



AMNİYOTİK SIVIDA SÜKSİNİLASETONUN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞI VE TAYİNİ

Saadet Meral KARACAN¹, Behice YAVUZ ERDOĞAN^{2*}, Atiye Nur ONAR³

¹Samsun Public Health Laboratory, 55060, Samsun, Türkiye

²Ondokuz Mayıs University, Terme Vocational School, Department of Food Processing, 55600, Samsun, Türkiye

³Ondokuz Mayıs University, Faculty of Science, Department of Chemistry, 55105, Samsun, Türkiye

Özet: Süksinilaseton (SA, 4,6 diketoheptanoik asit), kalıtsal hepatorenal tirozinemi tip I hastalığı için birincil tanı metabolitidir. Bu çalışma ile süksinilasetonun amniyon sıvısında voltametrik tayinini amaçlanmıştır. Voltametri için optimum koşullar belirlenmiştir. Destek elektrolit için 0,10 mol/L potasyum klorür kullanılmıştır. Çalışmada, asılı civa damlası (HMDE) çalışma elektrotu olarak seçilirken, referans elektrot Ag/AgCl (3M KCl), karşıt elektrot Pt olarak kullanılmıştır. Kalibrasyon için kare dalga voltametri kullanılmış, bu yöntem amniyotik sıvıya uygulandığında, süksinilaseton ekstraksiyon işleminin, metil ester oluşturduğu tespit edilmiştir. Süksinilaseton metil esteri, yapısız olarak süksinilasetondan farklı olduğu için elektrokimyasal davranışı tekrar çalışılmıştır. Voltametrik inceleme, süksinilaseton metil esterinin iki elektron transferi ile indirgendini göstermiştir. Doğrusallık aralığı $5,83 \times 10^{-5}$ – $3,25 \times 10^{-6}$ mol/L derişimleri arasındadır. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) sırasıyla $2,72 \times 10^{-7}$ mol/L ve $9,08 \times 10^{-7}$ mol/L olarak hesaplanmıştır. Amniyotik sıvı içindeki süksinilaseton metil esteri kare dalga voltametri ile analiz edilmiştir. Geri alınabilirlik %88,1 bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Süksinilaseton, Süksinilaseton metil ester, Voltametri


Electrochemical Behavior and Determination of Succinylacetone in Amniotic Fluid


Abstract: Succinylacetone (SA, 4,6 diketoheptanoic acid) is the primary diagnosis metabolite for hereditary hepatorenal tyrosinemia type I disease. In present research, voltammetric analysis of succinylacetone was aimed. The optimum conditions for voltammetry were determined. Optimum conditions for voltammetry were determined. Potassium chloride 0.10 mol/L was selected for the support electrolyte. For the experiments, hanging mercury drop (HMDE), Ag/AgCl (3M KCl) reference and Pt counter electrodes were used. Square wave voltammetry was used for calibration and when this method was applied to amniotic fluid, succinylacetone extraction process was found to form methyl ester. Since succinylacetone methyl ester has a different structure than succinylacetone, its electrochemical behavior was re-examined. Voltammetric data reveal that succinylacetone methyl ester is reduced by accepting two electrons. For calibration, concentrations in the range of 3.25×10^{-6} mol/L – 5.83×10^{-5} mol/L were used. From the calibration chart, the limit of detection (LOD) was found to be 2.72×10^{-7} mol/L and the limit of determination (LOQ) was 9.08×10^{-7} mol/L. Succinylacetone methyl ester in amniotic fluid was analyzed by square wave voltammetry. The recoverability was found to be 88.1%.


