: Yaygın amino asit.....	3
Şekil 2.3: Metiyoninin formülü ve bazı önemli özellikleri .....	5
Şekil 2.4: Bikarbonattan D,L-metiyonin'in kimyasal sentezi.....	7
Şekil 2.5: Metiyonin metabolizmasına giden yollar.....	10
Şekil 2.6: Başlıca sentetik antioksidanların yapıları.....	13
Şekil 2.7: Fenolik antioksidanların sınıflandırılması.....	14
Şekil 2.8: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.9: Flavonoidlerin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.10: CUPRAC antioksidan kapasite tayini için reaksiyon şeması.....	19
Şekil 2.11: Antioksidanların varlığı ve yokluğunda modifiye AuRAC sistemi tepkimesi.....	19
Şekil 2.12: DPPH• ile (a) askorbik asit (2:1), (b) sistein (1:1) ve (c) hidrokinon (2:1) arasındaki tepkime stokiyometrisi.....	21
Şekil 2.13: Kuersetin ile DPPH• arasındaki tepkime ürünlerinin metanol ortamında oluşumu için önerilen mekanizma.....	22
Şekil 2.14: DPPH deneyinde rol oynayan mekanizma.....	22
Şekil 4.1: Metiyonin konsantrasyonuna bağlı olarak tüplerin renk değişimi.....	30
Şekil 4.2: Metiyonin çözeltisinin kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	30
Şekil 4.3: Gallik asit varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve ilgili UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	31
Şekil 4.4: Kuersetin varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve ilgili UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	31
Şekil 4.5: Standart metiyonin çözeltileri (a) ve gıda takviye örneğine (b) ait kromatogramlar .....	33

<b>Şekil 4.6:</b> Serum varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları. ....	34
<b>Şekil 4.7:</b> Geliştirilen yönteme göre interferans yapan maddelerin etkileri. ....	35
<b>Şekil 5.1:</b> Geliştirilen modifiye AuRAC yöntemin şematik gösterimi. ....	37
<b>Şekil 5.2:</b> Metiyonin'in H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> ile oksidasyon mekanizması. ....	38



## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1:</b> En önemli amino asitlerin üretimi ve kullanım alanları.....	5
<b>Tablo 2.2:</b> Sentetik antioksidanların insan sağlığına verdiği zararlar.....	13
<b>Tablo 2.3:</b> Antioksidan temel avantajları ve dezavantajları. ....	15
<b>Tablo 4.1:</b> Metiyonin tayini için kalibrasyon ve analitik parametreler. ....	32
<b>Tablo 4.2:</b> Sentetik karışımlarda metiyonin analizine ilişkin doğruluk ve kesinlik verileri....	32
<b>Tablo 4.3:</b> Gıda takviye örneği için metiyonin analizi sonuçlar.....	34

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>M</b>	:Molarite
<b><math>\mu</math></b>	:Mikro
<b><math>e^-</math></b>	:Elektron
<b><math>R^2</math></b>	:Korelasyon Katsayısı
<b><math>\lambda_{max}</math></b>	:Maksimum Emilim Dalga Boyu
<b><math>E_0</math></b>	:Standart Redoks Potansiyeli (Standard Potential)
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>AA</b>	:Askorbik Asit
<b>AAPH</b>	:2,2'-Azobis(2-Metilpropionamidin) Dihidroklorür
<b>ALA</b>	:Alanin
<b>AOA</b>	:Antioksidan Aktivite
<b>ARG</b>	:Arjinin
<b>ASN</b>	:Asparajin
<b>ASP</b>	:Aspartik Asit
<b>AuNP</b>	:Altın Nanopartikülleri
<b>AuRAC</b>	:Altın(Ii) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
<b>BHA</b>	:Bütillenmiş Hidroksianisol
<b>BHT</b>	:Bütillenmiş Hidroksitoluen
<b>CAT</b>	:Kateşin
<b>CYS</b>	:Sistein
<b>CUPRAC</b>	:Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite
<b>DMPD</b>	:N,N-Dimetil-P-Fenilendiamin Dihidroklorür
<b>FC</b>	:Folin-Ciocalteu Yöntemi

<b>FRAP</b>	:Demir (III) İndirgeyici Antioksidan Gücü Testi
<b>FT-IR</b>	:Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GA</b>	:Gallik Asit
<b>GLU</b>	:Glutamin
<b>GLY</b>	:Glisin
<b>GSH</b>	:Glutatyon
<b>HAT</b>	:Hidrojen Atom Transferi Mekanizması
<b>LYS</b>	:Lizin
<b>MET</b>	:Metiyonin
<b>MTHF</b>	:N5-Metil-Tetrahidro-Folat
<b>NAC</b>	:N-Asetil-L-Sistein
<b>PG</b>	:Propil Gallat
<b>PHE</b>	:Fenilalanin
<b>PRO</b>	:Prolin
<b>QR</b>	:Kuersetin
<b>RM</b>	:Remetilasyon
<b>SAH</b>	:S-Adenosil-Homosistein
<b>SAM</b>	:S-Adenozilmetiyonin
<b>SER</b>	:Serin
<b>SET</b>	:Elektron Transferi
<b>TBHQ</b>	:Tersiyer Bütilhidrokinon
<b>TEAC</b>	:Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite
<b>THR</b>	:Treonin
<b>TM</b>	:Transmetilasyon
<b>TRP</b>	:Triptofan
<b>TS</b>	:Transsülfürasyon
<b>TYR</b>	:Tirozin
<b>VAL</b>	:Valin

## ÖZET

### [YÜKSEK LİSANS TEZİ]

#### ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDAN BİLEŞİKLER VARLIĞINDA METİYONİN TAYİNİ İÇİN OPTİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

[Malika HRETANİ]

**İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Analitik Kimya, Tezli Yüksek Lisans Programı**

[Danışman : Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER ]

[Metiyonin, organizmanın büyüme ve yaşamsal fonksiyonlarında hayati bir rol oynayan esansiyel bir amino asit olmasının yanı sıra, oksidatif strese bağlı hücre hasarını önleyen etkili bir antioksidandır. Bu nedenle, biyolojik ve farmasötik örneklerde metiyoninin hassas ve seçici tayini, son yıllarda önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu çerçevede, literatürde metiyoninin belirlenmesi için birçok yöntem geliştirilmiş olsa da, diğer antioksidanların varlığında metiyoninin basit, kolay ve düşük maliyetli bir şekilde tayin edilmesini sağlayan bir yöntem gerekmektedir.

Bu çalışmada, diğer antioksidan bileşiklerin etkisinden bağımsız olarak metiyonin tayini için yeni bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem, AuRAC (Altın(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) testi esasına dayanmaktadır. Öncelikle örneğe DPPH reaktifi eklenerek, metiyonin dışındaki antioksidanlar yükseltgenerek girişimleri ortadan kaldırılmıştır. Ardından metiyoninin altın (III) iyonlarıyla oksidasyonu sonucunda, reaksiyon ortamında kalan altın (III) iyonları ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) ile tepkimeye girerek oluşan ABTS<sup>•</sup> radikalinin 412 nm absorbansı ölçülmüştür. Bu yöntem aracılığıyla, metiyoninin tayini yüksek duyarlılıkla belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin tayin sınırı (LOD) 14 µM olarak hesaplanmış, doğrusal çalışma aralığı ise 17–56 µM olarak bulunmuştur. Hazırlanan sentetik karışımlar yüksek geri kazanım değerleri (96-101) ile doğruluk ve güvenilirlik açısından başarılı sonuçlar vermiştir.

Son olarak, yöntem sentetik serum örneği ve metiyonin içeren gıda takviyesine uygulanmıştır. Gıda takviyesi için önerilen yöntem ile elde edilen metiyonin içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntem sonucu ile karşılaştırılmış; elde edilen benzer sonuçlar, yöntemin geçerliliğini göstermiştir.

Elde edilen veriler, geliştirilen bu yöntemin, kompleks matrislerde metiyonin tayini için etkili, seçici ve uygulanabilir bir alternatif olduğunu ortaya koymaktadır. ]

Ağustos 2025 , [68] sayfa.

**Anahtar kelimeler:** [ Metiyonin, AuRAC yöntemi, DPPH yöntemi ]



## **ABSTRACT**

**[M.Sc. THESIS]**

**[ DEVELOPMENT OF AN OPTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF  
METHIONINE IN THE PRESENCE OF VARIOUS ANTIOXIDANT COMPOUNDS ]**

**[Malika HRETANI]**

**Istanbul University-Cerrahpaşa**

**Institute of Graduate Studies**

**Department of Chemistry**

**Analytical Chemistry**

**[Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Burcu BEKDEŞER ]**

[Methionine is not only an essential amino acid that plays a vital role in the organism's growth and vital functions, but also an effective antioxidant that prevents cell damage caused by oxidative stress. Therefore, the sensitive and selective determination of methionine in biological and pharmaceutical samples has become a significant research topic in recent years. In this context, although many methods have been developed in the literature for the determination of methionine, a method that allows the simple, easy and low-cost determination of methionine in the presence of other antioxidants is required.

In this study, a new spectrophotometric method was developed for the determination of methionine independently of the effects of other antioxidant compounds. The method is based on the AuRAC (Gold(III) Ion Reducing Antioxidant Capacity) test principle. First, the DPPH reagent was added to the sample to oxidize antioxidants other than methionine and eliminate their interference. Then, as a result of the oxidation of methionine with gold(III) ions, the remaining gold(III) ions in the reaction medium reacted with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), and the absorbance of the resulting ABTS<sup>•+</sup> radical was measured at 412 nm. Using this method, the determination of methionine was achieved with high sensitivity.

The limit of detection (LOD) of the developed method was calculated as 14 µM, and the linear working range was found to be between 17–56 µM. The prepared synthetic mixtures gave successful results in terms of accuracy and reliability with high recovery values (96-101).

Finally, the method was applied to a synthetic serum sample and a methionine-containing food supplement. The methionine content obtained using the proposed method for

the food supplement was compared with the results obtained using high-performance liquid chromatography (HPLC); the similar results demonstrated the validity of the method.

The obtained data demonstrate that this newly developed method is an effective, selective, and applicable alternative for the determination of methionine in complex matrices. ]

August 2025, [68] pages.

**Keywords:** [Methionine, AuRAC method , DPPH method ]



## 1. GİRİŞ

Metiyonin (2-amino-4-(metiltiyo) bütanoik asit, Met), biyolojik metilasyon reaksiyonlarında önemli rol oynayan esansiyel bir amino asittir. Diyetteki kükürdün ana kaynağını oluşturur ve homosistein, sistein, taurin, glutatyon, glisin ve treonin gibi birçok temel amino asidin öncüsüdür. Metiyoninin yan zincirindeki kükürt, redoks reaksiyonlarını kolaylaştırarak kolayca sülfoksite oksitlenmesini sağlar; bu oksidasyon, metiyonin sülfoksite redüktazlar (MSR) tarafından geri indirgenir. MSR'lerin rol aldığı bu tersinir oksidasyon–indirgenme döngüsü, hücreleri oksidatif strese karşı katalitik bir antioksidan sistemi olarak korur ve özellikle MSR disülfoksite redüktazlarının Parkinson hastalığının önlenmesinde veya ilerleyişinin yavaşlatılmasında etkili olabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca metiyonin, kolesterol düşürücü etkisinin yanı sıra hücreleri koruyarak yaşlanmayı yavaşlatır, bazı makro besinlerin emiliminde rol oynar ve saç ile cilt sağlığını destekler. L-metiyoninin bu çok yönlü biyolojik önemi nedeniyle, çeşitli kantitatif analitik yöntemler geliştirilmiştir [1-3].

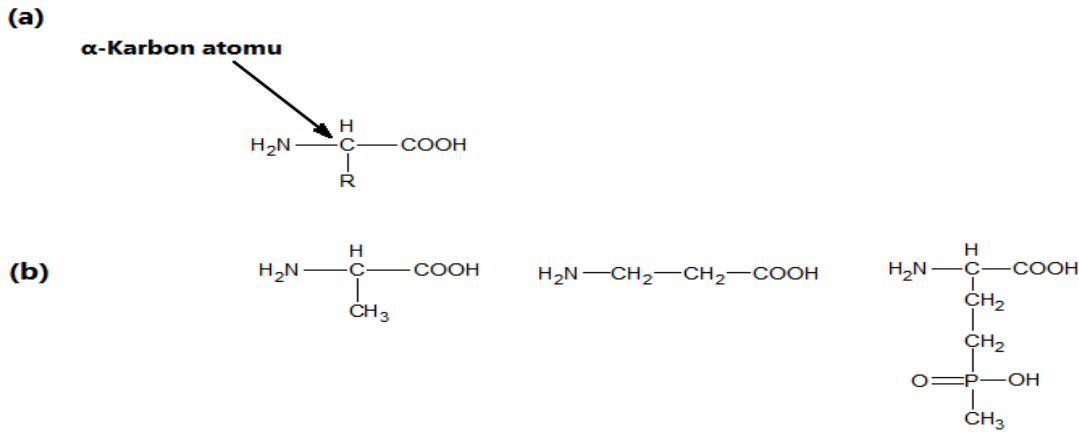
Günümüzde Metiyonin tayini için literatürde kromatografik ve elektro-analitik esaslı yöntemler bulunmaktadır. Kromatografik olarak genellikle gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi veya elektrokimyasal ya da floresans dedektörlü HPLC yöntemleri rapor edilmişse de, bu sistemlerin uzmanlık gerektirmesi, yüksek maliyeti ve karmaşıklığı araştırma laboratuvarlarında yaygın kullanımını kısıtlamaktadır. Öte yandan, elektro-analitik yöntemler daha düşük maliyetli olmakla birlikte dedeksiyon limiti ve seçicilik açısından yeterince duyarlı değildir [4].

Bu tez çalışmasının amacı, çeşitli antioksidan bileşikler varlığında (polifenolik bileşikler, tiyol tipi antioksidanlar vb.) metiyonini kolay, hassas, ucuz ve yüksek seçicilikte tayin edebilen yeni bir optik yöntem geliştirmektir. Önerilen yöntemde öncelikle DPPH kullanılarak ortamda bulunan antioksidanların etkisi giderilmiş, ardından metiyonin tayini AuRAC (Altın(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) prensibine dayalı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

### 2.1. AMİNO ASİTLER

Amino asitler, hem amino grupları ( $-\text{NH}_3^+$ ) hem de karboksilat grupları ( $-\text{COO}^-$ ) içeren önemli biyomolekül sınıfıdır. Amino asitler terimi,  $\alpha$ -karbonuna hem amino hem de karboksil grupları bağlı olduğu için  $\alpha$ -amino asitleri ifade eder (Şekil 2.1(a)). Ancak, amino ve karboksil gruplarının zincirdeki farklı karbonlara bağlandığı  $\beta$ -amino asitler gibi başka amino asit türlerine de doğada rastlanır. Örneğin, farklı 'R' gruplarına sahip doğal amino asitler arasında alanin,  $\beta$ -alanin ve fosfinotrisin yer alır; burada özellikle  $\beta$ -alanin'de amino grubunun  $\beta$ -karbona bağlı olduğuna dikkat edilmelidir (Şekil 2.1(b)).

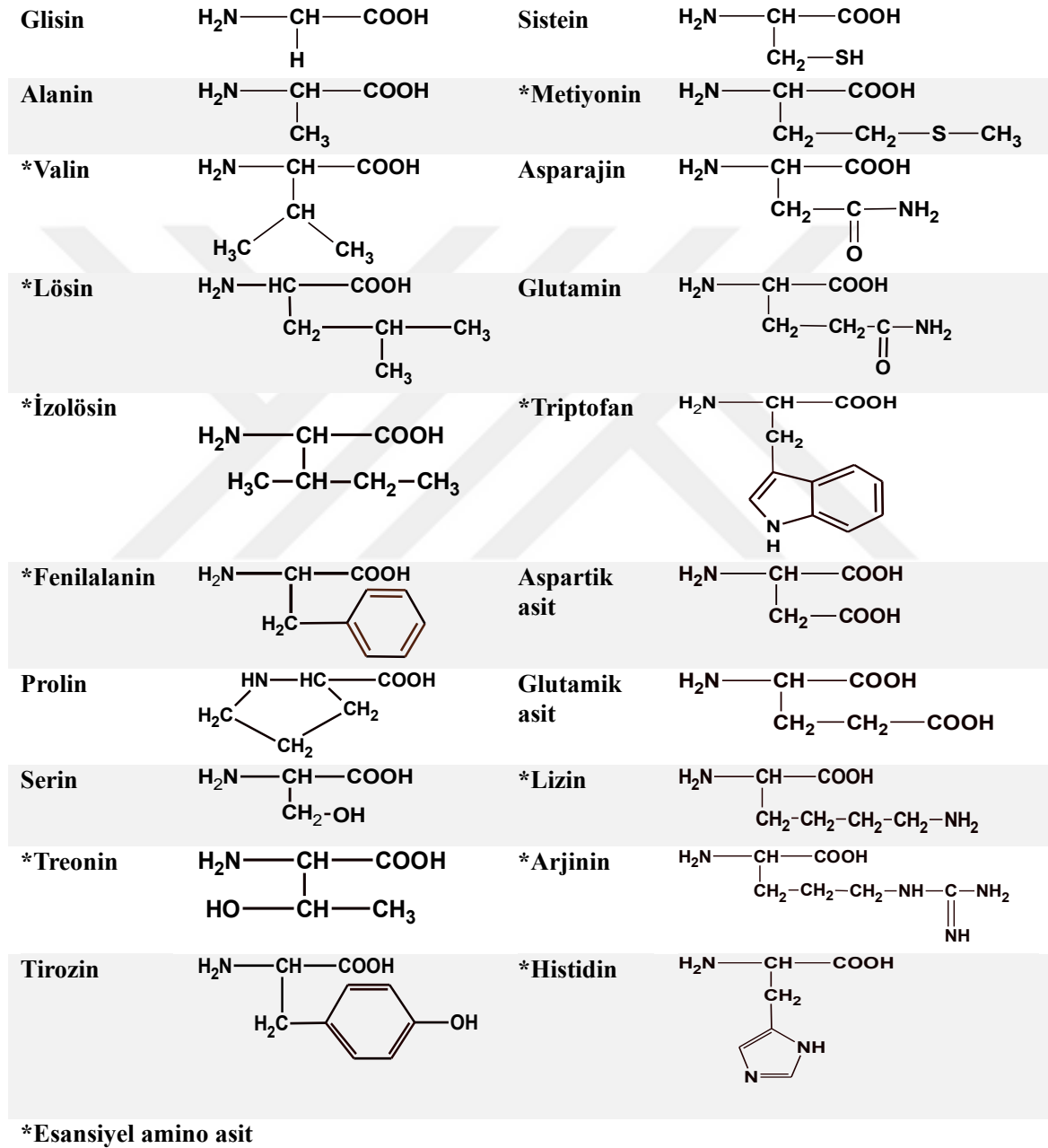


Şekil 2.1: Amino asitlerin yapısal özellikleri.

Tüm  $\alpha$ -amino asitler (glisin hariç)  $\alpha$ -karbon atomuna bağlı -H, -COOH,  $-\text{NH}_2$  ve R grubu olmak üzere dört farklı grup bağlıdır. Bu nedenle kiral moleküllerdir. Kiralite el tercihi olarak da adlandırılır, bir maddenin ayna görüntüsü ile örtüşmemesi veya üst üste çakışmamasıdır. Doğada bulunan amino asitlerin hemen hemen hepsi,  $\alpha$ -karbon açısından aynı kiraliteye sahiptir ve kimyasal isimlendirme kılavuzlarına göre L-amino asitler olarak adlandırılır. Nadir, stereoizomer, ayna görüntüsündeki karşılıklarına D-amino asitler denir.

Yüzlerce amino asit tanımlanmış veya sentezlenmiş olsa da, bunlardan 20'si genellikle yaygın amino asitler olarak adlandırılır. Bunlar Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Biyolojik sistemlerde, bu amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır. Bitkiler ve birçok bakteri, Şekil 2.2'de listelenen 20 amino asidin hepsini sentezler. Amino asitler, canlı hücrelerdeki çeşitli birincil

metabolitlerden sentezlenir. Ancak, insanlar da dahil olmak üzere omurgalılar, bu amino asitlerin yalnızca bir alt kümesini üretebilirler. Bu nedenle, amino asitlerinin geri kalanını diyetlerinden elde etmeleri gerekir. Bu şekilde elde edilmesi gereken amino asitlere esansiyel amino asitler denir. İnsanlar için dokuz esansiyel amino asit vardır: histidin, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan ve valindir [5].



Şekil 2.2: Yaygın amino asit [6].

### 2.1.1. Amino Asitlerin Sınıflandırılması

Polar olmayan alifatik zincire sahip nötr amino asitler, Glisin yan zincirinde yalnızca bir hidrojen bulunur ve polar gruplar, karboksil ve amin, molekülde baskın bir role sahiptir. Metil grubu yan zincirine sahip Alanin, hidrofobik zincirler içerenlere göre suda daha çözünürdür. Valin, lösin, ve isolösin, polar olmayan dallanmış zincirlere sahiptir.

İyonlaşmayan polar zincire sahip nötr alifatik amino asitler, Serin ve treonin, yan zincirlerinde bu amino asitlere polar özellikler kazandıran bir hidroksil fonksiyonel grubu içerir.

Aromatik nötr amino asitler, Benzen halkası içeren fenilalanin ve indol heterosiklik yan zincire sahip triptofan, belirgin şekilde polar olmayan ve hidrofobiktir. Tirozin, bu amino asidin polaritesine katkıda bulunan bir fenolik hidroksile sahiptir.

Asidik (dikarboksilik) amino asitler, Aspartik asit ve glutamik asit, vücut sıvılarının pH'ında bir proton salabilen ve negatif yük kazanabilen ek bir karboksil grubuna sahip amino asitlerdir. Genellikle, bu amino asitler sırasıyla iyonize formlarının adı olan aspartat, ve glutamat ile belirtilir.

Bazik amino asitler, Lözin ek bir amin fonksiyonel grubuna ve arginin bir guanidin grubuna sahiptir, her ikisi de proton kabul edebilir. Fizyolojik pH'ta, bu amino asitlerdeki kalıntılar pozitif bir elektrik yükü gösterir. Histidinin yan zinciri, heterosiklik imidazol yan zinciridir. Histidinin yan zinciri yaklaşık 6,0'lık bir iyonizasyon pKa değerine sahiptir, bu nedenle bir baz görevi görebilir. Bazik amino asitler, yani lizin ve histidin, yüksek derecede polar bileşiklerdir.

Kükürt içeren amino asitler, Metiyonin ve sistein , Sistein hafif polar özellik gösteren bir sülfhidril grubu (-SH) içerir. pH 9 seviyesinde bu grup bir proton (H<sup>+</sup>) serbest bırakabilir. Metiyonin ise apolar bir yan zincire sahiptir [7].

### 2.1.2. Amino Asit Üretimi

Dünya genelinde amino asit üretimi 2014'te yaklaşık 6,5 milyon ton civarındaydı ve pazar hacminin yılda yaklaşık % 6-8 oranında büyümeye devam etmesi beklenmektedir. Günümüzde glutamik asit (monosodyum tuzu olarak), lizin (hidroklorür tuzu olarak), metiyonin ve treonin toplam pazar hacminin % 95'inden fazlasını kapsamaktadır; bu aminoasitler esas olarak gıda ve hayvan yemleri uygulamalarında yer almaktadır (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1:** En önemli amino asitlerin üretimi ve kullanım alanları.

Amino Asit	Üretim Yöntemi	Uygulama Alanı	Pazar Hacmi [Mton]
Monosodyum L-glutamat	<i>C. glutamicum</i> ile fermentasyon	Gıdalarda tat artırıcı	3
L-lizin hidroklorür	<i>C. glutamicum</i> ile fermentasyon	Hayvan yemi besin katkısı	2,4
D,L-metiyonin	Kimyasal sentez	Hayvan yemi besin katkısı	1
L-treonin	<i>E. coli</i> ile fermentasyon	Gıda ve yem besin katkısı	0,6

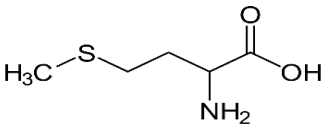
Ancak, dünya nüfusunun artması ve daha fazla et tüketme eğilimi ile daha ucuz amino asitlere olan talep, kimya şirketleri ve ana amino asit üreticileri için yeni zorluklar ve fırsatlar sunacaktır

Amino asitlerin endüstriyel üretiminde uygulanan yöntemler dört kategoriye ayrılabilir:

- mikrobiyal aerobik fermentasyon
- enzimatik kataliz
- kimyasal sentez
- doğal kaynaklardan ekstraksiyon

Her bir amino asit için en uygun yöntem seçimi, süreç ekonomisine, pazar büyüklüğüne, hammadde mevcudiyetine ve çevresel düzenlemelerine bağlıdır [8].

## 2.2. METİYONİN

L- Metiyonin	
IUPAC adı	L-2-amino-4-(metiltiyo) bütanoik asit
Molekül formülü	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S
Molekül kütlesi	149,21g/mol
Çözünürlük (su içinde)	53g/L (20 °C)
pK <sub>a1</sub> (-COOH)	2,28 (25°C)
pK <sub>a2</sub> (NH <sub>2</sub> )	9,21 (25°C)
izoelektrik nokta (pI)	5,74 (25°C)

**Şekil 2.3:** Metiyoninin formülü ve bazı önemli özellikleri [10].

L-Metiyonin,  $C_5H_{11}NO_2S$  kimyasal formülüne sahiptir ve kükürt içeren temel bir amino asittir. Ayrıca 2-amino-4-(metiltiyo) bütanoik asit, metil merkaptobütirik asit adlarıyla da bilinir. Mueller, metiyonini 1921'de keşfetmiş olsa da yapısı 1928'e kadar belirlenememiştir. Metiyonin, diğer amino asitlerle birlikte karaciğerde protein sentezinde rol oynar. Metiyonin, insanın vücudu tarafından kendi başına üretilmediği için temel bir amino asittir. Yetişkin bir kişinin günlük ihtiyacı ortalama 20 mg/kg'dır [9].

## 2.2.1. Metiyoninin Önemi Ve Kullanımı

### 2.2.1.1. Hayvancılıktaki Önemi

Üretilen metiyoninin çoğu hayvancılık üretiminde hayvan yemi olarak kullanılır. Kimyasal olarak üretilen sentetik DL-Metiyonin çoğu uygulama için kullanılabilir. 2013 yılında, dünya pazarı yılda 600,000 tonun üzerindedir. Ancak organik tarımda sentetik olarak üretilen metiyoninin kullanımı yasak veya güçlü bir şekilde sınırlandırılmıştır.

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) kullanmadan doğal kaynaklara dayalı "eko metiyonin" talebi gelecekte güçlü bir şekilde artacaktır. Bu nedenle, organik tarım kurallarını karşılayan, maliyet tasarrufu sağlayan yem sınıfı L-metiyonin arayışı, son zamanlarda, GDO kullanmadan, tüm potansiyel metiyonin açısından zengin tüm bitkiler veya hayvan materyalleri, kalıntıları ve atıklarını yanı sıra, doğal kaynakların fermantasyonunu ve enzimatik dönüşümünü kullanılarak yoğunlaşmaktadır [10].

### 2.2.1.2. İnsanlarda Önemi

Metiyonin, diyetle vazgeçilmez bir amino asittir (AA); yani vücut tarafından sentezlenemez ve mutlaka besin yoluyla alınmalıdır. Metiyoninin başlıca işlevleri şunlardır:

- Metaboliti (SAM) yoluyla in vivo ortamda ana metil grubu donörü olarak görev yapar. SAM, poliamin sentezi, fosfolipitlerin metilasyonu ve DNA/RNA ara ürünleri gibi birçok biyokimyasal süreçte metil grubu kaynağı olarak kullanılır [10].
- Met türevi N-formilmethionil-tRNA protein biyosentezinin başlamasında görev alır.
- Metiyonin ayrıca insan hücrelerinde sistein redoks tamponu ve başlıca antioksidan olan glutatyon metabolizmasında da rol oynar [11,12].
- Drazic ve Winter (2014) in vivo'da geri dönüşümlü metiyonin oksidasyonunun fiziksel rolünü tanımlamıştır [13]. Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra, metiyonin sülfoksit redüktazlar, insan metabolizması da dahil olmak üzere yüksek ökaryotlarda önemli bir rol oynar, örneğin, protein fonksiyonunun düzenlenmesi ve dolayısıyla yaşlanma süreçlerinde, nörodejeneratif hastalıklarda ve kanserde önemli bir rol oynar [14-17].

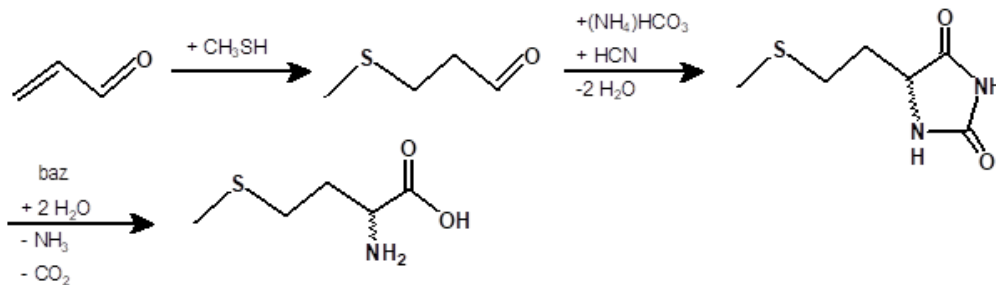
- Metiyonin oksidasyonunun, aerobik yaşam tarzının kaçınılmaz bir sonucu olarak çok sayıda proteinin aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir.
- Son çalışmalar, metiyonin kısıtlamasının memelilerin (fareler, sıçanlar), böceklerin (*Drosophila melanogaster*) ve mayanın (*Saccharomyces cerevisiae*) yaşam süresini uzatabileceğini kanıtlamaktadır. Ancak, bu gözlemin genelleştirilip genelleştirilemeyeceği tartışmalıdır [18-20]. Ayrıca, metiyonin sistein sentezinde öncül olarak görev yapar: kükürt atomunu transsülfürasyon (TS) süreci yoluyla sisteine bağışlar [10].

## 2.2.2. Metiyoninle İlişkili Hastalıklar

- Kükürt içeren amino asitlerin sağlık üzerindeki etkisi Townsend ve arkadaşları (2004) tarafından incelenmiştir [21].
- Gıdalardaki metiyonin eksikliği, toksemi, çocukluk çağı romatizmal ateş, kas felci, saç dökülmesi, depresyon, şizofreni, Parkinson hastalığı, karaciğer bozulması ve büyüme bozukluğu gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [22].
- İnsanlarda metiyonin metabolizmasının bozulmasından kaynaklanan bazı nadir kalıtsal hastalıklar, zihinsel gerilik, gelişme geriliği, trombositopeni, kulüp ayak, iskelet anormallikleri, lens çıkığı ve işitme kusurları gibi semptomlara neden olan sistatyoninüri ve homosistinüri=hipermetiyoninemidir. Metiyonin seviyesi, düzensiz metiyonin metabolizması nedeniyle güçlü bir şekilde artar [23].

## 2.2.3. Metiyonin Kaynakları

### 2.2.3.1. Kimyasal Sentez



Şekil 2.4: Bikarbonattan D,L-metiyonin'in kimyasal sentezi.

DL-Metiyonin esas olarak metil merkaptan, akrolein ve hidrojen siyanürden kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir. Ancak azalan fosil kaynaklar ve daha güçlü çevresel kısıtlamalar (tehlikeli ara ürünler ve atıklar) ışığında, Alternatif, daha sürdürülebilir, doğal kaynaklara dayalı olan prosesler giderek daha fazla ilgi çekiyor [24, 25].

### **2.2.3.2. DL-Metiyonin'in L-Metiyonin'e Enzimatik Dönüşümü**

Farmasötik ve tıbbi uygulamalar genellikle kiral saf L- veya D- metiyonin gerektirdiğinden, DL-rasemik karışımını saf izomerlere dönüştürmek için çeşitli işlemler süreçler mevcuttur. En iyi bilinen ve endüstriyel olarak uygulanan işlem, DL-metiyoninin asetilasyonundan sonra N-asetil DL-metiyonine enzimatik dönüşümüdür. Daha sonra L-izomer, L-amino asilaz enzimi aracılığıyla enzimatik olarak L-metiyonine dönüştürülür; ardından alkollü ekstraksiyon veya kristalizasyon yöntemleriyle ayrılır ve iyon kromatografisi ile saflaştırılır. Bu işlemle yılda birkaç yüz ton farmasötik kalitede L-metiyonin elde edilmektedir [10].

### **2.2.3.3. Öncü Maddelerden Fermantasyon Yoluyla L-Metiyonin Üretimi**

Optik olarak saf L-metiyonin elde etmenin alternatif bir yöntemi, kimyasal veya biyolojik yollarla sentezlenmiş öncü maddelerin enzimatik veya fermantatif dönüşümüdür. 5'-monosüstitüe hidantoin türevlerinin enzimatik hidrolizi, optik saflıkta L-amino asitlerin üretimini mümkün kılmaktadır. İlgili enzimlerin tarihi ve biyoteknolojik önemi Syldatk ve arkadaşları (1999) tarafından incelenmiştir [26].

1990'ların sonlarında Degussa firması, D-5-(2-metiltioetil)hidantoin öncüsünü kullanan hidantoinaz bazlı bir proses için enzimleri yönlendirilmiş evrim (directed evolution) yöntemiyle genetik olarak optimize etmeye yönelik çalışmalar yürütmüştür. Bu yaklaşım, optik olarak saf L-metiyonin üretimini hedeflemiştir [27-29]. Diğer yazarlar, özel öncüllerin fermantasyonu veya enzimatik dönüşümü ile L-metiyonin üretimini rapor etmektedir [30].

Başka bir CJ patenti (Cheil Jedang (CJ) Patent), öncü madde O-asetilhomoserin'in enzimatik dönüşümünü rapor etmektedir [31]. Arkema'ya ait 2013 tarihli bir CJ patenti ise, gaz hâlindeki metil merkaptan (=metantiyol) ile bir öncü maddenin enzimatik dönüşümünü iddia etmektedir [32]. Ancak, öncü maddelerin çoğunlukla kimyasal olarak sentezlenmesi ya da ilk aşamada fermantasyon yoluyla üretilmesi gerektiğinden, bu yöntemin daha önce bahsedilen proseslere kıyasla belirgin bir avantajı bulunmamaktadır. Bununla birlikte, bu yaklaşımın tıp veya eczacılık gibi özel uygulamalar için ya da petrokimyasal kaynaklar kullanılmaksızın sürdürülebilir bir üretim prosesi geliştirmek amacıyla anlamlı olabileceği düşünülmektedir.

### **2.2.3.4. Doğal Kaynaklardan Fermantasyon Yoluyla L-Metiyonin Üretimi**

Yukarıda da belirtildiği gibi, L-metiyonin'in doğal kaynaklardan fermantasyonu birçok sorunu çözebilir. Ancak, bu yöntemin temel dezavantajı, metiyonin biyosentezinin oldukça karmaşık olması ve çok sayıda geri besleme inhibisyonu ile düzenlenmesidir. Ek bir sorun ise

kükürt kaynağıdır. Kükürt genellikle inorganik sülfat formunda sağlanır ve metiyonine aktarılmadan önce büyük ölçüde indirgenmesi gerekir. Bu nedenle, metiyonin fermantasyonlarında indirgenmiş kükürt kaynaklarının kullanımı faydalı olabilir [10].

#### **2.2.3.5. Fermentasyonla Üretilen L-Metiyonine Alternatifler**

Doğal olarak üretilen L-metiyonin yem bitkilerinde ve hayvanlarda bulunabilir. Yumurta (özellikle albumin, % 5) yüksek metiyonin içerir. Brezilya cevizi gibi bazı bitki tohumları metiyonin açısından zengindir (% 12'ye kadar). Diğer bitkisel protein kaynakları arasında soya keki, susam keki, nohut, buğday, mısır ve patates proteini yer alır. Hayvansal protein son zamanlarda araştırılmaktadır.

Potansiyel kaynaklar böcekler ve larvaları veya solucanlar gibi hızlı büyüyen hayvanlardır. Yeniden işlenmiş hayvan kalıntılarının (et unu, balık unu, kemik unu, tüy unu) kullanımı sağlık riskleri nedeniyle birçok ülkede kısıtlanmıştır [10]. Tek hücreli protein 1970'lerde kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. En çok araştırılan hücreler maya, algler ve metilotrofik bakteriler gibi mikroorganizmalar üzerinde çalışmalar yapılmıştır; kuru hücrelerin içeriği % 50'si protein olabilir ve optimize koşullarda bu oran % 85'e çıkabilir. Ne yazık ki bazı kirletici maddeler mikotoksin üretebilir ve mayalarda genellikle metiyonin eksikliği vardır [33,34].

Protein açısından zengin bitkisel veya diğer karmaşık amino asit kaynaklarının beslenmesindeki önemli bir dezavantaj, başlıca esansiyel amino asitlerde dengesizlik riski oluşturmasıdır. Bu nedenle, en uygun amino asitlerin izole edilmiş maddeler halinde veya uygun bir konsantrasyon karışımı halinde sağlanması önemlidir. Kümes hayvanı yetiştiriciliği durumunda, metiyonin, fermentasyonla veya Met açısından zengin hammaddelerin (tüyler, kıllar, tırnaklar, fındıklar, bezelye) enzimatik işlemiyle veya proteinlerin hidrolizi ve ardından ayırma ve saflaştırma yoluyla izole edilmelidir [35-38].

Başka bir yaklaşım, amino asit içeriklerini ve dengelerini etkilemek için metiyonin açısından zengin materyalin (proteinler) genlerini yem bitkilerine (örneğin patates, kanola) dönüştürmektir.