Keywords: Succinylacetone, Succinylacetone methyl ester, Voltammetry

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Ondokuz Mayıs University, Terme Vocational School, Department of Food Processing, 55600, Samsun, Türkiye

E mail: berdogan@omu.edu.tr (B. YAVUZ ERDOĞAN)

Saadet Meral KARACAN  <https://orcid.org/0000-0001-6060-3231>

Behice YAVUZ ERDOĞAN  <https://orcid.org/0000-0003-4375-4323>

Atiye Nur ONAR  <https://orcid.org/0000-0001-8984-7758>

Gönderi: 02 Ocak 2024

Kabul: 01 Şubat 2024

Yayınlanma: 15 Mart 2024

Received: January 02, 2024

Accepted: February 01 2024

Published: March 15, 2024

Cite as: Karacan SM, Yavuz Erdoğan B, Onar AN. 2024. Electrochemical behavior and determination of succinylacetone in amniotic fluid. BSJ Eng Sci, 7(2): 214-222.

1. Giriş

Genetik hastalıkların pek çoğunun henüz tedavisi bulunmamaktadır. İnsanlar genetik bir rahatsızlık tehlikesi taşıyabilir. Fakat bu risk kimi ailelerde daha çoktur. Kalıtım uzmanları, yetişkin bireyler ve çocuklarda oluşabilecek kalıtsal rahatsızlık tehlikelerini saptayabilir (Anonim, 2010). Bugünlerde kalıtsal rahatsızlıkların önceden belirlenebilmesi, meydana gelebilecek kusurların önlenilmesini, iyileşme şansı olmayan rahatsızlıklarda yaşam süresinin uzatılmasını ve yaşam kalitesinin artırılmasını sağlayabilmektedir.

Tirozin, hem bitkisel hem de hayvansal birçok proteinin yapısında olan, aynı zaman da karaciğerde parçalanmış bir aminoasittir. Tirozinemi, tirozin metabolizmasının

resesif, otozomal bir hastalık sınıfıdır. Bu hastalık grubunda; geçici tirozinemi, tirozinemi tip I, tirozinemi tip II, tirozinemi tip III bulunmaktadır.

Geçici tirozinemi, yeni doğmuş bebeklerde 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaz enziminin fizyolojik şekilde olgunlaşmaması halinde görülebilir. Tirozinemi tip I, fumarilasetoasetaz hidrolaz (FAH); tirozinemi tip II, tirozin aminotransferaz ve tirozinemi tip III ise 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaz eksikliğinde oluşmaktadır.

Tirozinemi tip I, akut veya kronik biçimde seyredebilir. Bu durum FAH enziminin miktarı ile yakında ilişkilidir. Hastalık ile oluşan klinik bulgular, büyüme güçlüğü, kusma, diyare, ateş, hepatit, ödem, karaciğer büyümesi



şeklinde emareler ve hatta ölümlü sonuçlanabilecek ileri boyutta karaciğer rahatsızlığı da olabilir (Macşai ve ark., 2001, Şinka ve ark., 2005).

Genetik ve bazı metabolik hastalıklar, aminoasitlerin takibi veya plazma, idrar, amniyon sıvısı gibi biyolojik ortamlarda organik asitlerin tayini ile belirlenebilir. Ceninin korunması ve fetal organların gelişiminde amniyon sıvısının rolü büyüktür. Genellikle otuzbeş üzeri ileri yaş hamileliklerinde yada cenin gelişiminde bir anormallik olursa, amniyon sıvısı incelenir (Tuma ve ark., 2006).

Tirosinemi tip I'in teşhisinde kullanılan tayin metodlarının çoğu gaz kromatografi (GC) ve sıvı kromatografi (LC) gibi kromatografik yöntemlerdir ve bu tekniklerde genellikle dedektör olarak kütle spektrometresi (MS) kullanılır. Klinik laboratuvarlarda çoğunlukla idrarda ve serumda süksinilaseton tayini için GC/MS kullanılmaktadır (Cry ve ark., 2006). Tandem kütle spektrometrisi (MS/MS), yenidoğan taraması (NBS) uygulamaları için kurutulmuş kan lekelerinde kullanılır. LC-MS/MS, FIA-MS/MS veya genomik tarama da dahil olmak üzere diğer yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda uygulanır (Michael ve ark., 2022). Bu tekniğin uygulanması için, örneklerdeki ön işlemler, türevlendirme, analiz süresi, çok fazla miktarda kimyasal kullanımları ve pahalı yöntemler olmalarıdır.