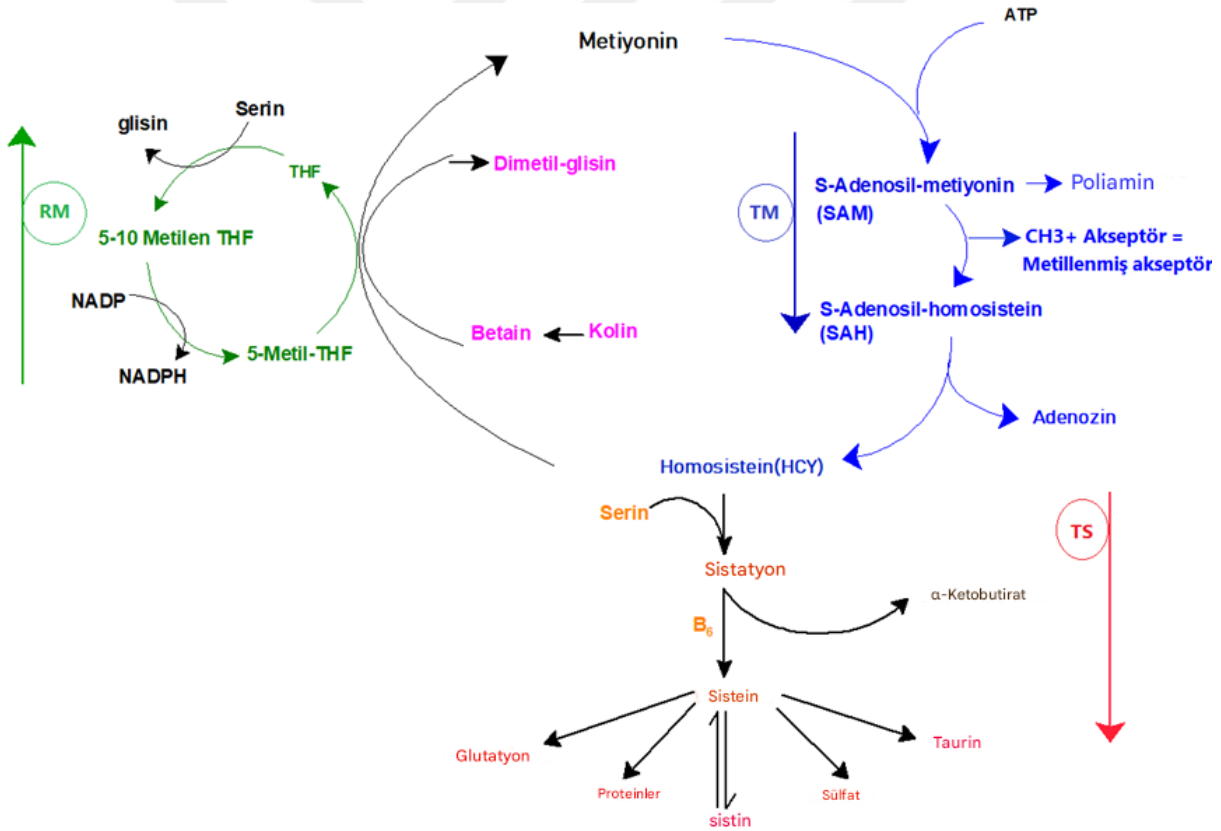
Organik tarımda protein eksikliğini , özellikle metiyonin eksikliğini tamamen kapatacak kesin bir çözüm yoktur. bölgesel ve işletme koşullarına göre çeşitli önlem paketleri uygulanacaktır [10].

## 2.2.4. Metiyonin Metabolizması

Vazgeçilmez AA metiyonin üç ana yolla metabolize edilir (Şekil 2.5); Transmetilasyon (TM) , Transsülfürasyon (TS) ve Remetilasyon (RM) [40].

TM yolunda metiyonin homosistein'e parçalanır. TM yolu, metiyoninin ATP tarafından aktive edilerek metiyonin adenosiltransferaz enzimi katalize edilerek S-adenosil-metiyonin (SAM) oluşturmasıyla başlar. SAM, metil grubunu bağışlar ve bu proste S-adenosil-homosistein (SAH) oluşturur, adenozin ve homosistein elde etmek için hidrolize edilir. Daha sonra Homosistein, metiyonin oluşturmak üzere yeniden metillenebilir veya sistein oluşturmak üzere TS yoluna girebilir [40].

RM yolu, metiyoninin homosisteinden yeniden sentezlenmesini, iki yoldan birinden sağlanan metil gruplarının kullanılmasıyla mümkün kılar [40,41].



Şekil 2.5: Metiyonin metabolizmasına giden yollar [39].

Folat koenzim sisteminde, metiyonin sentaz enzimi, metillenmiş folik asitten (N5-Metil-tetrahidro-folat, MTHF) bir metil grubunun B12 vitamini yardımıyla homosisteine transferini katalize eder. Bu, vücutta bu folat formunun geri dönüşümünü sağlayan tek reaksiyondur [41]. Bu reaksiyonda SAM inhibitör, SAH ise aktivatör olarak görev yapar. Metil grubu, esansiyel olmayan amino asit olan serinden sağlanır. MTHF sentezinin son basamağı,

NADH'ın elektron donörü olarak kullanıldığı, N5,N10-metilen-THF'nin geri dönüşümsüz indirgenmesidir. Başka bir yolda (sadece insanlarda karaciğer, böbrek ve göz merceğinde), homosisteine (Hcy) aktarılan metil grubunun kaynağı betain olup, bu reaksiyon betain-homosistein metiltransferaz enzimi tarafından katalizlenir. Betain, ya doğrudan diyetle alınan hazır betain kaynaklarından, diyet kolininden veya fosfatidiletanolaminin SAM'a bağlı metilasyonundan sentezlenen kolinden türetilir [40]. Folatla dolu dokularda, Hcy'nin yeniden metilasyonu çoğunlukla folata bağlı yolla gerçekleşir. Folat eksikliği durumlarında veya betain veya kolin seviyeleri yüksek olduğunda, betain önemli bir metil donörü haline gelir [40].

TS yolu, Hcy'nin geri döndürülemez bir şekilde sistatyonine ve daha sonra sisteine dönüşmesine olanak tanır. TS yolunda metiyonin ve serin, sisteyinin ve amino asidin türevlerinin öncüleridir [41]. TS yolunun ilk adımı, sistatyonin  $\beta$ -sentaz enzimi tarafından katalize edilen geri dönüşümsüz reaksiyonda Hcy ve serin'in yoğunlaşarak sistatyonin oluşturmasıdır. İkinci reaksiyonda, sistatyonin, sistatyonaz enzimi (sistatyonin  $\gamma$ -liyaz) tarafından hidrolize edilerek sisteyin,  $\alpha$ -ketobütirat ve amonyak oluşur. TS yolu, metiyoninin karbon zincirinin oksidatif katabolizmasından ve metiyoninin kükürt atomunun serine aktarılması yoluyla sisteyin sentezinden sorumludur [40]. Bu nedenle, TS yolu metiyonindeki kükürdün GSH (glutatyon) sentezinde kullanılmasına olanak tanır. Aynı zamanda taurin, sülfat, koenzim A bileşiklerin sentezine de katkıda bulunur [42].

TM, RM ve TS yolları boyunca metiyoninin trafiği, mevcut metiyonin düzeylerine yanıt olarak SAM tarafından düzenlenir. Metiyonin konsantrasyonu yüksek olduğunda, SAM konsantrasyonu artar ve bu da Sistatyonaz  $\beta$ -sentaz'ı artırır. Bu, aşırı metiyoninin geri döndürülemez oksidasyonu ile TS'yi artırır [43,44].

### 2.3. ANTIOKSİDANLAR

Otooksidasyon, serbest radikal zincir reaksiyonunu içeren lipidlerin bozulmasının temel yollarından biridir [45]. Gıda lipidlerinin oksidasyonu, hasat ve depolama sırasında ve ayrıca gıda işleme süreçlerinin çeşitli aşamalarında meydana gelebilir; bu durum, istenmeyen tatlara sahip uçucu bileşiklerin oluşumuna ve toksik bileşiklerin oluşumuna yol açar. Ek olarak, esansiyel yağ asitleri, yağda çözünen vitaminler ve diğer biyoaktif maddeler oksidasyon sırasında kaybolabilir. Canlı organizmalarda, membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitleri, aerobik metabolizma sırasında veya oksitleyici ajanların varlığında oksidasyona uğrar. Bu süreç oksidatif hasara, özellikle geri döndürülemez hücre bozulmasına ve kolesterol,

proteinler, enzimler, lipoproteinler ve DNA gibi hücrel ve hücre dışı bileşenlerin doku hasarına neden olabilir, dolayısıyla iltihaplanma, ateroskleroz, karsinogenez ve yaşlanma gibi çok sayıda hastalık ve sağlık durumuyla ilişkilendirilir. Proteinler, lipidlere göre daha yüksek oranda oksidasyona uğrar. Canlı dokulardaki protein oksidasyonuna büyük önem verilmiştir; çünkü Alzheimer gibi dejeneratif hastalıkların oluşumunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Antioksidanlar lipid oksidasyonu engellemek için en önemli savunma mekanizması sağlar. Düşük konsantrasyonlardaki antioksidanlar, oksidasyona bağlı kalite bozulmasını, ekşimeyi veya renk bozulmasını geciktirerek gıdayı korur. Bu maddeler doğal olarak gıdanın bir bileşeni olarak mevcut olabilir (tokoferoller ve askorbik asit) veya gıdanın işlenmesi sırasında oluşabilir (Maillard reaksiyon ürünleri). Bununla birlikte, genellikle gıda işleme, doğal olarak mevcut olan antioksidanların kaybına neden olur, dolayısıyla harici antioksidan kaynaklarının tanımlanmasını ve test edilmesini gerektirir. Gıda ürünlerinde kullanılan antioksidanlar toksik olmamalı, işleme sırasında stabil olmalı, herhangi bir koku veya tat içermemeli, çözünür olmalı, ucuz olmalı ve düşük konsantrasyonlarda etkili olmalıdır [46].

### 2.3.1. Sentetik Antioksidanlar

Sentetik antioksidanlar laboratuvarında sentezlenerek çeşitli uygulamalarda, özellikle gıda katkı maddesi olarak kullanılması amaçlandı. Ayrıca, doğal antioksidanları karşılaştırma amacıyla standart görevi görmektedir. Bu antioksidanlar gıda endüstrisi tarafından 70 yıldan fazla kullanılmaktadır. Sentetik antioksidanlar ürünlerin raf ömrünü uzattıkları için çok önemlidirler. Gıda antioksidanları pazarının büyüklüğü 2022'de yaklaşık 3 milyar ABD dolarıdır ve 2032'de 5 milyar ABD dolarını aşması beklenmektedir [47]. Bu pazar, et ürünleri, işlenmiş gıdalar, fırıncılık ve şekerleme, yağlar, içecekler ve diğerlerinden oluşmaktadır ve pazarın % 30'una kadar olan kısmını oluşturmaktadır.

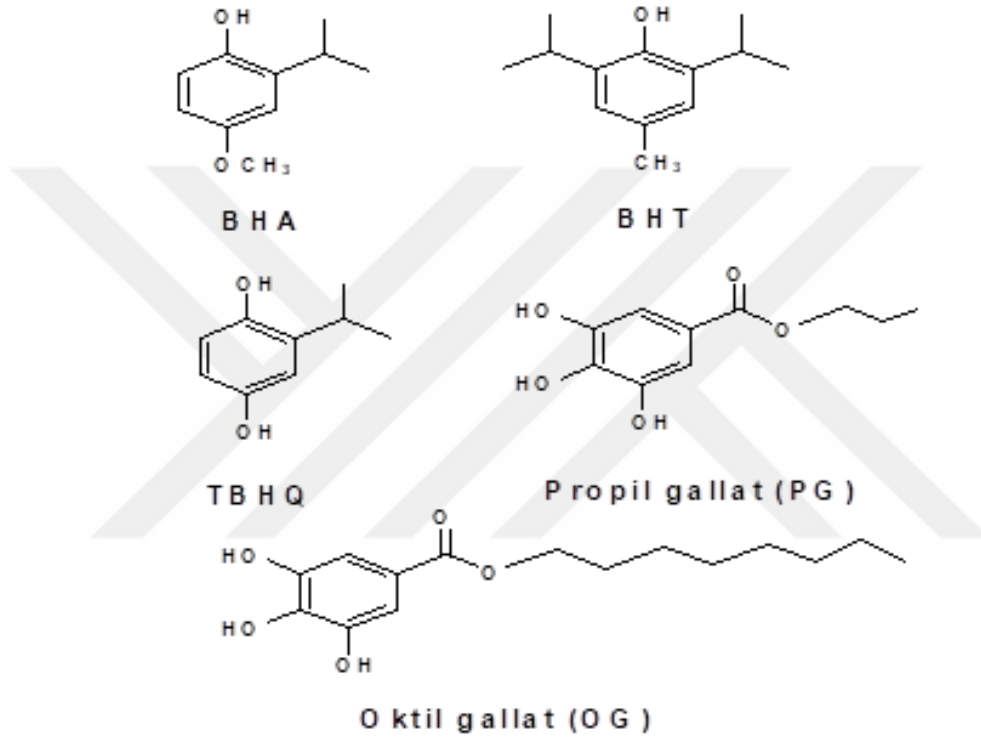
En önemli ve en çok kullanılan sentetik antioksidanlar, fenolik antioksidanlardır, bunlar Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ), Propil gallat (PG) ve oktil gallat; kimyasal yapıları Şekil 2.6'te gösterilmektedir.

Yukarıda bahsedilen sentetik antioksidanların (Şekil 2.6) başlıca dezavantajları, insan sağlığında kullanımından kaynaklanan yan etkilerdir ve bunlar Tablo 2.2'de listelenmiştir [48].

Örneğin, BHA ve BHT, özellikle gıda ve farmakolojik amaçlar için en yaygın kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak, her iki antioksidanın da laboratuvar hayvanlarında yüksek

konsantrasyonlarda kullanıldığında, muhtemelen karaciğer hasarı ve karsinogenez gelişimiyle ilişkili olduğu keşfedilmiştir [53].

Sonuç olarak, bu bileşiklerin olası toksisiteleri hakkındaki keşifler, hükümetlerin sentetik antioksidanların kullanımına ilişkin sıkı düzenleyici kurallar koymasına yol açmış ve bu kullanımın gıda koruyucularıyla sınırlanmasını sağlamıştır [45,54]. Bu bağlamda, doğal antioksidanlara olan ilgi, bunların çeşitli doğal ve yenilenebilir kaynaklarda geniş ölçüde bulunması ve insan sağlığı açısından güvenli olmaları nedeniyle artmıştır.



Şekil 2.6: Başlıca sentetik antioksidanların yapıları.

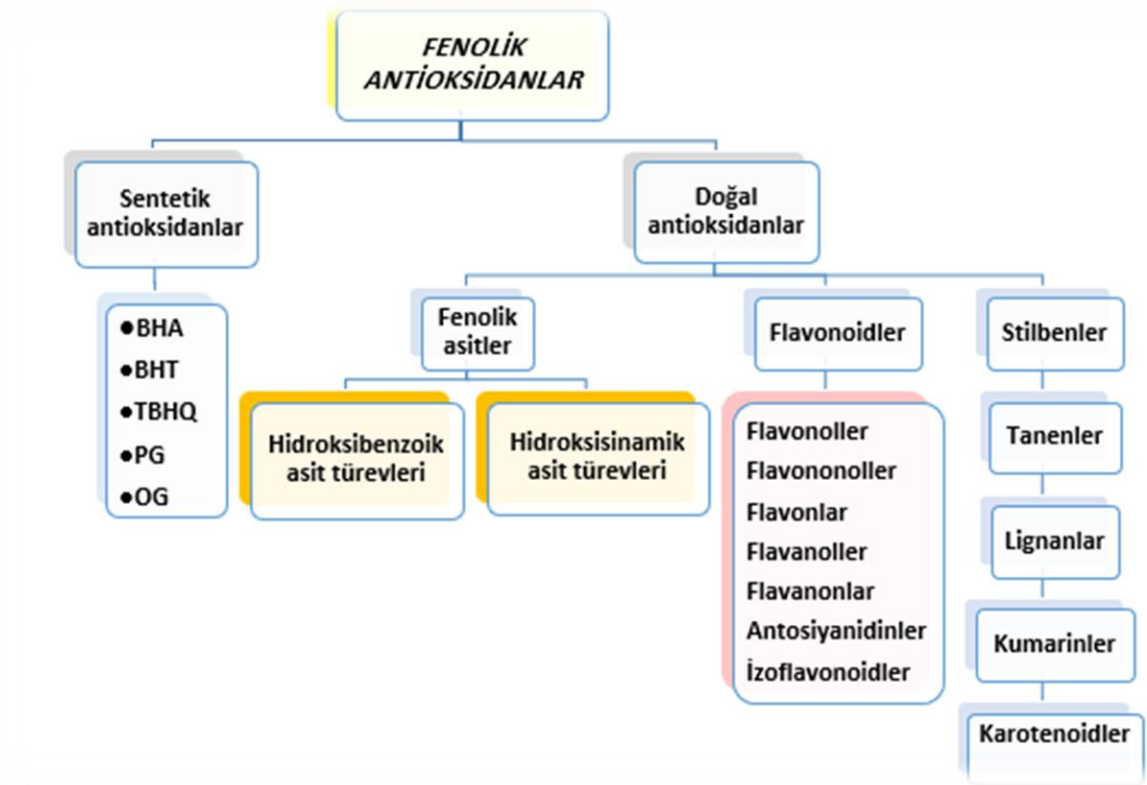
Tablo 2.2: Sentetik antioksidanların insan sağlığına verdiği zararlar.

Antioksidan	Yan etki/zarar	Kaynaklar
BHA	Karaciğer hasarı, Kanseri oluşumu, DNA hasarı	[49-52]
BHT	Karaciğer hasarı, Kanseri oluşumu, DNA hasarı	[49-52]
PG	Karaciğer toksisitesi, Kanseri oluşumu	[45]
TBHQ	DNA hasarı	[51]

### 2.3.2. Doğal Antioksidanlar

Sentetik antioksidanların toksisitesi ve istenmeyen etkileri nedeniyle, bitkilerden elde edilen doğal antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizleyerek oksidatif stresin ve çeşitli hastalıkların oluşumunu önleyen daha güvenli bileşikler olarak tercih edilmektedir.

Doğal antioksidanların çoğunluğu, fenolik bileşiklerdir. Bunlar bitkiler, tohumlar, sebzeler, kuruyemişler, yapraklar, meyveler, kabuklar, kök, unları, mantarlar, mikroorganizmalar ve hayvansal dokularda bulunabilir. Ek olarak, fenolik bileşikler, antioksidan, antikarsinojenik, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antimutajenik özellikler dahil



Şekil 2.7: Fenolik antioksidanların sınıflandırılması.

olmak üzere biyolojik aktiviteleriyle bilinmektedir [48]. En önemli fenolik bileşikler fenolik asitler, tanenler, lignanlar, flavonoidler ve terpenlerdir [45,55]. Doğal antioksidanlar ve fenolik olanlar arasında en önemli gruplar fenolik asitler, koferoller ve flavonoidlerdir. Şekil 2.7, fenolik antioksidanların literatüre göre sınıflandırılmasını göstermektedir [48].

Doğal antioksidanların tüm dünyadaki önemi, pazarlarının büyüklüğüyle ölçülebilir. Son bir rapora göre, 2021'deki doğal antioksidanların pazar değeri yaklaşık 1,02 milyar ABD dolarıydı ve 2030 yılı için gelir tahmini 1,85 milyar ABD dolarıdır. Ayrıca rapor, bu pazardaki ana antioksidanların, çoğunlukla katkı maddeleri, kişisel bakım, yiyecek ve içecekler, ilaçlar,

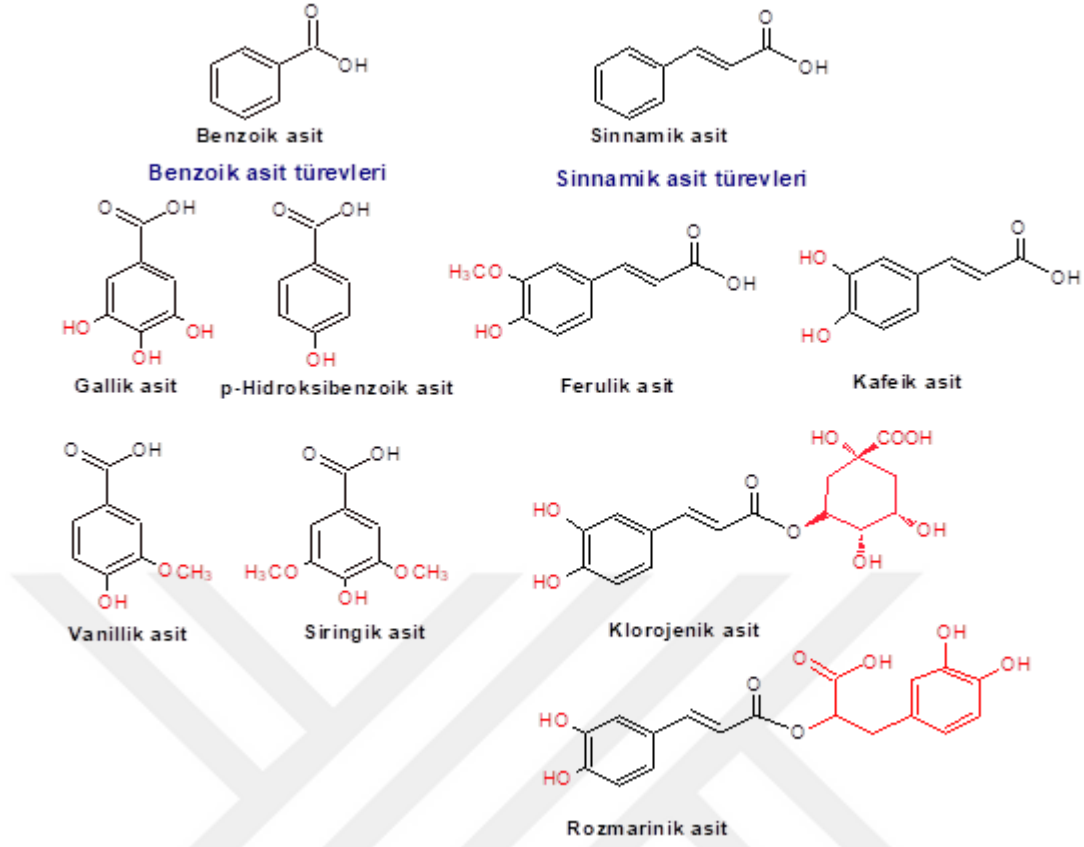
hayvan yemi vb. gibi çeşitli uygulamalarda kullanılan C vitamini, E vitamini, polifenoller, karotenoidler vb. olduğunu da gösteriyor [46].

Şekil 2.8, antioksidan aktiviteye sahip çok çeşitli doğal fenolik bileşikleri göstermektedir; bunlardan flavonoidler (flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, flavanonlar ve kalkonlar) ise şekil 2.9'de sunulmuştur.

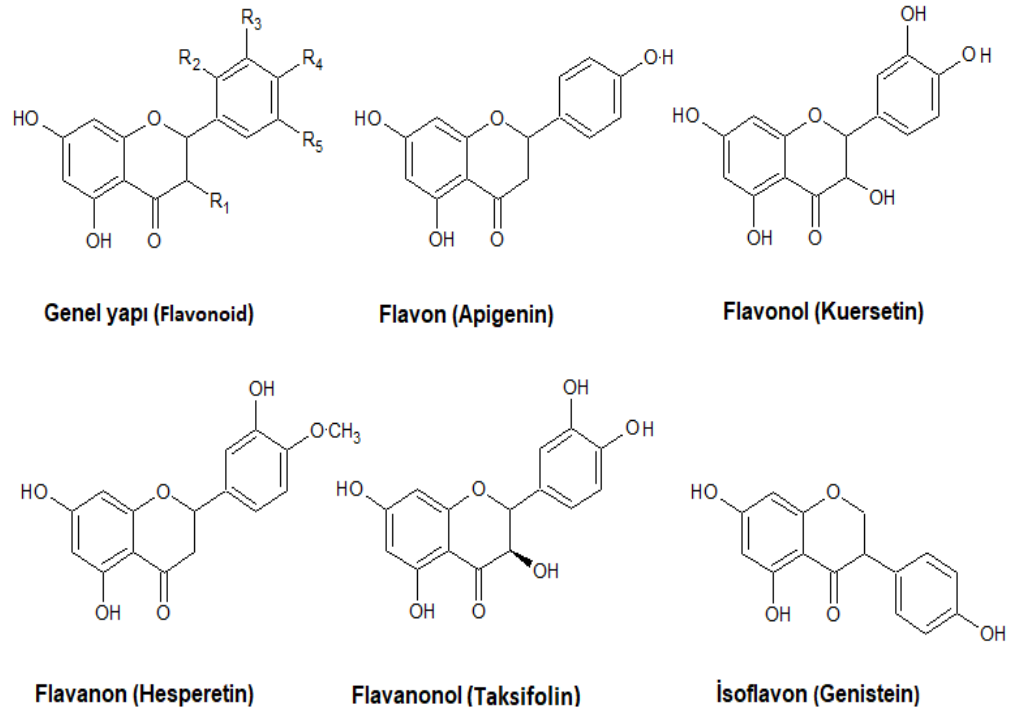
Sentetik ve doğal antioksidanların kullanımına ilişkin avantajlar ve dezavantajlar vardır; bunlar Tablo 2.3'te sunulmuştur [48].

**Tablo 2.3:** Antioksidan temel avantajları ve dezavantajları.

<b>Sentetik antioksidanlar</b>	<b>Doğal antioksidanlar</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük maliyetlidir</li> <li>• Birçok farklı uygulamada kullanılabilir</li> <li>• Orta ila yüksek düzeyde antioksidan aktiviteye sahiptir</li> <li>• Toksik</li> <li>• Bazılarının kullanımı yasaklanmıştır</li> <li>• Suda çözünürlükleri düşüktür</li> <li>• İlgi azalmaktadır</li> <li>• Bazıları yağ dokusunda birikebilir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek maliyetlidir</li> <li>• Spesifik uygulamalar için kullanılır</li> <li>• Geniş spektrumlu antioksidan aktivite gösterir</li> <li>• Zararsız (inokü) bileşiklerdir</li> <li>• Kullanımı artmakta ve uygulama alanları genişlemektedir</li> <li>• Geniş bir çözünürlük aralığına sahiptir (su ve organik çözücülerde)</li> <li>• İlgi artmaktadır</li> <li>• Tamamen metabolize edilirler</li> </ul>



Şekil 2.8: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.

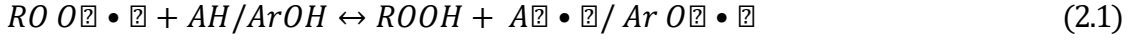


Şekil 2.9: Flavonoidlerin kimyasal yapıları.

### 2.3.3. Antioksidan Aktivite/Kapasite Analizlerinin Sınıflandırılması

#### 2.3.3.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Analizleri

Hidrojen atomu transferine dayalı analizler, antioksidanın bir hidrojen atomu vererek serbest radikalleri söndürme yeteneğini ölçer. HAT'ın antioksidan etki mekanizmaları, fenolün (ArOH) hidrojen atomunun peroksil radikale aktarıldığı aşağıdaki reaksiyonda gösterilebilir:



burada antioksidan bileşiğin bir peroksil radikaliyle reaksiyonundan oluşan ariloksil radikali (ArO•) rezonansla stabilize edilir. AH, korunan biyomolekülleri ifade eder. Etkili fenolik antioksidan, serbest radikallerle biyomoleküllerden (korunan molekül) daha hızlı reaksiyona girmesi gerekir ki, ikincisinin oksidasyonuna karşı koruyucu bir etki gösterebilsin [56]. HAT esaslı analizlerin tipik örnekleri arasında ORAC, TRAP ve TOSC analizleri ve krosin beyazlatma testi yer almaktadır [57].

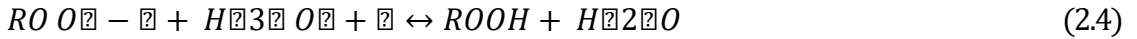
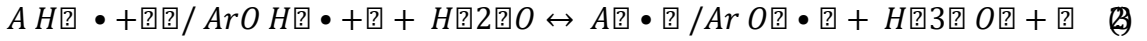
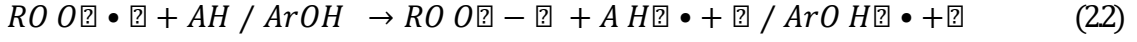
**ORAC testi**, peroksil radikali tarafından gerçekleşen oksidasyonun inhibisyonunun izlenmesi yoluyla radikal zincir kırıcı antioksidan aktiviteyi (AOA) ölçer; bu inhibisyon, hedef molekül (TM) tüketiminin kinetik profillerinden elde edilen eğri altı alan üzerinden değerlendirilir.

Bu test başlangıçta serbest radikal üretici olarak 2,2'-azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorür (AAPH) ve TM olarak β-fikoeritrin kullanıyordu, ancak son yıllarda β-fikoeritrin çoğunlukla floresein ile değiştirilmiştir. Yeni ORAC testi ayrıca standart olarak trolox (suda çözünebilen bir E vitamini analogu) kullanır ve ORAC değeri, AOA olarak trolox eşdeğeri (TE) cinsinden ifade edilir [57].

**TRAP testi**, antioksidanların peroksil radikalleri ile bir hedef prob arasındaki reaksiyonu inhibe etme yeteneğine dayanır; başlangıçta bu, (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür)'ın termal ayrışmasıyla indüklenen peroksidasyon sürecinde O<sub>2</sub>'nin (prob olarak) tüketilmesiyle değerlendirilmiştir. O<sub>2</sub> alımındaki gecikme süresi, yani indüksiyon periyodu, nicel olarak ölçülebilir ve plazma örneklerinin toplam antioksidan kapasitesini (TAC) TRAP değeri olarak ifade etmek için kullanılabilir [58]. Bu yöntem, daha geniş bir prob, başlatıcı ve son nokta ölçüm aralığı kullanılarak birçok versiyona uyarlanmıştır; örneğin AAPH ve peroksidaz enzimleri başlatıcı olarak, florösin, dikloroflorösin diasetat veya lüminol ise son nokta ölçümleri olarak kullanılmıştır [59].

### 2.3.3.2. Elektron Transfer (ET) Yöntemleri

Tek elektron transferine dayalı analizler, ET (elektron transferi) analizleri olarak da adlandırılır, bir antioksidan metal iyonlarını, karbonilleri ve radikalleri indirgenmek için bir elektron transfer yeteneğini tespit eder. SET antioksidan etki mekanizmaları aşağıdaki reaksiyonlarla özetlenebilir:



Ariloksil radikali (ArO•) daha sonra karşılık gelen kinon Ar = O'ya oksitlenir. Ariloksil radikali ne kadar stabilize olursa, ArOH'den Ar=O'ya oksidasyon o kadar kolay olacaktır. Spektroskopik SET esaslı testler, Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi, Demir (III) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) testi, Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi ve Ferrisiyanür-Prusya mavisi testi gibi yöntemlerdir [57].

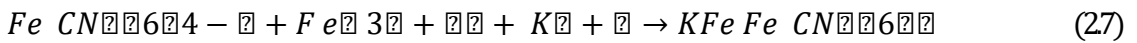
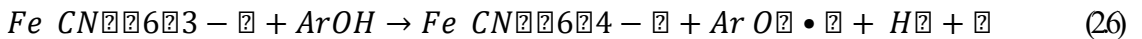
**Folin-Ciocalteu yöntemi**, fenol bileşiklerinin alkali (karbonat) çözeltide bir molibdotungstofosfat heteropolianyon reaktifi ile oksidasyonuna dayanır ve 750–765 nm'de emilen renkli bir ürün verir. Fenolik bileşiklerle olan spesifik ilişki nedeniyle bu yöntem toplam fenolik içerik tahmini için de sıklıkla kullanılır [57].

**Demir (III) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemi**, tripiridiltriazine üç dişli ligand varlığında antioksidanlar tarafından Fe<sup>3+</sup>'nın Fe<sup>2+</sup>'ya indirgenmesine dayanır ve Fe<sup>2+</sup> ile renkli bir kompleks oluşturur.



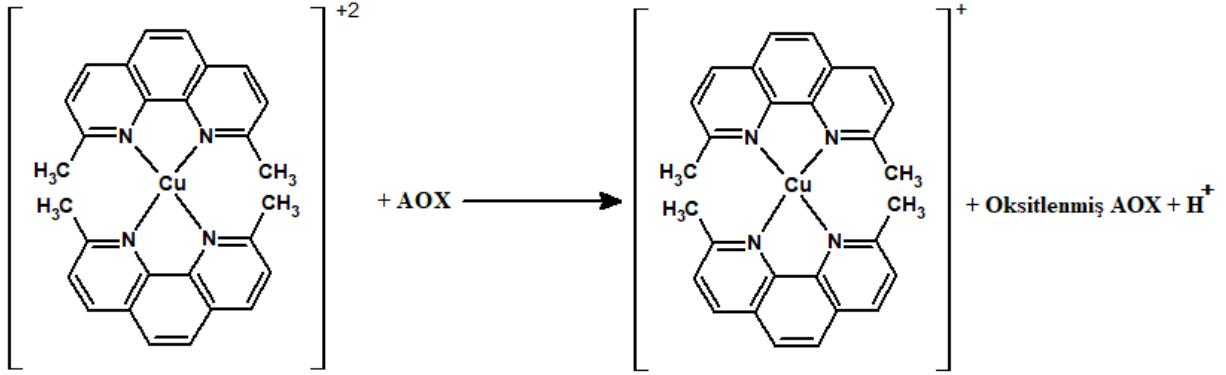
TPTZ, 2,4,6-tripiridil-S-triazin ligandını belirtir, Fe(II) kompleksinin emilim maksimum dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) 593 nm'dir reaksiyonun sonucu yoğun mavi bir renktir. Bu yöntem, hem gıda hem de biyolojik sıvı numunelerinde bir antioksidanın indirgeme gücünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [57].

**Ferrisiyanür-prusya mavisi yöntemi:** Ferrisiyanür-Prusya mavisi deneyi aşağıdaki reaksiyonlara dayanır.



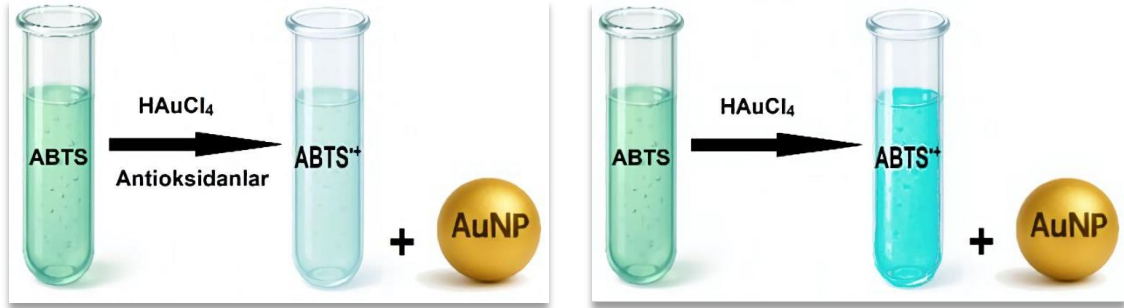
reaksiyonlar Ferrisiyanür reaktifi ilk olarak pH 6,6'da (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) tampon içinde antioksidantlarla (50 °C'de 20 dakika) inkübe edilir ve indirgeme ürünü ferrosiyanür, daha sonra eklenen Fe<sup>3+</sup> ile birleşerek  $\lambda_{max}$  700 nm'de tespit edilen Prusya mavisini üretir [61].

**CUPRAC Yöntemi**, antioksidanların CUPRAC reaktifi bis(neokuproin) bakır(II) katyonu (Cu(II)-Nc) ile redoks reaksiyonu sonucu oluşan CUPRAC kromoforu, Cu(I)-neokuproin (Nc) şelatının absorbandsının ölçülmesine dayanır. Absorbans 450 nm'de kaydedilir [60].



Şekil 2.10: CUPRAC antioksidan kapasite tayini için reaksiyon şeması.

**Altın (III) İyoni İndirgeme Antioksidan Kapasite (AuRAC) Yöntemi**, Bu yöntem, kromojenik reaktif ABTS'nin (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) altın(III) ile oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan mavimsi-yeşil oksitlenmiş ürünün (ABTS<sup>•+</sup>) absorpsiyon ölçümüne dayanmaktadır. Ancak antioksidanların varlığında, altın (III) iyonlarının sıfır değerliğe indirgenmesi ve altın nanopartiküllerinin (AuNP) oluşması nedeniyle ABTS oksidasyon prosesi etkili bir şekilde önlenir. Toplam antioksidan kapasitesine bağlı olarak daha açık renkler ve absorbandslarda önemli bir azalma gözlemlenmektedir. Bu durumdan yararlanılarak kalitatif ve kantitatif toplam antioksidan kapasite (TAC) ölçümleri çıplak gözle ve uv-vis spektroskopisiyle başarıyla gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.11: Antioksidanların varlığı ve yokluğunda modifiye AuRAC sistemi tepkimesi.

AuRAC yöntemi, diyet polifenollerine, C vitaminine, tiyol tipi antioksidanlara ve bunların sentetik karışımlarına uygulanmıştır. Bu yöntem, antioksidan bileşikler için diğer geleneksel tek elektron transferi analizlerine göre çok daha yüksek molar absorpsiyon

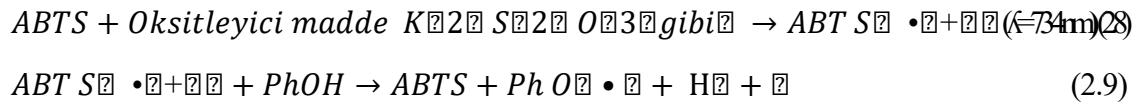
katsayıları gösteri çünkü  $3e^-$  değerlikli altının indirgenmesi (yani  $Au(III) \rightarrow Au(0)$ ) yöntem reaktifinin üç kromofor katyon radikali ( $ABTS^{+}$ ) üretimini sağlar [62].

### 2.3.3.3. Karma Mod (HAT/SET) Yöntemleri

Tüm AOA/TAC analizleri HAT veya SET bazlı mekanizmalara göre açıkça sınıflandırılmaz. Aslında, bazı analizler her iki modu da kullanır. karma modlu testler genel olarak, antioksidanlar tarafından stabil bir radikal kromoforun örneğin  $ABTS^{+}$  ve  $DPPH^{\bullet}$  veya floroforun süpürmesine dayanır. Bu süreçte HAT, ET ve proton-ilişkili elektron transferi mekanizmaları, ilgili reaksiyon koşullarına (örneğin pH ve çözücü) bağlı olarak farklı derecelerde rol oynayabilir [63].

Karma mod (HAT/SET) analizleri esas olarak  $ABTS/TEAC$  (troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi) analizi,  $DPPH$  radikal süpürme yöntemi ve  $DMPD$  (N, N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorür) radikal süpürme yöntemini içerir

**ABTS/TEAC yöntemi**, antioksidan bileşiklerin sağladığı hidrojen atomlarını veya elektronlarını kabul eden kolorimetrik probolar olarak  $ABTS^{\bullet+}$ 'nin yoğun renkli katyon radikallerini kullanır. Antioksidan kapasite, test bileşiğinin (örn.  $Ph-OH$ ) başlangıç oksidasyonunu durdurarak ve  $ABTS^{+}$  üretimini önleyerek veya önceden oluşan radikal katyonla doğrudan reaksiyona girerek  $ABTS^{+}$  rengini azaltma yeteneği ölçer.



Sabit zamanlı bir  $ABTS$  yöntemi tercih edilse bile, aynı bileşik için sonuçlar, stabil renkli radikali oluşturan oksitleyici maddeye bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterebilir [63].