Elektrokimyasal yöntemler, hassasiyeti yüksek ve çok yönlü analitik tekniklerdir. Elektrokimyasal ölçümler iki boyutlu tekniklerdir. Niteliksel özellikler, termodinamik veya kinetik kontrolle belirlenebilir, niceliksel özellikler, ilgili akımın kütle taşıma süreci veya reaksiyon hızları tarafından kontrol edilir. Böylece, bileşikler seçici olarak elektrokimyasal yöntemlerle tespit edilir. Benzerlik nedeniyle elektrokimyasal ve biyolojik reaksiyonlarda, yükseltgenme/indirgenme mekanizmalarının elektrotta ve vücutta benzer prensipleri paylaşmaktadır. Biyolojik olarak önemli moleküller voltametri ile elektroanalitik olarak incelenirler. Voltametri doğruluğu ve kesinliği yüksek nispeten düşük maliyetli bir akım-voltaj tekniğidir. (Uslu ve Ar., 2004).

Bildiğimiz kadarıyla, süksinilaseton veya süksinilaseton metil esterini için HMDE ile uygulanan voltametrik ve elektrokimyasal davranışın sunulduğu bir yöntem literatürde yoktur. Bu çalışmada önce süksinilaseton çalışılmıştır. Sonra gerçek numune incelenmeye başlandığında görülmüştür ki, süksinilaseton ambiyotik sıvıda süksinilaseton metil esterine dönüşmektedir. Bunun üzerine voltametrik çalışmalarda başa dönülüp, süksinilaseton metil esterini üzerine yoğunlaşmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Elektrokimyasal ölçümler, Gamry Instruments (Reference600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA, Warminster USA) ile üç elektrot içeren bir hücre kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan elektrotlar: HMDE çalışma elektrodu, platin (Pt) tel karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3M KCl) referans elektrotudur. İnfrared spektrumları, Bruker Vertex 80V marka infrared (IR)

spektroskopisi cihazı ile çekilmiştir. İnce tabaka için Silikagel F 25, çözelti pH'ı için Jenway 3040 iyon /pH metre, Eutech Instrument kombine cam elektrot kullanılmıştır. Ultra saf su için Millipore (Simplicity) marka saflaştırma sistemi kullanılmıştır.

Tüm kimyasallar analitik reaktif sınıfındadır. Süksinilaseton (SA) (Sigma), potasyum klorür, fosforik asit, sodyum hidroksit, metil alkol, XAD-4, petrol eteri, hidroklorik asit (Merck) kullanılmıştır.

Stok standart çözelti (1,70x10⁻³ mol/L) süksinilaseton tartılarak ve su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Standart çalışma çözeltileri stoktan seyreltilerek günlük olarak hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler 0,45 µm membran filtreden (Millipore) süzülmesi ve soğutucuda (4°C) tutulmuştur.

2.1. Örneklerin Hazırlanması

0,1 M, pH'ı 3,0 olan fosforik asit tamponu; H₃PO₄ kullanılarak hazırlanmış ve pH'ı sodyum hidroksit ile ayarlanmıştır. Tüm prosedürde ultra saf su kullanılmıştır. Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı bünyesinde, alışagelmis çalışmalar için kullanılan, aynı zamanda genetik analizi tamamlanan amniyotik sıvılarda çalışılmıştır. Amniyotik ortamda süksinilaseton miktarını belirlemek için ön işlem olarak ekstraksiyon, tayin için voltametrik metod çalışmıştır. Amberlit XAD-4 (2,5 g) amniyotik sıvıdan süksinilaseton ekstrakte etmek için belirlenmiştir. Önce reçine üzerine 2 mL su, ardından 50 mM, pH'ı 2,0 olan 2 mL fosfat tamponu ve son olarak 2 mL metanol geçirerek aktive edilmiştir. Aktive olan XAD-4 ten 4 mL amniyotik sıvı, 12 mL, 50 mM pH'ı 2 olan fosfat tamponu geçirildikten sonra 12 mL metil alkol içine ekstrakt alınmıştır.