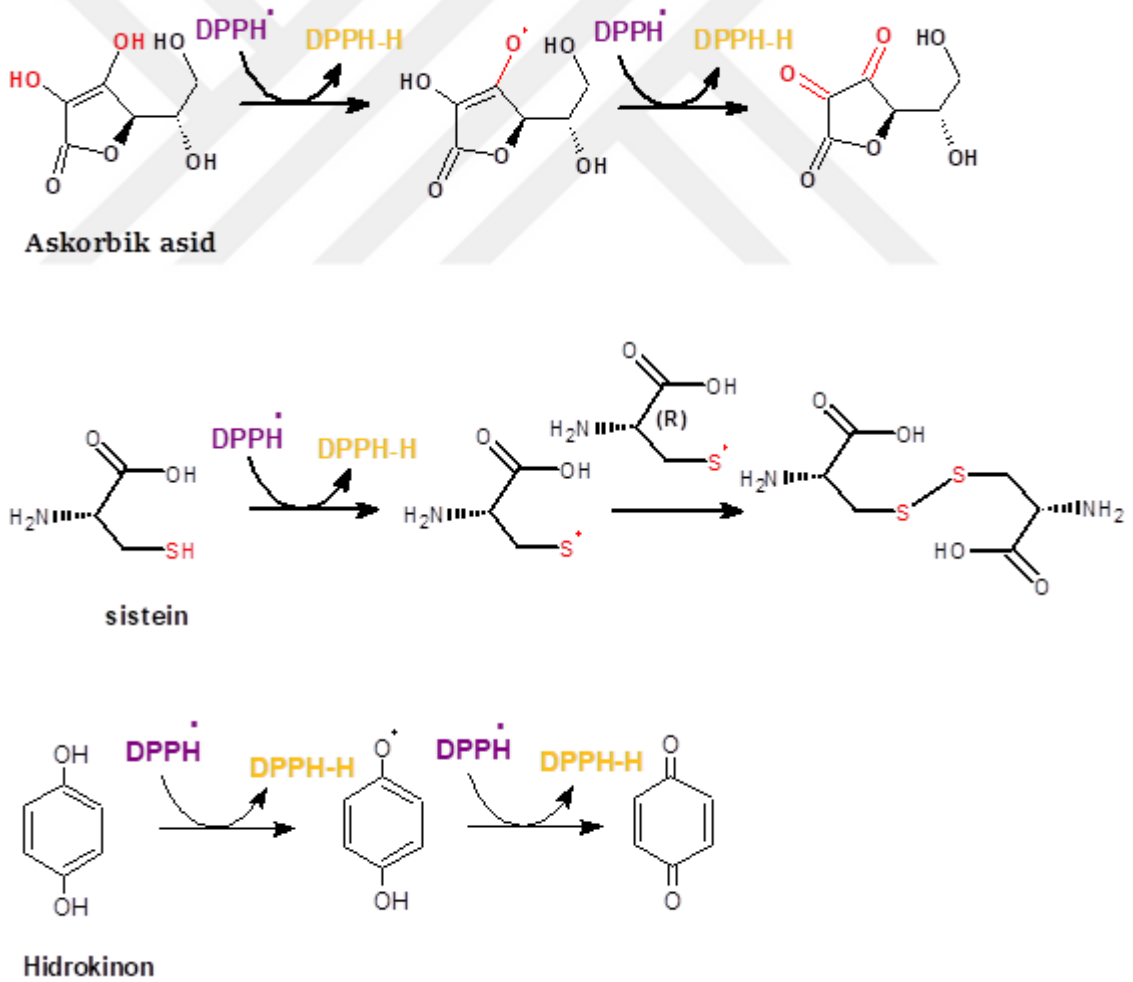
**DMPD radikal süpürme yöntemi**,  $Fe^{+3}$  demir veya hidroksil radikalleri gibi reaktif türlerin varlığında renkli  $DMPD^{\bullet+}$  radikal katyonuna dönüşür.  $DMPD$  deneyinde, bir antioksidan molekül bir hidrojen atomunu (veya bir elektronu)  $DMPD^{\bullet+}$ 'ya aktarır ve bu da çözeltinin hızla renginin açılmasına neden olur ( $\lambda_{max}=505\text{ nm}$ 'de absorbans azalmasıyla kendini gösterir) [59].

**DPPH radikal süpürme yöntemi**,  $DPPH^{\bullet}$ 'nin keşfi neredeyse bir asır öncesine dayanır. Uzun ömürlü olduğu ve normal laboratuvar koşullarında üretilip saklanabildiği için "kararlı" bir radikal olarak gruplandırılmaktadır.  $DPPH$  radikali, çeşitli organik çözücülerde çözünür, ancak suda çözünmez. Genellikle metanol, etanol veya bunların sulu karışımlarında çözülür. Bu karışımlarda, radikalın çözünürlüğünü kolaylaştırmak için su içeriği % 60'ı geçmemelidir.

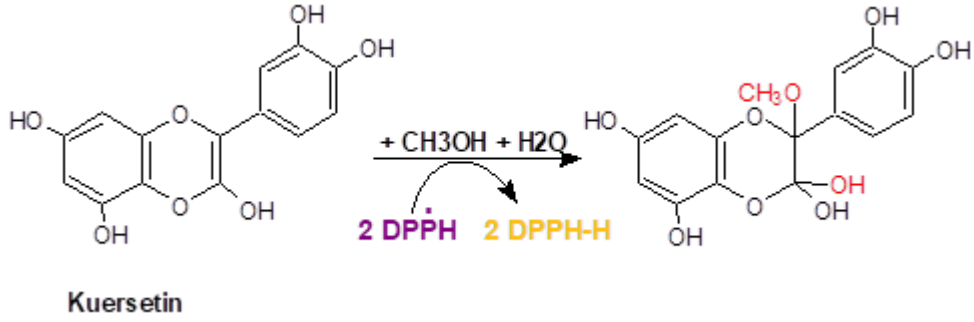
DPPH çözeltileri, benzen, kloroform ve asetonunda nispeten kararlıyken; etanol ve toluende zamanla bozunma oranı artar. Çözeltilerin azot ve ışıktan korunarak saklanması önerilir; ayrıca safsızlıklar veya çözücü özellikleri çözeltinin kararlılığını olumsuz etkileyebilir.

DPPH<sup>•</sup> çözeltisi görünür bölgede (513–528 nm) yoğun bir şekilde emilir . Emilim, pH 5,0–6,5 aralığında güçlü bir şekilde etkilenmez. Bununla birlikte, herhangi bir etkiyi dengelemek için test çözeltisinin asetatlarla tamponlanması önerilmiştir. Alkali koşulların emilim değerleri üzerinde olumsuz bir etkisi vardır.

DPPH birincil antioksidanlar, yani fenoller, aromatik aminler, fenotiyazinler, piridinoller, pirimidinoller ve tiyoller, hidrojen atom bağıışı yoluyla serbest radikalleri peroksil radikali gibi temizleyebilir. Bu, hidrojen ve heteroatom (O, N, S) arasında oluşan zayıf bağ nedeniyle mümkündür [57].

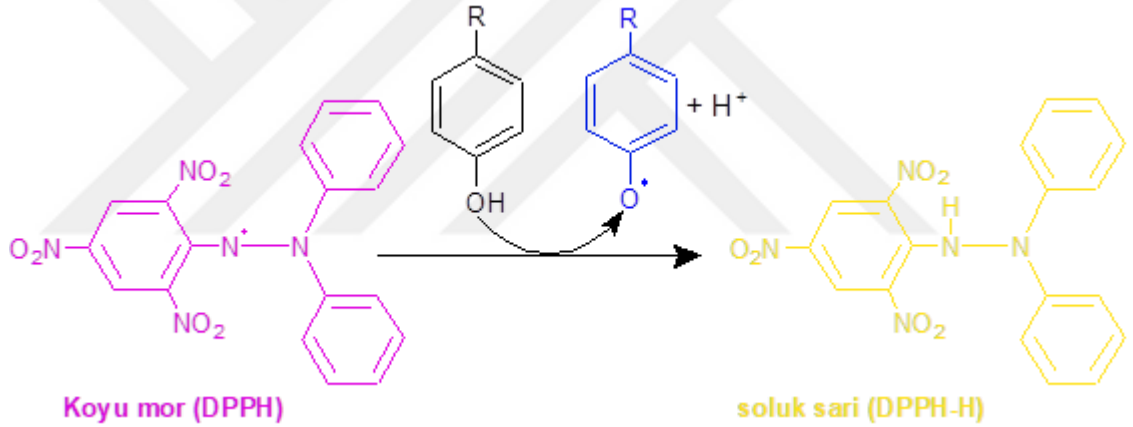


Şekil 2.12: DPPH<sup>•</sup> ile (a) askorbik asit (2:1), (b) sistein (1:1) ve (c) hidrokinon (2:1) arasındaki tepkime stokiyo metrisi [57].



**Şekil 2.13:** Kuersetin ile DPPH• arasındaki tepkime ürünlerinin metanol ortamında oluşumu için önerilen mekanizma [57].

Reaksiyon denklemi HAT mekanizmasına göre formüle edilebilir, ancak proton-bağlı ET mekanizması özellikle fenol iyonize edici solventlerde ve alkali pH koşullarında göz ardı edilemez (Şekil 2.14).



**Şekil 2.14:** DPPH deneyinde rol oynayan mekanizma. DPPH• stabil bir kromojen radikalidir  $\lambda = 515 \text{ nm}$

DPPH yöntemi düşük maliyetli ve basittir ve bu nedenle geleneksel laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. DPPH kristalleri genellikle etanol veya metanolde çözülür. Daha sonra antioksidandan belirli bir miktar eklenir, karışım 30 dakika inkübe edilir ve son absorbans kaydedilir. Çözeltinin orijinal mor rengi, antioksidanlardan H atomu soyutlaması yoluyla DPPH•'nin DPPH-H'ye indirgenmesi nedeniyle sarıya döner [57,59].

## 2.4. METİYONIN TAYİNİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Borowczyk ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada, plazma ve idrar örneklerinde homosistein ve metiyonin bileşenlerinin eşzamanlı tayini için hızlı ve basit bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, yalnızca 10 µL gibi çok küçük bir örnek hacmi kullanmaktadır. Yöntem, o-ftaldialdehit ile kolon üzerinde türevlendirme kullanır. Hcy ve Met'in ayrılması, ters fazlı bir C-18 kolonunda 14 dakika içinde gerçekleştirildi, ardından floresan tespiti (Met için 348 nm'de uyarma ve 438 nm'de emisyon) yapıldı. Met için dedektör yanıtının doğrusallığı 2–60 µmol L<sup>-1</sup> aralığında gözlemlendi. Met için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1 nmol/mL ve 2 nmol/mL olarak belirlenmiştir [4].

Zinellu ve arkadaşları (2007), analiz öncesi örnek deriştirilmesi sayesinde analit türevlendirmesini gereksiz kılan yeni bir spesifik kapiler elektroforez yöntemi geliştirmiştir. Metiyonin, 204 nm'de UV absorbansı ile tespit edildi. pH 2,3'te 125 mmol/L Tris fosfat tamponu ile doldurulmuş 50 cm'lik etkili uzunluğa sahip kapiller ile ayırma 14 dakikadan kısa sürede gerçekleşti. Dedektörün farklı analit konsantrasyonlarına verdiği tepkinin doğrusallığı (4–80 µmol/L) olarak gözlemlendi. (LOD) değeri 0,5 µmol/L,(LOQ) değeri ise 1,8 µmol/L olarak bulundu [64].

Xu ve arkadaşları (2005), yüksek performanslı sıvı kromatografisi için platin/poli(metilviyole) (Pt/MV) kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot (CME) içeren yeni elektrokimyasal tespit (ED) sistemi tanımlamıştır. Poli-MV film üzerine biriktirilen Pt parçacıkları, atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edildi. HPLC-ED sisteminde, Metiyonin CME elektrotu üzerinde iyi ve kararlı akım tepkilerine sahipti. Tespit limiti (LOD)  $5,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir. Yöntemin doğrusal aralığı  $4 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> olarak saptanmıştır [65].

Molaakbari ve arkadaşları (2015) tarafından, ZnO nanorodlar ve 3-(4-amino-3-hidroksi-bifenil-4-il) akrilik asit (3,4AAZCPE) ile modifiye edilmiş yeni bir karbon pasta elektrodu üretildi. Bu modifiye edilmiş elektrot, dopamin, melatonin, metiyonin ve kafeinin eş zamanlı tayini için kullanılmışlar [3].

Sadeeq ve arkadaşları (2024), amino asitlerle stabilize edilmiş gümüş nanoparçacıkları (AgNP'ler) kullanılarak metiyonin (MET, analiz bileşiği) tayinine yönelik iki yeni, basit ve hızlı spektrofotometrik mikro-analiz yöntemi geliştirdi. Bu yöntemler, indirgeme ajanı olarak NaBH<sub>4</sub> kullanılarak gümüş nanoparçacıklarının (AgNP'ler) kontrollü şekilde hazırlanmasına

ve ardından iki farklı amino asitle stabilize edilmesine dayanmaktadır. Bu şekilde stabilize edilen AgNP'ler ile MET arasındaki etkileşim, UV/Görünür spektroskopisi, geçirimli elektron mikroskobu, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve döngüsel voltametri gibi çeşitli teknikler kullanılarak doğrulanmış ve ayrıntılı olarak incelenmiştir. pH, süre, sıcaklık ve iyonik güç gibi tüm deneysel koşullar incelenmiş ve optimize edilmiştir. Bu optimizasyonların ardından, MET'in stabilize edilmiş AgNP'lerle bağlanması sonucunda oluşan renk değişimine (soluk sarıdan soluk griye) ve yaklaşık 390 nm'deki yüzey plazmon rezonansı pikindeki azalmaya dayalı kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Doğrusal aralık, 1,5–15 µg/mL arasında bulunmuştur. Tespit sınırı (LOD) ve nicel tespit sınırı (LOQ) sırasıyla 0,276 ve 0,829 olarak belirlenmiştir [66].

Deáková ve arkadaşları (2015), elektrokimyasal dedektörlü iki boyutlu bir HPLC sistemi kullanarak, biyolojik örneklerde homosistein, metiyonin ve sistein enantiyomerlerini tayin etmiştir. Bileşikler, birbirlerinden akiral kolon kullanılarak ayrıldı; bunların enantiyomerleri ise Chirobiotic TAG kolonu kullanılarak ayrıldı. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,05–0,50 µg/mL ve 0,17–1,67 µg/mL aralığında bulunmuştu [67].

Malvestio ve arkadaşları (2024), gıda örneklerinde metiyonin ve selenometiyoninin eş zamanlı gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) ile belirlenmesi için yeni bir analitik yöntem açıklamıştır. Numuneler, reflüye gerek kalmadan kapalı bir kaptaki metansülfonik asit ile sindirildi. Analitlerin etil türevlerine dönüştürülmesi için (triethylksonyum tetra floroborat) kullanılarak tek adımlı türevlendirme yöntemi optimize edildi, ardından heksan ve GC-MS analizi ile ekstraksiyonları gerçekleştirdi. 1 mL hacimli sulu standart örnek analiz edildiğinde, metiyonin için 1ng/g ve selenometiyonin için 10 ng/g tayin limitleri (LOD) elde edilmiştir [68].

Agüí ve arkadaşları (2004), koloidal-altın sistemin modifiye karbon pasta elektrotlarının (nAu-Cyst-CPE), sülfür içeren bileşiklerin elektrokimyasal belirlenmesi için uygunluğunu, gerçek örneklerde metiyonin amino asidi ve metiyonin bazlı bir peptidin belirlenmesiyle göstermişlerdir. Fosfat tamponunda (pH 7,0) yapılan diferansiyel puls voltametri ile metiyonin belirlenmiş, doğrusal aralık  $(1,0-100) \times 10^{-6}$  mol/L ve tespit limiti ise  $5,9 \times 10^{-7}$  mol/L olarak belirlenmiştir. Metiyonin, birçok vitamin, amino asit ve diğer bileşikler içeren bir farmasötik üründe ve enzimatik olarak sindirilmiş protein içeren karmaşık bir örnek olan et peptonu ile de başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Standart ekleme yöntemi uygulaması, metiyonin için % 93 ile % 106 arasında geri kazanım değerleri verdi ve ortalama değer  $14,7 \pm 0,6 \text{ g.mg}^{-1}$  olarak belirlendi [69].

Şaylan ve arkadaşları(2020), glisin, metiyonin ve homosisteinin eş zamanlı tayini için LC–kuadropol–uçuş zamanı (quadrupole-time-of-flight) tandem kütle spektrometresi (MS/MS) sistemi kullanılarak güvenilir ve doğru bir analitik strateji geliştirdiler. Kromatografik kolonlar Imtakt Intrada kolonu (3,0×150mm, 3,0µm) ve ACE 3 SIL (4,6×100mm, 3,0µm), hedef analitlerin ayrılması için test edildi. İntrada kolonu tüm hedef bileşiklerin ayrılması için uygundu. Bu nedenle, bu kolon daha sonraki deneyler için kullanıldı. Farklı mobil faz sistemleri de gradyan elüsyonuyla incelendi. Bileşiklerin analitik ayrımı, pH 4,6'ya ayarlanmış 10 mM amonyum format tamponunun ultra saf su içindeki çözeltisi (elüent A) ve metanol (elüent B) kullanılarak, 0,40 mL/dak akış hızında elde edilmiştir. Enjekte edilen hacim 10,0 µL olup, analiz boyunca kolon sıcaklığı 35 °C olarak sabit tutulmuştur. Önerilen yöntem, optimum koşullar altında metiyonin için 0,017 µg/mL sınır tespiti (LOD) ve 0,058 µg/mL sınır kantifikasyonu (LOQ) değerleri gösterdi. plazma ve idrar örnekleri için geri kazanım yüzdeleri sırasıyla % 84,2–103,7 ve % 85,8–103,5 arasında; %RSD değerleri ise sırasıyla % 1,5–8,8 ve % 1,8–8,5 arasında bulunmuştur [70].

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Askorbik Asit, sistein, glutatyon, kateşin, gallik asit, kuersetin, ABTS, DPPH, Au(III) (% 30 (w/v) seyreltik HCl içinde), etil alkol, metiyonin, glacial asetik asit, fosfat asidi (85%), sodyum asetat, L-prolin, L-serin, L-glisin, L-glutamik asit, alanin, valin, potasyum klorür, sodyum bikarbonat, trisodyum sitrat dihidrat, glikoz, fruktoz, sükröz ve Fetal bovine serum (Research grade) Sigma Aldirch tarafından temin edilmiştir. AGA-K tablet (30 mg MET) yerel marketten temin edilmiştir.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG marka WAS 220X model analitik terazi, çözeltilerin karıştırılmasında için VELP marka vorteks karıştırıcı kullanıldı. Destile su üretimi için Millipore Simpax 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanıldı. Absorbans ölçümleri için Agilent marka Cary 100 Bio model UV-Vis spektrofotometre ve ölçüm yapmak için bir çift Hellma marka 10 mm ışına yollu kuartz küvet kullanıldı. Kromatografik analizler için Waters HPLC Cihazı (Waters 1525 Binary HPLC pompa, Waters 2998 fotodiyot dizisi (PDA) dedektör, Waters In-line degasser AF), Zorbax Eclipse C8 kolon (150 mm x 4,6 mm, 5µm) ve Hamilton (Reno, NV, USA) marka 50 µL enjeksiyon şırıngası kullanıldı.

#### 3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

Metiyonin (Met) stok çözeltisi ( $10^{-2}$  M) 37,30 mg tartım alınıp destile su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Bu stok çözelti uygun oranlarda destile su ile seyreltilerek çalışma çözeltisi hazırlandı. 1 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) çözeltisi 27,4 mg tartılıp alınıp destile su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. 1 mM tetrakloroaurik asit çözeltisi stok çözeltiden (% 30 (w/v) seyreltik HCl içinde) 34,5 µL alınıp 50 mL'ye destile su ile tamamlanarak hazırlandı. pH 3,6 tamponu 0,775 g sodyum asetat ve 4,0 mL glacial asetik asit karışımının destile su ile 250 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı. 1 mM DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi 19,716 mg tartım alınıp etanol ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Kromatografik analizde mobil faz olarak kullanılan 12,5 mM fosfat asidi çözeltisi 0,085 mL fosfat asidinin destile su ile 500 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

İnterfere edici etkileri test edilen amino asit (L-prolin, L-serin, L-glisin, L-glutamik asit, alanin, valin), potasyum klorür, sodyum bikarbonat, trisodyum sitrat dihidrat, glikoz, fruktoz ve sükroz çözeltileri  $5 \times 10^{-2}$  M olacak şekilde destile su ile hazırlandı. Sentetik karışımların hazırlanmasında kullanılan antioksidan bileşiklerin stok çözeltileri 1 mM olacak şekilde destile su (askorbik asit, N-asetil-L-sistein, glutatyon, L-sistein) veya etil alkolde (gallik asit, kuersetin, kateşin) hazırlandı.

### 3.3.1. Sentetik Karışımları Hazırlanması

Sentetik karışım çözeltileri, tiyol tipi antioksidan bileşikler ile polifenolik bileşikler arasından temsili olarak seçilen askorbik asit (AA), L-sistein (CYS), N-asetil-L-sistein (NAC), glutatyon (GSH), kuersetin (QR), gallik asit (GA) ve kateşin (CAT) kullanılarak hazırlandı. Sentetik karışımların hazırlanmasında başlangıç konsantrasyonları tiyol tipi antioksidan bileşikler ve askorbik asit için  $10^{-5}$  M, polifenolik bileşikler için  $5 \times 10^{-6}$  M ve metiyonin için  $2,5 \times 10^{-3}$  M olarak kullanıldı.

**Sentetik karışım 1:** 1 mL AA+ 1 mL NAC + 1 mL QR + 1 mL MET + 1 mL EtOH

**Sentetik karışım 2:** 1 mL CAT+ 1 mL GA + 1 mL QR + 1 mL MET + 1 mL EtOH

**Sentetik karışım 3:** 1 mL AA+ 1 mL NAC + 1 mL GSH + 1 mL MET + 1 mL destile su

**Sentetik karışım 4:** 1 mL GSH+ 1 mL NAC + 1 mL CYS + 1 mL MET + 1 mL destile su

### 3.3.2. Gerçek Örneklerin Hazırlanması

Sentetik serum çözeltisi, 1 mL fetal bovine serum üzerine 4 mL etanol ilavesi ardından 2500 rpm de santrifüj edilerek analize hazır hale getirildi. Bu çözeltiden 0,1 mL alınarak yöntem uygulandı.

Takviye edici gıda olarak kullanılan AGA-K tablet (30 mg MET) 1 adet alınıp porselen havanda toz haline getirildikten sonra destile su ile 50 mL 'ye tamamlandı. Elde edilen bulanık çözelti önce adi süzgeç kağıdından sonra 0,45 µm PTFE filtreden geçirilerek analize hazır hale getirildi. Bu çözelti analiz öncesinde uygun oranda ultra saf su ile seyreltilerek HPLC'ye enjekte edildi.

### 3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

#### 3.4.1. Metiyonin Tayini için Geliştirilen Modifiye AuRAC Yöntemi

Antioksidan bileşikler varlığında metiyonin tayini için AuRAC yöntemi iki aşamalı olacak şekilde modifiye edildi [62]. Modifiye edilen yöntemine göre;

Birinci aşamada 0,1 mM DPPH çözeltisinden 0,5 mL alınıp üzerine  $5 \times 10^{-6}$  M antioksidan çözeltisinden 0,1 mL ve 0,5 mM Met çözeltisinden değişen miktarlarda (x mL) ilave edildi. Ardından son hacim 2,0 mL olacak şekilde destile su eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

İkinci aşamada, içerisinde 1 mL asetat tamponu (pH 3,6) ve 0,1 mL 1 mM Au (III) çözeltisi bulunan tüplere 0,5 mL ilk aşamada hazırlanan karışımdan ilave edildikten sonra destile su ile son hacim 2,6 mL'ye tamamlandı. Oda koşullarında 4 dakika bekledikten sonra üzerine 0,3 mL ABTS çözeltisi eklenip 2 dakika sonra metiyonin içermeyen referans çözeltiye karşı 412 nm'de absorpsiyon değerleri ölçüldü.

Sentetik karışımlar varlığında metiyonin tayini için birinci aşamada 0,1 mM DPPH çözeltisinden 0,5 mL alınıp üzerine 0,5 mM Met çözeltisinden 0,6 mL ve sentetik antioksidan çözeltisinden 0,6 mL ilave edildi. Ardından son hacim 2,0 mL olacak şekilde destile su eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İkinci aşama yukarıda anlatıldığı gibi ilk aşamada hazırlanan reaksiyon karışımından 0,5 mL alınarak uygulandı.

Çeşitli gerçek ortamlarda metiyoninin yanında sıklıkla karşılaşılan bazı amino asitlerin (L- prolin, L- serin, L-glisin, L-glutamik asit, L-alanin, L-valin) ve kimyasal bileşiklerin (potasyum klorür, sodyum bikarbonat, trisodyum sitrat dihidrat, glikoz, fruktoz, sukroz) interferans etkileri incelendi. Bu denemelerde, intereferan bileşiklerin konsantrasyonu metiyonin konsantrasyonunun 100 katı olacak şekilde kullanıldı. Modifiye AuRAC yöntemi iki aşamalı olarak uygulandı. İlk aşamada 0,1 mM DPPH çözeltisinden 0,5 mL alınıp üzerine 0,5 mM Met çözeltisinden 0,6 mL ve 50 mM intereferan çözeltisinden 0,6 mL ilave edildi. Ardından son hacim 2,0 mL olacak şekilde destile su eklendikten sonra 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İkinci aşama yukarıda anlatıldığı gibi ilk aşamada hazırlanan reaksiyon karışımından 0,5 mL alınarak uygulandı.

Sentetik serum örneği ve gıda takviye tabletlerine uygulanmasında modifiye AuRAC yöntemi yine iki aşamalı olarak uygulandı. Sentetik serum örneğinde ilk aşamada 0,1 mM DPPH çözeltisinden 0,5 mL alınıp üzerine 0,5 mM Met çözeltisinden x mL ve 0,1 mL sentetik

serum çözeltisi ilave edildi. Gıda takviye tabletlerinde ise 0,5 mM DPPH çözeltisinden 0,5 mL alınıp üzerine 0,5 mL ilaç çözeltisi ilave edildi. Her iki durumda da, son hacim 2,0 mL olacak şekilde distile su ilave edildikten sonra karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İkinci aşama yukarıda anlatıldığı gibi ilk aşamada hazırlanan reaksiyon karışımından 0,5 mL alınarak uygulandı.

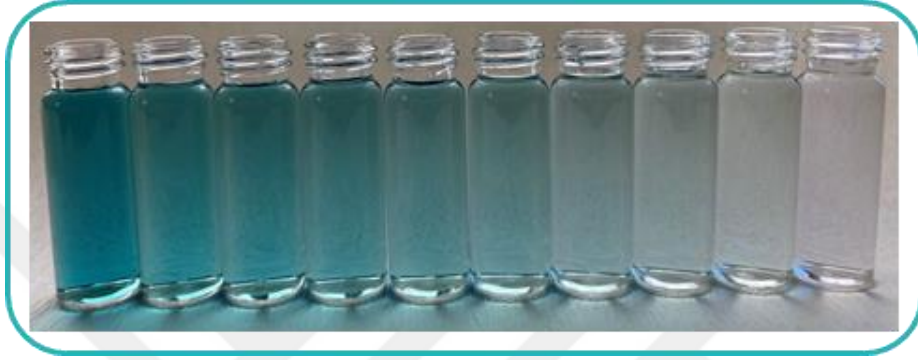
### 3.4.2. HPLC Yöntemi

Metiyonin içeren farmasötik örneklerin kromatografik analizi için Kühnreich ve Holzgrabe (2016) tarafından geliştirilen HPLC yöntemi modifiye edilerek uygulandı [71]. Mobil faz olarak 12,5 mM fosfat asidi kullanıldı. İzokratik elüsyon programı uygulandı. Kromatografik tayin için Zorbax Eclipse C8 kolon (150 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m) kolon kullanıldı. Sistem şartları; akış hızı 0,4 mL dk<sup>-1</sup>, enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L, kolon sıcaklığı 30°C, dalga boyu 210 nm olarak ayarlandı.

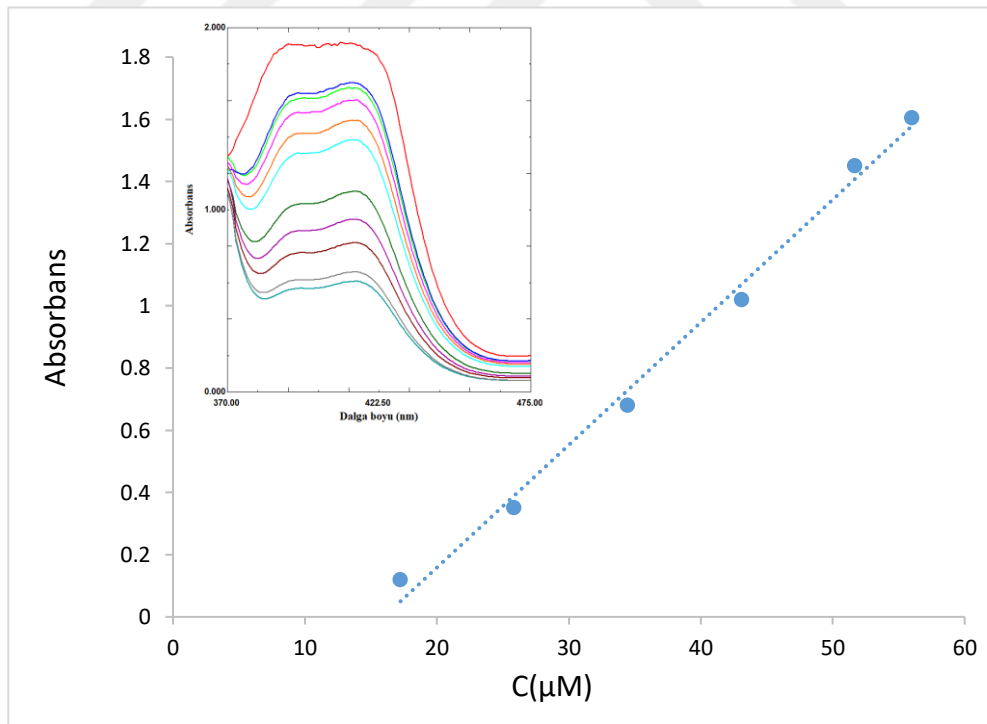
## 4. BULGULAR

### 4.1. METİYONİN TAYİNİ İÇİN GELİŞTİRİLEN MODİFİYE AuRAC YÖNTEMİ

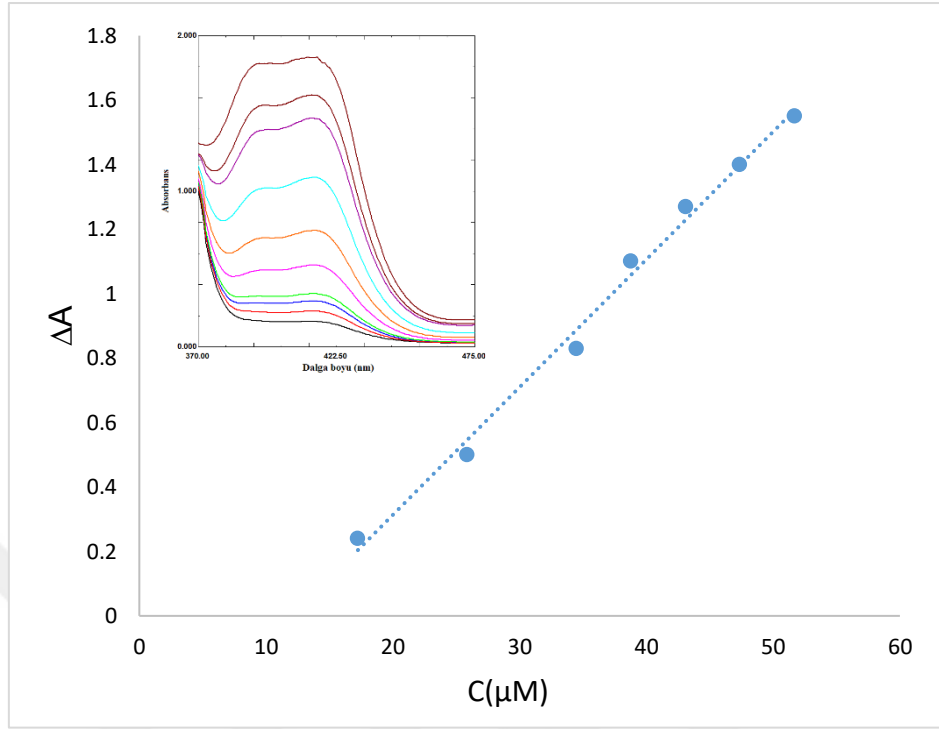
Tek başına metiyonin çözeltisi ve çeşitli antioksidan bileşikler (QR, GA) varlığında metiyonin çözeltisi için detayları Bölüm 3.4.1.'de verilen modifiye yöntemin uygulanması sonucu absorpsiyon spektrumları elde edildi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



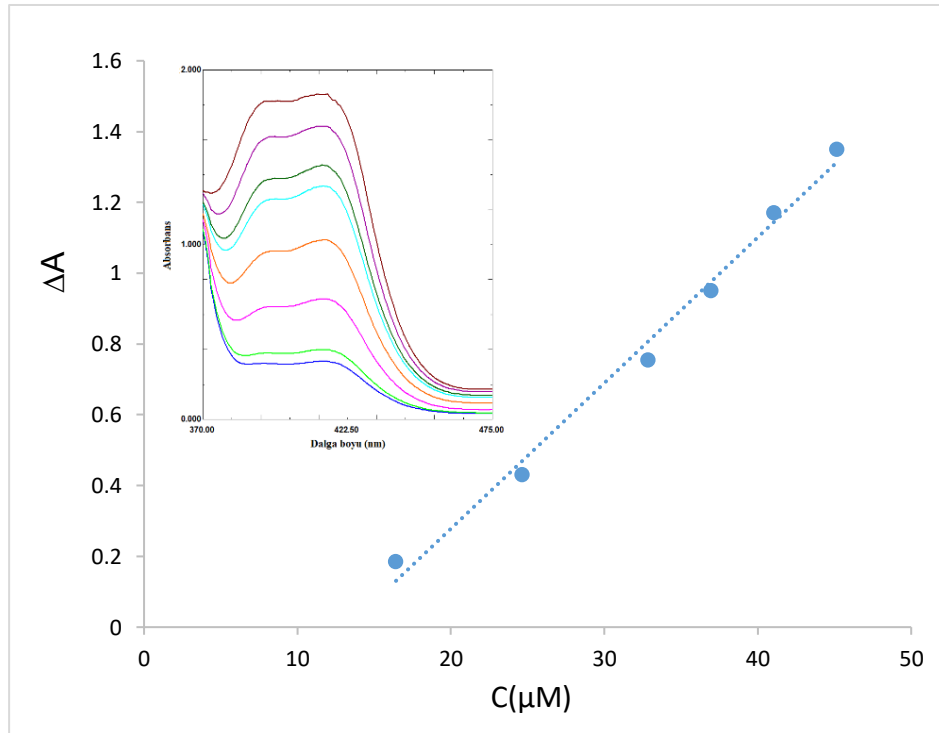
Şekil 4.1: Metiyonin konsantrasyonuna bağlı olarak tüplerin renk değişimi.



Şekil 4.2: Metiyonin çözeltisinin kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları.



**Şekil 4.3:** Gallik asit varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve ilgili UV-Vis absorpsiyon spektrumları.



**Şekil 4.4:** Kuersetin varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve ilgili UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

Modifiye AuRAC yöntemi ile metiyonin için tek başına ve antioksidan varlığında elde edilen kalibrasyon denklemleri Tablo 4.1 'da görülmektedir. Geliştirilen yöntem ile metiyonin tayinin için elde edilen gözlenebilirlik sınırı (LOD) referans çözeltilerinin absorptans değeri ölçülerek Denklem 4.1'e göre hesaplandı (m: kalibrasyon doğrusunun eğim değeri,  $s_{bl}$ : referans çözeltinin standart sapması (N=9)).

$$LOD = 3s_{bl} / m$$

Denklem 4.1

**Tablo 4.1:** Metiyonin tayini için kalibrasyon ve analitik parametreler.

	Lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayısı ( $R^2$ )	LOD ( $\mu\text{M}$ )	Lineer çalışma aralığı ( $\mu\text{M}$ )
Tek başına metiyonin	$y = 39429x - 0,63$ $R^2 = 0,9922$	14	17 – 56
QR varlığında metiyonin	$y = 41153x - 0,545$ $R^2 = 0,9902$	13.96	17 – 52
GA varlığında metiyonin	$y = 39616x - 0,4791$ $R^2 = 0,9924$	14	16 – 46

x: molar konsantrasyon, y: absorptans ve  $R^2$ : korelasyon katsayısı

Detayları Bölüm 3.3.1'de verilen sentetik karışımlara modifiye AuRAC yöntemi uygulanarak sentetik karışımlarda beklenen ve bulunan metiyonin konsantrasyonu ve modifiye AuRAC yöntemi için doğruluk ve kesinlik verileri hesaplandı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2:** Sentetik karışımlarda metiyonin analizine ilişkin doğruluk ve kesinlik verileri.

	Beklenen MET Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ )	Bulunan MET Konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	% Geri kazanım (% REC) <sup>b</sup>	% Bağlı standart Sapma (% RSD) <sup>c</sup>
Sentetik Karışım 1	2,586	2,602± 0,0061	100,6	1,31
Sentetik Karışım 2	2,586	2,561 ± 0,0035	99,03	0,75
Sentetik Karışım 3	2,586	2,536± 0,0208	98,06	4,87
Sentetik Karışım 4	2,586	2,485± 0,0173	96,09	4,02

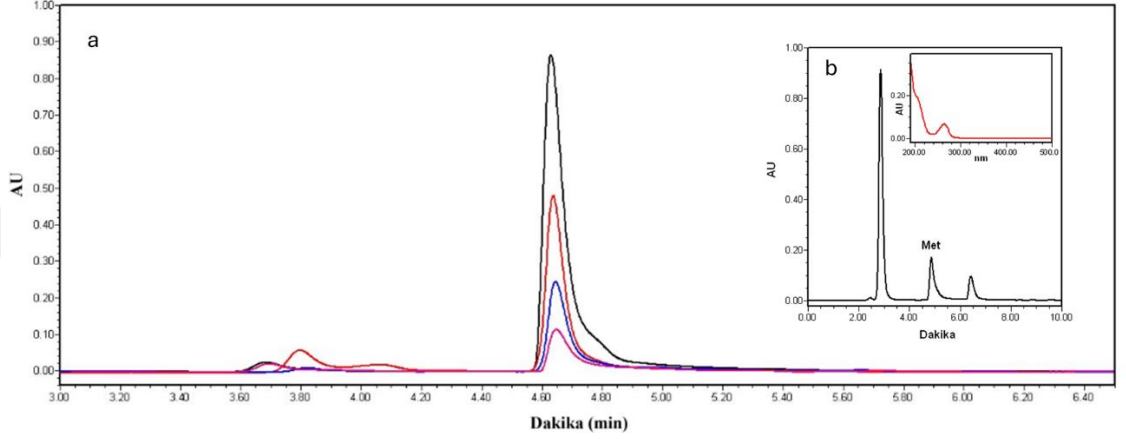
<sup>a</sup> ortalama ± std sapma,

<sup>b</sup> %REC=( bulunan/ beklenen) ×100

<sup>c</sup> %RSD=(std sapma/ortalama) ×100

## 4.2. HPLC YÖNTEMİ

Detayları Bölüm 3.4.2.'de verilen HPLC yöntemine göre standart metiyonin çözeltisi ( $2 \times 10^{-4}$  –  $1 \times 10^{-3}$  M) için elde edilen kromatogramlar Şekil 4.5'de verildi. Standart metiyonin çözeltisi için alıkonma zamanı 4,70 dakika olarak bulundu.