2.2. Esterleşme

Çalışma sırasında amniyotik sıvı içerisinde asidik ortamda metil alkol ile ester oluşumu tespit edilmiştir. Çalışmaları ester ile devam ettirmek adına ester elde edilmiştir. Bu amaçla 1N HCl bulunan ortama süksinilaseton ve metanol (1:1:1) oranda eklenmiştir (Cerde ve ark., 2008). Reaksiyonun oluşum koşulları; 30 dk., 39 °C'lık su banyosunda bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Ester oluşumu infrared spektrumları alınarak kanıtlanmıştır.

2.3. Elektrokimyasal Ölçümler

Civa elektrot ile kare dalga (SQW) ve dönüşümlü voltametri (CV) çalışılmıştır. Voltametrik hücre içerisine 10 mL ilave edilen destek elektrolit çözeltisinden 5 dakika boyunca azot gazı geçirilir. Destek elektrolit çözeltisinin voltamogramı alındıktan sonra voltametrik hücreye süksinilaseton stok çözeltisi eklenmiş ve 2 dakika azot gazı geçirildikten sonra tekrar voltamogram alınmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda Ag/AgCl elektroduna karşı -1,684V potansiyelde süksinilaseton piki doğrudan amniyon sıvısı seyreltilerek kullanıldığında bu bölgeyi yayvan şekilde örten bir pik nedeni ile belirlenememiştir. Sonrasında ekstraksiyon yapılmış ve voltamogramı alınmıştır. Burada farklı bir pik gözlenmiştir. Konu üzerine araştırma yapıldığında görülmüştür ki süksinilaseton metil alkol ile süksinilaseton metil

esterine dönüşebilmektedir. Emin olmak için infrared (IR) spektrometri ve ince tabaka kromatografi (TLC) ile çalışılmış ve süksinilaseton metil esterinin süksinilasetondan farkı incelenmiştir. Tüm bunların sonrasında süksinilaseton için yapılan çalışmalar süksinilaseton metil esteri için güncellenmiştir.

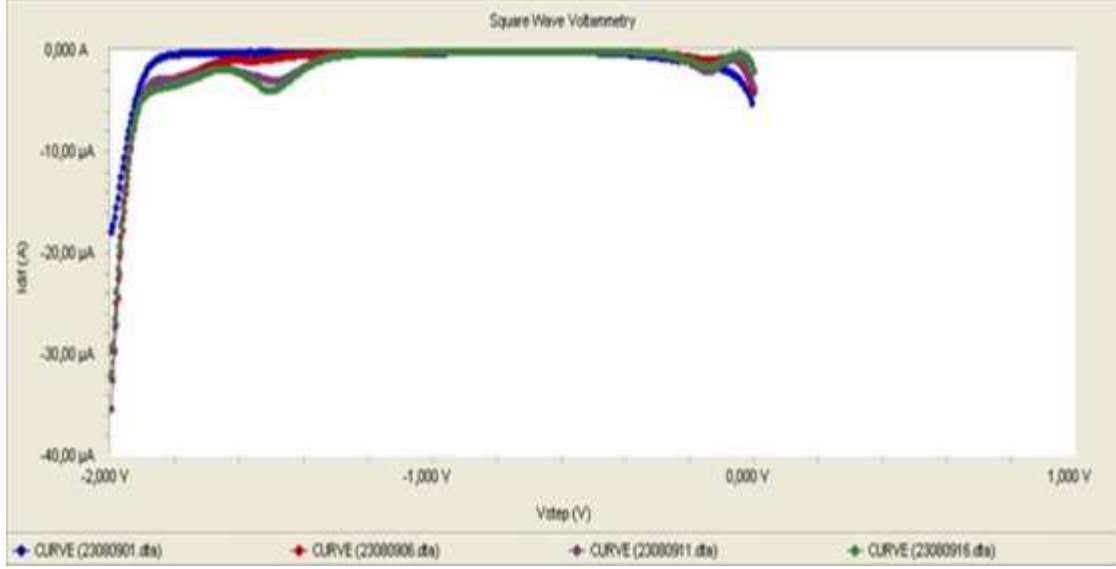
2.4. İnce Tabaka Çalışması

Süksinil aseton metil esterinin dönüşümünü izlemek için, süksinil aseton ve ekstraksiyon sonrası elde edilen ürün ince tabaka kromatografi ile incelenmiştir. Bu işlem için Silikagel F 25 marka, 60A⁰ partikül boyutuna sahip

silikajel ile kaplı ince tabaka plakaları ve yürütücü olarak, metil alkol ve petrol eteri (3:2) karıştırılarak kullanılmış ve deney sonrası lekeler UV(254 nm) ışığı ile tespit edilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmanın en başında süksinil aseton ile yöntem oluşturulup gerçek numunelere geçme aşamasında iken amniyon sıvısıyla direk çalışmanın mümkün olmadığı belirlenmiştir. Sonrasında ekstraksiyon yapılmış ve voltamogramı alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. (0,1)M KCl çözeltisinde, amniyotik sıvıdan ekstrakte edilen süksinilaseton için kare dalga voltamogramı. 0,01 V, potansiyel adımı, 100 Hz, frekans; (-2,0 ve 0) V potansiyel aralığı.

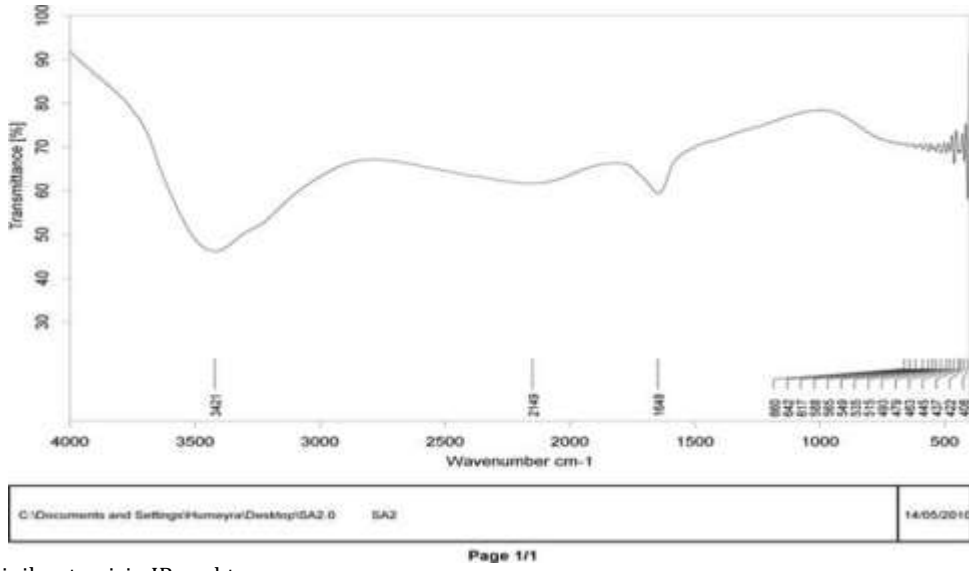
Burada farklı bir bölgede oluşan bir pik gözlenmiştir. Konu üzerine literatür araştırması yapıldığında görülmüştür ki süksinilaseton, asidik ortamda metil alkol ile süksinilaseton metil esterine dönüşebilmektedir. Bu dönüşümü daha iyi ortaya koyabilmek için, infrared spektrumu alınarak değerlendirilmiştir. Süksinilaseton ve yapılan süksinilaseton metil esteri için IR spektrumları Şekil 2 ve Şekil 3'de sunulmuştur. Süksinilaseton metil esteri olduğunu düşündüğümüz maddenin IR spektrumu süksinilasetona ait spektrumdan farklı şekilde 2953, 2842, 1109 ve 1016 cm⁻¹ de pikler vermiştir. IR spektrumundaki, 2953 cm⁻¹ ve 2842 cm⁻¹ deki pikler muhtemelen alifatik C-H fonksiyonel sınıfındadır. 2950 ve 2860 cm⁻¹ arası alifatik C-H alanıdır. 1641 ve 1648 cm⁻¹de görünen piklerin karbonil gruplarına ait olması muhtemeldir. Fakat ortamda çokça bulunan su IR absorpsiyonu yaptığı için pikler düşünülen daha küçük dalga sayılarında gelmiştir ve 1109 ve 1016 cm⁻¹de görünen pikler C-O-C (O=C-O-CH₃) grubunu temsil edebilir. Tüm bu veriler esterleşmenin meydana geldiğini düşündürmüştür.