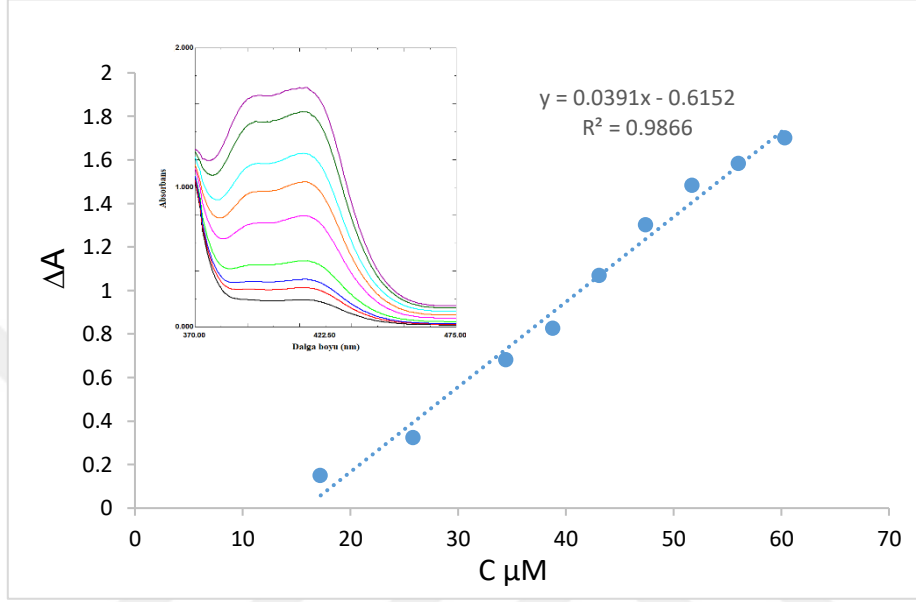


Şekil 4.5: Standart metiyonin çözeltileri (a) ve gıda takviye örneğine (b) ait kromatogramlar.

Pik alanı ve konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon denklemi  $y = 4 \times 10^6 c + 79721$  ( $c$ =molar konsantrasyon,  $y$ =pik alanı) olarak bulundu. Bu kalibrasyon denklemi kullanılarak gıda takviye örneğinin metiyonin içeriği hesaplandı.

### 4.3. GERÇEK ÖRNEKLERE YÖNTEMİN UYGULANMASI

Sentetik serum çözeltisine değişen miktarlarda metiyonin ilavesi yapılarak geliştirilen yöntem uygulandı. Sentetik serum çözeltisinde metiyonin tayini için kalibrasyon denklemi hesaplandı ( $\Delta A = 39429 c - 0,63$ ). Herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.6: Serum varlığında metiyonin tayini için kalibrasyon eğrisi ve UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

Farklı miktarlarda metiyonin içeriğine sahip gıda takviyesine geliştirilen yöntem uygulandı. HPLC ile gıda takviyesinin metiyonin içeriği analiz edildi. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 4.3'te verildi.

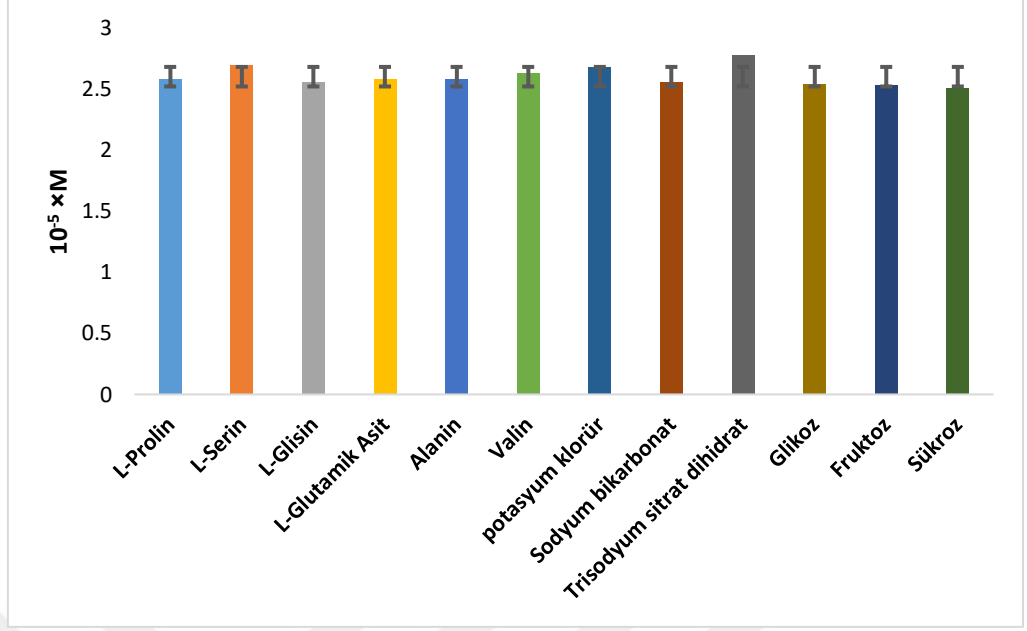
Tablo 4.3: Gıda takviye örneği için metiyonin analizi sonuçları.

Gıda Takviyesi	HPLC Yöntemi	Modifiye AuRAC Yöntemi
AGA-K Tablet (30 mg Met)	31,0±1,4 mg	29,8±1,3 mg

(P=0,05 için  $t_{deneyel} = 0,27$  ;  $t_{tablo} = 4,30$  ,  $t_{deneyel} < t_{tablo}$ ), ortalama±standart sapma

### 4.4. INTERFERANS ÇALIŞMALARI

Bazı amino asit (L-prolin, L-serin, L-glisin, L-glutamik asit, alanin, valin), potasyum klorür, sodyum bikarbonat, trisodyum sitrat dihidrat, glikoz, fruktoz ve sükröz) çözeltileri  $5 \times 10^{-2}$  M'lık sulu çözeltilerinin geliştirilen yönteme göre interferans etkileri test edildi (Şekil 4.7).

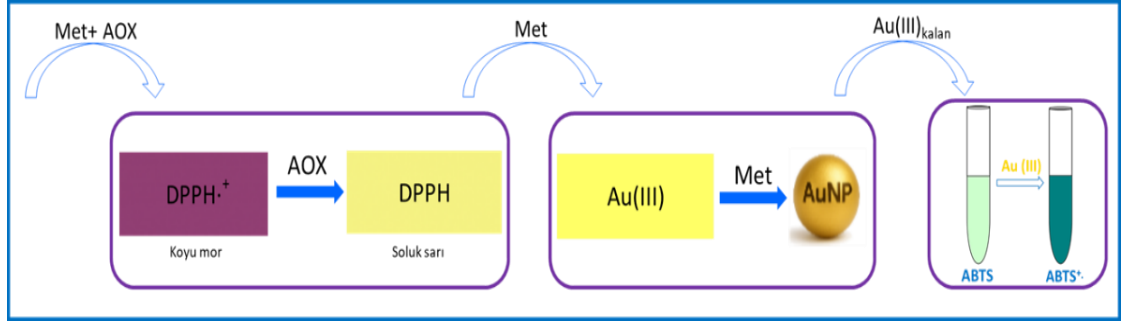


Şekil 4.7: Geliştirilen yönteme göre interferans yapan maddelerin etkileri. Deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Protein yapısı ve metabolizma için önemli bir amino asit olan metiyonin, dört yaygın kükürt içeren amino asitten (homosistein, sistein ve taurin) biridir. Yapısında bir kükürt atomuna kovalent olarak bağlı bir metil grubu içerir. Hem metil grubu hem de kükürt, yapısal ve metabolik işlevleri için çok önemlidir [72]. Metiyonin, hücrel metilasyon ve sistein sentezinin öncüsüdür. Protein sentezindeki rolüne ek olarak, metiyonin döngüsüne girip çok sayıda biyokimyasal reaksiyon için metil grupları sağlayan s-adenosilmetiyonine dönüştürülebilir [73]. Tüm bunların yanında metiyonin hayvan beslenmesinde de hayati bir amino asit olup yine protein sentezinde, transsülfürasyonda ve transmetilasyonda önemli bir rol oynamakta ve ayrıca antioksidan sistemini etkileyebilecek çeşitli biyokimyasal yol aktivasyonlarında yer almaktadır. Farklı metiyonin kaynakları içeren diyetlerle takviye edilen kümes hayvanları üzerinde yapılan birçok araştırma sonuçları, metiyoninin kümes hayvanlarının antioksidan durumunu uyarmak için iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir [74].

Literatürde metiyoninin antioksidan potansiyeli genellikle sistein ve glutatyon gibi metabolitlerinin antioksidan kapasiteleri üzerinden dolaylı olarak ortaya konmuş ve metiyoninin hücrel oksidatif dengeyi iyileştirdiği ve oksidatif stresi düzenlediği yaygın olarak gösterilmiştir. Fakat literatürdeki geleneksel antioksidan kapasite yöntemleri (örneğin, CUPRAC, ABTS/TEAC ve FRAP gibi) kullanılarak metiyoninin antioksidan kapasitesi doğrudan tayin edilememektedir [75]. Literatürdeki bu boşluğu doldurabilmek için bu tez çalışmasında AuRAC Yöntemi modifiye edilerek metiyoninin doğrudan antioksidan kapasitesi başarılı şekilde belirlenmiştir. Modifiye AuRAC yöntemi iki basamakta uygulanmıştır. İlk basamakta DPPH radikali kullanarak reaksiyon ortamında bulunabilecek antioksidan bileşikler elimine edilmiş ikinci basamakta ise CUPRAC, ABTS/TEAC ve FRAP yöntemlerinde olduğu gibi DPPH radikali ile de reaksiyona girmeden kalan metiyonin AuRAC yöntemi ile belirlenmiştir.



**Şekil 5.1:** Geliştirilen modifiye AuRAC yöntemin şematik gösterimi.

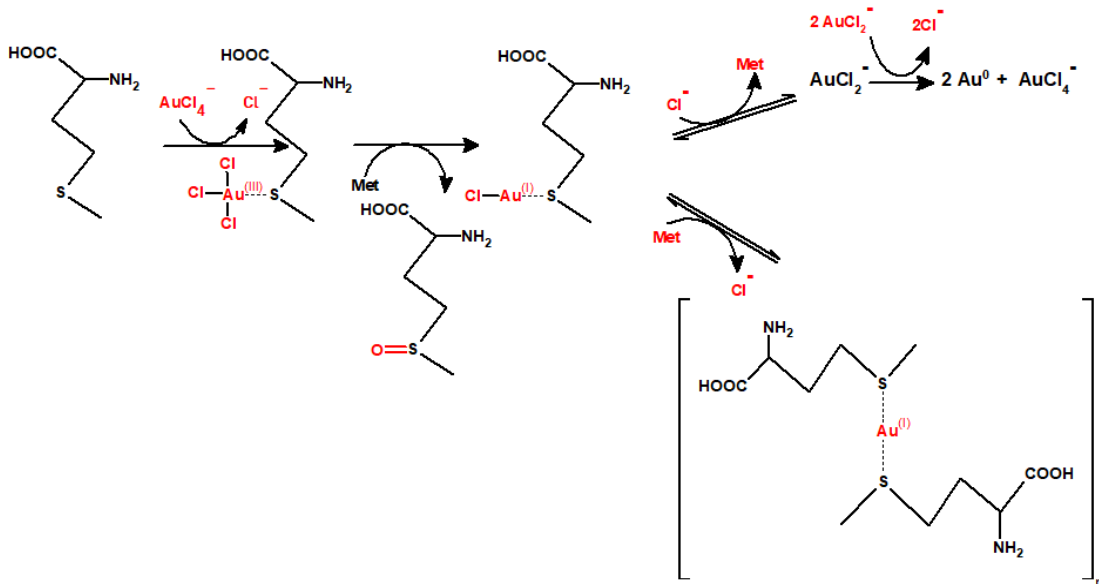
DPPH yöntemi, bir antioksidan molekülün serbest radikal temizleme potansiyelinin ve saf bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi için rutin olarak kullanılan standart ve kolay kolorimetrik yöntemlerden biri olarak kabul edilir. DPPH çözeltide kararlı mor renkli bir radikaldir. Bu test, DPPH'ın süpürücü molekülden yani antioksidan bileşikten bir hidrojen (H) atomu kabul etmesi ve indirgenme sonucunda mor renginin sarıya dönerek 515 nm'de ölçülen absorbans değerinin azalması ilkesine dayanmaktadır [76].

AuRAC yöntemi, kromojenik reaktif ABTS'nin (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) altın (III) ile oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan mavimsi-yeşil oksitlenmiş ürünün ( $ABTS^{\cdot+}$ ) emilim ölçümüne dayanmaktadır. Altın (III), ABTS'yi 414 nm'de güçlü bir emilim zirvesine sahip mavimsi-yeşil bir oksidasyon ürününe ( $ABTS^{\cdot+}$ ) oksitleyebilir [77].  $ABTS^{\cdot+}/ABTS$  redoks çiftinin standart indirgeme potansiyeli 0,68 V'tur [78].  $Au(III)/Au(0)$  çiftinin  $E_0$ 'ı ise 1,002 V'tur [79].  $Au(III)$  ve ABTS'nin redoks potansiyelleri arasındaki bu fark reaksiyonun gerçekleşmesinde itici gücü sağlamaktadır. Antioksidan bileşikler varlığında ise altın (III) iyonlarının indirgenerek altın nanopartikülleri (AuNP'ler) oluşturması nedeniyle ABTS oksidasyon süreci etkili bir şekilde baskılanır.

Metiyonin ile  $Au(III)$  arasındaki reaksiyon mekanizması ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hem  $Au(I)$  hem de  $Au(III)$ , yumuşak S-verici ligandları tercih eden yumuşak Lewis asitleri olarak tanımlanmaktadır. Đurović ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada  $1 \times 10^{-4}$  M  $[AuCl_4]^-$  ile 20 ila 100 kat fazla L-Met arasındaki reaksiyon, sabit ve önceden belirlenmiş bir dalga boyundaki absorbans değişiminin zamana bağlı olarak ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak takip etmiş ve bu değişimlerin  $Au(III)$ 'ün  $Au(I)$ 'e ve  $Au(I)$ 'in  $Au(0)$ 'a indirgenmesiyle oluşan yeni kompleks, klorür iyonları ile kükürt donörü nükleofil arasında ligand değişimine uğradıkça meydana geldiğini bildirmiştir [80].

Natile ve arkadaşları (1976) tarafından yapılan çalışmada ise suda eş molar miktarda (S)-metiyonin ve kloroaurik asidin reaksiyonu birkaç dakika içinde tamamlandığı ve başlangıçta sarı olan çözeltinin renksiz hale geldiği bildirilmiştir. İnce tabaka kromatografisi ve amino asit analizi, başlangıç amino asidinin tamamen yok olduğunu ve karşılık gelen sülfoksitin varlığını göstermiştir [81].

Metiyonin varlığında Au(III)'ün indirgenmesini gösteren benzer bir reaksiyon mekanizmasında Hutano ve arkadaşları (2021) tarafından önerilmiştir. Bu reaksiyon mekanizmasına göre;



Şekil 5.2: Metiyonin'in HAuCl<sub>4</sub> ile oksidasyonu mekanizması [82].

- İlk aşamada, Met'in tiyoeter grubu tarafından nükleofilik Cl<sup>-</sup> yer değiştirmesi ile hızlıca bir [Au(III)-Met] kompleksi (1) oluşur. Bu kompleks oldukça kararsızdır ve yalnızca reaksiyonun ilk birkaç dakikasında eser miktarda tespit edilebilir.
- İkinci aşamada, ek Met kalıntısı Au(III)'ün Au(I)'e indirgenmesine yol açar. Bir ara ürün olarak klorosülfonyum-metiyonin iyonu oluşur ve bu iyon daha sonra MetO'ya hidrolize olur.
- Ortaya çıkan [Au(I)-Met] kompleksi, serbest [AuCl<sub>2</sub>]<sup>-</sup> oluşturmak üzere ayrışabilir veya doğrusal ve çok çekirdekli bir [Au(I)-(Met)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> kompleksi oluşturabilir.
- [AuCl<sub>2</sub>]<sup>-</sup> oda sıcaklığında çözelti halinde stabil değildir ancak katı Au(0) ve [AuCl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>'e eliminasyonunun yavaş ilerlediği rapor edilmiştir [82].

Toplam antioksidan kapasitesine bağlı olarak nispeten daha açık renkler ve absorbans değerlerinde önemli bir azalma gözlenir. Antioksidan varlığında ve yokluğunda ölçülen

absorbans değerleri arasındaki farktan yararlanılarak toplam antioksidan kapasite (TAC) ölçümleri başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bekdeşer ve Apak (2004) AuRAC adını verdikleri bu yöntemi kullanarak çeşitli antioksidan bileşiklerin troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) katsayılarını rapor etmişlerdir. AuRAC yönteminin, üç değerlikli altının (yani, Au(III)  $\rightarrow$  Au(0)) 3-e<sup>-</sup> indirgenmesinin yöntem reaktifinin üç kromofor katyon radikalini (ABTS<sup>+</sup>) üretmesi nedeniyle, diğer geleneksel tek elektron transfer yöntemlerine kıyasla antioksidan bileşikler için çok daha yüksek molar emilim katsayıları gösterdiği bildirilmiştir. Literatürde mevcut klasik antioksidan kapasite yöntemlerinin aksine AuRAC yöntemi kullanılarak metiyonin için de TEAC değeri 0,65 olarak rapor edilmiştir [62]. Metiyonin yapısında kolay oksitlenebilen serbest bir sülfidril: -SH grubundan yoksun olması (onun yerine bir kükürt atomuna kovalent olarak bağlı bir metil grubu içermesi) nedeniyle CUPRAC, ABTS/TEAC ve FRAP gibi yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik TAC analizleri ile antioksidan kapasitesi belirlenememiştir [75]. Au (III) geleneksel analiz reaktiflerinden daha yüksek oksitleyici güce sahip olduğundan, metiyonini yükseltgeyebilmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen modifiye AuRAC yöntemi ile iki basamakta antioksidan bileşikler varlığında metiyonin tayini seçimli olarak yapılmıştır. İlk basamakta DPPH radikali kullanılarak reaksiyon ortamında mevcut antioksidan bileşikler elimine edilmiş ikinci basamakta ise ortamda bulunan metiyonin AuRAC yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Modifiye AuRAC yöntem ile değişen metiyonin konsantrasyonları varlığında elde edilen renk değişimi Şekil 4.1'de görülmektedir. Her bir metiyonin konsantrasyonuna karşılık gelen 412 nm dalgaboyundaki  $\Delta A$  değerleri kullanılarak kalibrasyon denklemi ( $y=39429 c - 0,63$ ,  $R^2=0,9922$ ) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.2). Benzer şekilde diğer antioksidan bileşikler varlığında da metiyonin için kalibrasyon doğrusunun değişip değişmediğini test etmek amacıyla temsili olarak seçilen kuersetin ve gallik asit varlığında kalibrasyon denklemleri hesaplanmıştır. Metiyonin için kuersetin ve gallik asit varlığında modifiye AuRAC yöntemi ile kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve molar absorplama katsayıları sırasıyla  $41153 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ve  $39616 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3 ve 4.4). Elde edilen her üç kalibrasyon denkleminde hesaplanan LOD değerleri yaklaşık  $14 \mu\text{M}$  (standart sapma= 0,0189) bulunmuştur (Tablo 4.1).

Metiyoninin gerçek örneklerde sıklıkla bir arada bulunduğu tiyol tipi antioksidan bileşikler kullanılarak dört farklı kombinasyonda sentetik karışım hazırlanmıştır. Bu sentetik karışımlara modifiye AuRAC yöntemi uygulanarak beklenen ve bulunan metiyonin içerikleri kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Beklenen ve bulunan metiyonin

miktarlarının birbiriyle uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca yöntemin doğruluğu ve kesinliğinin göstergesi olarak geri kazanım (% REC) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır. Geri kazanım değerleri 96,09 ile 100,6 arasında değişirken, bağıl standart sapma değerleri 0,75 ile 4,87 arasında değişmektedir.

Yöntem gerçek örnek olarak gıda takviyesine uygulanmıştır. Metiyonin standardı için alıkonma zamanı 4,70 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 4.5) AGA-K tablet örneğinin metiyonin içeriği (30 mg) modifiye AuRAC yöntemi ve HPLC yöntemi ile belirlenerek sırasıyla  $29,8 \pm 1,3$  mg ve  $31,0 \pm 1,4$  mg olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.3). Her iki yöntem bulguları t-testi ile karşılaştırılmış ve modifiye AuRAC yöntemi ile HPLC yöntemi bulgularının % 95 güvenilirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği görülmüştür ( $P=0,05$  için  $t_{deneyse} = 0,27$ ,  $t_{tablo} = 4,30$ ,  $t_{deneyse} < t_{tablo}$ ).

Son olarak yöntemin seçiciliğini belirlemek için interferans çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, çeşitli amino asitler (L- prolin, L- serin, L-glisin, L-glutamik asit, L-alanin, L-valin), kimyasal bileşiklerden (potasyum klorür, sodyum bikarbonat, trisodyum sitrat dihidrat), mono- ve disakkaritlerden (glukoz, fruktoz, sakkaroz) oluşan 12 adet bileşiğin modifiye AuRAC yöntemine etkisi incelenmiştir. Metiyonin konsantrasyonuna göre 100 kat fazla alınan bu bileşikler enterfere edici etki göstermemiştir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında çeşitli antioksidan bileşikler varlığında metiyonin tayini için yeni bir prosedür önerilmiştir. Metiyoninin kimyasal yapısında kükürt atomuna kovalent olarak bağlı bir metil grubu içermesi CUPRAC, ABTS/TEAC ve FRAP gibi yaygın olarak kullanılan spektrofotometrik analiz yöntemleri ile tayin edilememesine sebep olmaktadır. Literatürdeki bu boşluğu doldurmak için AuRAC yöntem esasına dayalı yeni bir prosedür geliştirilmiştir. Bu yöntem iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta, DPPH yöntemi kullanılarak metiyoninle birlikte bulunan antioksidan bileşikler elimine edilirken ikinci basamakta, AuRAC yöntemi kullanılarak metiyonin miktarı belirlenmiştir. AuRAC yöntemi, antioksidanların altın (III) iyon indirgeme yeteneğini ölçmektedir. Au(III)/Au(0) çiftinin standart redüksiyon potansiyelinin klasik antioksidan kapasite yöntemlerinde kullanılan yöntem reaktiflerinden yüksek oluşu bu yöntem ile metiyonin tayininin yapılabilmesini sağlarken reaksiyon ortamında metiyonin ile indirgenmeden kalan Au(III)'ün ABTS reaktifi ile 3-e<sup>-</sup> indirgenmesi (Au(III) → Au(0)) sonucunda üç renkli oksidasyon ürününün oluşması daha yüksek molar emilim katsayıları elde edilmesini sağlamaktadır. Geliştirilen yöntem ile metiyonin için LOD değeri 14 µM olarak hesaplanırken, yöntem gıda takviyelerine de başarılı şekilde uygulanmıştır.

## KAYNAKLAR

- [1]. Zhou, M., Wang, A., Li, C., Luo, X., Ma, Y., 2017, Flow-based determination of methionine in pharmaceutical formulations exploiting TGA-capped CdTe quantum dots for enhancing the luminol-KIO<sub>4</sub> chemiluminescence, *Journal of Luminescence*, 183, 206–211.
- [2]. Odewunmi, N. A., Kawde, A.-N., Ibrahim, M., 2019, In-situ single-step electrochemical AgO modified graphite pencil electrode for trace determination of DL-methionine in human serum sample, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 281, 765–773.
- [3]. Molaakbari, E., Mostafavi, A., Beitollahi, H., 2015, Simultaneous electrochemical determination of dopamine, melatonin, methionine and caffeine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 208, 195–203.
- [4]. Borowczyk, K., Chwatko, G., Kubalczyk, P., Jakubowski, H., Kubalska, J., Głowacki, R., 2016, Simultaneous determination of methionine and homocysteine by on-column derivatization with o-phthalaldehyde, *Talanta*, 161, 917–924.
- [5]. Maloy, S., 2013, Amino Acids, *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Second Edition, Elsevier, San Diego, USA, 108–110.
- [6]. Wade, L. G. Jr., 2010, Structure and Stereochemistry of the  $\alpha$  Amino Acids, in: *Organic Chemistry*, 7th Edition, Chapter 24, Pearson Education, Boston, USA, 1153–1190.
- [7]. Blanco, A., Blanco, G., 2022, Medical Biochemistry, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, Bölüm 3, Proteins, 21–75.
- [8]. De Schouwer, F., Claes, L., Vandekerckhove, A., Werydt, J., De Vos, D. E., 2019, Protein-rich biomass waste as a resource for future biorefineries: State of the art, challenges, and opportunities, *ChemSusChem*, 12(7), 1272–1303.
- [9]. Dabaibeh, R., 2024, Study and analysis of L-methionine and L-cysteine complexes, *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry Research*, 6(11), 1683–1692.
- [10]. Willke, T., 2014, Methionine production—a critical review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 9893–9914.
- [11]. Nuttall, S. L., Martin, U., Sinclair, A. J., Kendall, M. J., 1998, Glutathione: in sickness and in health, *The Lancet*, 351(9103), 645–646.
- [12]. Jankowski, J., Kubinska, M., Zdunczyk, Z., 2014, Nutritional and immuno modulatory function of methionine in poultry diets—a review, *Annals of Animal Science*, 14(1), 17–31.
- [13]. Drazic, A., Winter, J., 2014, The physiological role of reversible methionine oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1844(8), 1367–1382.

- [14]. Stadtman, E. R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N. B., Levine, R. L., 2005, Methionine oxidation and aging, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Proteomics*, 1703(2), 135–140.
- [15]. Sohal, R. S., Orr, W. C., 2012, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 52(3), 539–555.
- [16]. Gabbita, S. P., Aksenov, M. Y., Lovell, M. A., Markesbery, W. R., 1999, Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain, *Journal of Neurochemistry*, 73(4), 1660–1666.
- [17]. DeLuca, A., Sanna, F., Sallese, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Sacchetta, P., Rossi, C., De Laurenzi, V., Di Ilio, C., Favalaro, B., 2010, Methionine sulfoxide reductase A down-regulation in human breast cancer cells results in a more aggressive phenotype, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18628–18633.
- [18]. Perrone, C. E., Malloy, V. L., Orentreich, D. S., Orentreich, N., 2013, Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents, *Experimental Gerontology*, 48(7), 654–660.
- [19]. Ables, G. P., Brown-Borg, H. M., Buffenstein, R., Church, C. D., Elshorbagy, A. K., Gladyshev, V. N., Huang, T. H., Miller, R. A., Mitchell, J. R., Richie, J. P., Rogina, B., Stipanuk, M. H., Orentreich, D. S., Orentreich, N., 2014, The First International Mini-Symposium on Methionine Restriction and Lifespan, *Frontiers in Genetics*, 5, 122.
- [20]. Lee, B. C., Kaya, A., Ma, S., Kim, G., Gerashchenko, M. V., Yim, S. H., Hu, Z., Harshman, L. G., Gladyshev, V. N., 2014, Methionine restriction extends lifespan of *Drosophila melanogaster* under conditions of low amino-acid status, *Nature Communications*, 5, 4592.
- [21]. Townsend, D.M., Tew, K.D., Tapiero, H., 2004, Sulfur-containing amino acids and human disease, *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 58(1), 47–55.
- [22]. Gomes, J., Kumar, D., 2005, Production of L-methionine by submerged fermentation: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 37(1), 3–18.
- [23]. Dever, J.T., Elfarra, A.A., 2010, The biochemical and toxicological significance of hypermethionemia: new insights and clinical relevance, *Expert Opinion on Drug Metabolism ve Toxicology*, 6(11), 1333–1346.
- [24]. Pack, M., 2004, Aminosäuren in der Tierernährung, *Elements - Degussa Science Newsletter*, 06, 30–33.
- [25]. Lüssling, T., Müller, K.-P., Schreyer, G., Theissen, F., 1981, *Process for the recovery of methionine and potassium bicarbonate*, Patent No. US4303621(A), Deutsche Gold- und Silber-Scheideanstalt (Degussa).
- [26]. Syldatk, C., May, O., Altenbuchner, J., Mattes, R., Siemann, M., 1999, Microbial hydantoinases—industrial enzymes from the origin of life?, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), 293-309.

- [27]. Wagner, T., Hantke, B., Wagner, F., 1996, Production of L-methionine from D,L-5-(2-methylthioethyl)hydantoin by resting cells of a new mutant strain of *Arthrobacter* species DSM 7330, *Journal of Biotechnology*, 46(1), 63-68.
- [28]. May, O., Nguyen, P.T., Arnold, F.H., 2000, Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine, *Nature Biotechnology*, 18(3), 317-320.
- [29]. May, O., Verseck, S., Bommarius, A., Drauz, K., 2002, Development of dynamic kinetic resolution processes for biocatalytic production of natural and nonnatural L-amino acids, *Organic Process Research ve Development*, 6(4), 452-457.
- [30]. Kim, S.-Y., Cho, K.M., Shin, Y.-U., Um, H.-W., Choi, K.-O., Chang, J.-S., Cho, Y.-W., Park, Y.-H., 2008, *Patent to CJ CheilJedang*: Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from L-methionine precursor, WO2008/0134329(A9).
- [31]. Hong, S.W., Kwang, I.S., Lee, S.M., Lee, Y.J., Jung, J.Y., Eyal, A., 2012, *Patent to CJ CheilJedang Corporation*: Methods for production of L-methionine and related products, WO2012/091479(A9).
- [32]. Fremy G., Barre P., Kim S.-Y., Son S.K., Lee S.M., 2013, *Patent to Arkema France-CJ CheilJedang China*: Preparation process of L-methionine, WO2013/029690(A1).
- [33]. Goldberg, I., 1985, *Single cell protein*, Springer, Berlin Heidelberg.
- [34]. Anupama, Ravindra, P., 2000, Value-added food: single cell protein, *Biotechnol Adv*, 18 (6), 459–479.
- [35]. Verseck, S., 2007, Production of pharmaceutical amino acids, *Elements Degussa Sci Newsl*, 18, 13–15.
- [36]. Srivastava, A., Sharma, A., Suneetha, V., 2011, Feather waste biodegradation as a source of amino acids, *Eur J Exp Biol*, 1 (2), 56–63.
- [37]. Stahel, P., Purdie, N.G., Cant, J.P., 2014, Use of dietary feather meal to induce histidine deficiency or imbalance in dairy cows and effects on milk composition, *Journal of Dairy Science*, 97 (1), 439–445.
- [38]. Zhang, Y., Yang, R., Zhao, W., 2014, Improving digestibility of feather meal by steam flash explosion, *J Agric Food Chem*, 62 (13), 2745–2751.
- [39]. Courtney-Martin G., Pencharz P.B., 2016, Sulfur Amino Acids Metabolism From Protein Synthesis to Glutathione, *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins*, In: Dardevet D. (ed.), Chapter 19, Academic Press, Toronto, ISBN: 978-0-12-802167-5, 265-286.
- [40]. Stipanuk M.H., 2004, Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine, *Annual Review of Nutrition*, 24, 539-577.
- [41]. Finkelstein J.D., Martin J.J., Harris B.J., 1988, Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine, *Journal of Biological Chemistry*, 263(24), 11750-11754.

- [42]. Daugherty M., Polanuyer B., Farrell M., ve arkadaşları., 2002, Complete reconstitution of the human coenzyme A biosynthetic pathway via comparative genomics, *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21431-21439.
- [43]. Selhub J., 1999, Homocysteine metabolism, *Annual Review of Nutrition*, 19, 217-246.
- [44]. Selhub J., Miller J.W., 1992, The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine, *American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1), 131-138.
- [45]. Shahidi, F. ve Ambigaipalan, P., 2015, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – a review, *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- [46]. Avelino, F., 2024, History and classification, *Antioxidant Methods*, In: Avelino, F. (ed.), Chapter 1, Elsevier Science, Ceará, ISBN: 978-0-443-21591-9, 3–18.
- [47]. Pulidindi, K. ve Ahuja, K., 2023, Food antioxidants market, *Global Market Insights*, <https://www.gminsights.com/industry-analysis/food-antioxidant-market> (Accessed: 10 July 2025).
- [48]. Gülçin, I., 2020, Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview, *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- [49]. Hudson, J.F., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London, ISBN: 978-1851664405.
- [50]. Wichi, H.P., 1988, Enhanced tumour development by butylated hydroxy-anisole (BHA) from the perspective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium, *Food and Chemical Toxicology*, 26, 717-723.
- [51]. Dolatabadi, J.E.N. ve Kashanian, S., 2010, A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives, *Food Research International*, 43, 1223-1230.
- [52]. Sherwin, E.R., 1990, *Food Additives*, Marcel Dekker Inc., New York.
- [53]. Koudelka, S., Turanek Knotigova, P., Masek, J., Prochazka, L., Lukac, R., Miller, A.D. ve Turanek, J., 2015, Liposomal delivery systems for anti-cancer analogues of vitamin E, *Journal of Controlled Release*, 207, 59-69.
- [54]. Biparva, P., Ehsani, M. ve Hadjmohammadi, M.R., 2012, Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples, *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 87-94.
- [55]. Nacz, M., ve Shahidi, F., 2006, Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.
- [56]. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., ve Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12, 1496–1547.
- [57]. Apak, R., Capanoglu, E., ve Shahidi, F., 2018, Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays, *Measurement of Antioxidant Activity ve Capacity: Recent*

*Trends and Applications*, In: Apak, R., Capanoglu, E., ve Shahidi, F. (eds.), Chapter 2, John Wiley ve Sons Ltd, Chichester, UK, ISBN: 978-1-119-13694-9, 13–27.

[58]. Wayner, D., Burton, G., Ingold, K., Locke, S., 1985, Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins, *FEBS Letters*, 187, 33–37.

[59]. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016b, Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 1028–1045.

[60]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981.

[61]. Gorinstein, S., Leontowicz, M., Leontowicz, H. ve arkadaşları., 2006, Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats, *Nutrition Research*, 26, 362–368.

[62]. Bekdeser, B. ve Apak, R., 2024, Colorimetric sensing of antioxidant capacity via auric acid reduction coupled to ABTS oxidation, *ACS Omega*, 9 (10), 11738–11746.

[63]. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016, Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (5), 997–1027.

[64]. Zinellu, A., Sotgia, S., Usai, M.F., Zinellu, E., Posadino, A.M., Gaspa, L., Chessa, R., Pinna, A., Carta, F., Deiana, L. ve Carru, C., 2007, Plasma methionine determination by capillary electrophoresis–UV assay: Application on patients affected by retinal venous occlusive disease, *Analytical Biochemistry*, 363(1), 91–96.

[65]. Xu, H., Zhang, W., Zhu, W., Wang, D., Ye, J., Yamamoto, K., ve Jin, L., 2005, Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine and methionine in hypothyroid patients' plasma by liquid chromatography using platinum/poly(methyl violet) modified electrode, *Analytica Chimica Acta*, 545, 182–188.

[66]. Sadeeq, H. A., Awad, M. I., ve Kassem, M. A., 2024, Insight into amino acids-stabilized silver nanoparticles as a probe for quantification of methionine, *Journal of Molecular Liquids*, 398, 124272.

[67]. Deáková, Z., Duračková, Z., Armstrong, D.W., ve Lehotay, J., 2015, Two-dimensional high performance liquid chromatography for determination of homocysteine, methionine and cysteine enantiomers in human serum, *Journal of Chromatography A*, 1408, 118–124.

[68]. Malvestio, C., Onor, M., Bramanti, E., Pagliano, E., Campanella, B., ve arkadaşları., 2024, Determination of methionine and selenomethionine in food matrices by gas chromatography mass spectrometry after aqueous derivatization with triethyloxonium salts, *Food Chemistry*, 433, 137341.

[69]. Agüí, L., Manso, J., Yáñez-Sedeño, P., ve Pingarrón, J.M., 2004, Colloidal-gold cysteamine-modified carbon paste electrodes as suitable electrode materials for the

electrochemical determination of sulphur-containing compounds: Application to the determination of methionine, *Talanta*, 64, 1041–1047.

[70]. Şaylan, M., Öztürk Er, E., Tekin, Z., ve Bakırdere, S., 2020, An accurate and sensitive analytical method for the simultaneous determination of glycine, methionine and homocysteine in biological matrices by matrix matching strategy and LC–quadrupole-time-of-flight-MS/MS, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239, 118394.

[71]. Kühnreich R., Holzgrabe U., 2016, Impurity profiling of L-methionine by HPLC on a mixed mode column, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 122, 118–125.

[72]. Brosnan J.T., Brosnan M.E., Bertolo R.F., Brunton J.A., 2007, Methionine: a metabolically unique amino acid, *Livestock Science*, 112(1–2), 2–7.

[73]. Klein Geltink R.I., Pearce E.L., 2019, The importance of methionine metabolism, *Elife*, 8, 47221.

[74]. Kachungwa Lugata J., Ortega A.D.S.V., Szabó C., 2022, The role of methionine supplementation on oxidative stress and antioxidant status of poultry – a review, *Agriculture*, 12(10), 1701.

[75]. Gungör N., Özyürek M., Güçlü K., Çekiç S.D., Apak R., 2011, Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods, *Talanta*, 83, 1650–1658.

[76]. Mishra K., Ojha H., Chaudhury N.K., 2012, Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results, *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043.

[77]. Chen C., Zhao D., Lu L., Yang F., Yang X., 2015, A simple and rapid colorimetric sensor for sulfide anion detection based on redox reaction of ABTS with Au(III), *Sensors and Actuators B: Chemical*, 220, 1247–1253.

[78]. Müller L., Fröhlich K., Böhm V., 2011, Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay, *Food Chemistry*, 129(1), 139–148.

[79]. Holade Y., Hickey D.P., Minter S.D., 2016, Halide-regulated growth of electrocatalytic metal nanoparticles directly onto a carbon paper electrode, *Journal of Materials Chemistry A*, 4(43), 17154–17162.

[80]. Đurović M.D., Bugarčić Ž.D., Heinemann F.W., van Eldik R., 2014, Substitution versus redox reactions of gold(III) complexes with L-cysteine, L-methionine and glutathione, *Dalton Transactions*, 43(10), 3911–3921.

[81]. Natile G., Bordignon E., Cattalini L., 1976, Chloroauric acid as oxidant. Stereospecific oxidation of methionine to methionine sulfoxide, *Inorganic Chemistry*, 15(1), 246–248.

[82]. Hutanu A., Hauser P.C., Moritz B., Kiessig S., Noël A., Stracke J.O., Schwarz M.A., 2021, Met oxidation of proteins analyzed by affinity capillary electrophoresis in presence of silver(I) and gold(III) ions, *Electrophoresis*, 42(11), 1209–1216.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



## ETİK KURUL İZİN YAZISI