Ayrıca, ince tabaka kromatografi ile süksinilasetonun ve süksinilaseton metil esteri arasındaki farklılık incelenmiştir (Şekil 4). Fotoğraftan anlaşıldığı üzere süksinilaseton, metanol ve petrol eteri, yürütücü faz ile

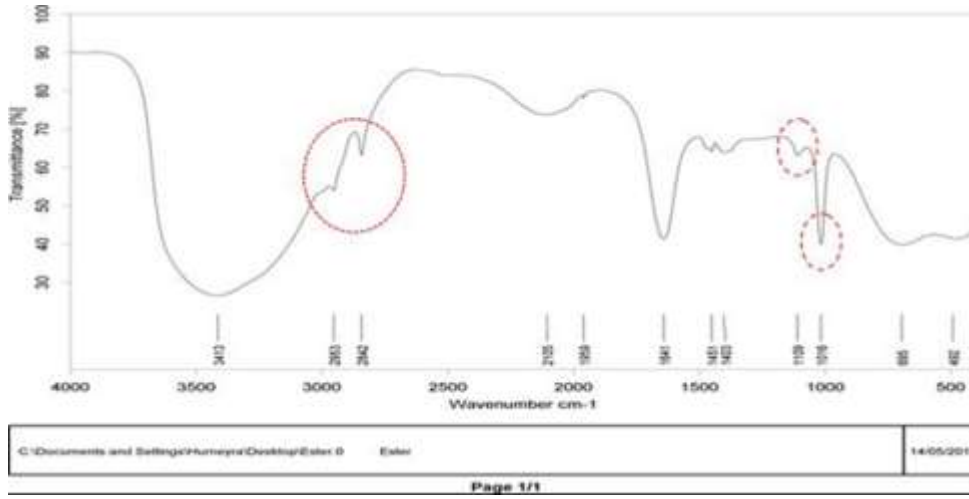
plaka üzerinde yol alırken süksinilasetonun metil esteri sabit kalmıştır. Sonuç süksinilasetonun ürüne (estere) dönüştüğünü göstermektedir. Tüm bunlardan sonra çalışmada yön süksinilaseton metil esterine çevrilmiştir.

Dönüşümlü voltametri yöntemiyle Süksinilaseton metil esteri çalışılmıştır. 0,1 M KCl içeren destek elektrolit, (-1,00V) – (-2,00V) potansiyel aralığında, 0,05V potansiyel adımında, 0,010 V potansiyel genişliğinde ve 50 Hz frekans ile uygulanmıştır. Voltamogramda Ag/AgCl'e karşı-1,723V potansiyelde bir indirgenme piki izlenmiştir. Yükseltgenme doğrultusunda herhangi bir pik bulunmadığı için, elektrokimyasal tepkimenin tersinir olmadığı sonucuna varılmıştır(Şekil 5). Bu yöntemdeki pik akımı ve pik potansiyel verileri kaydedilmiştir.

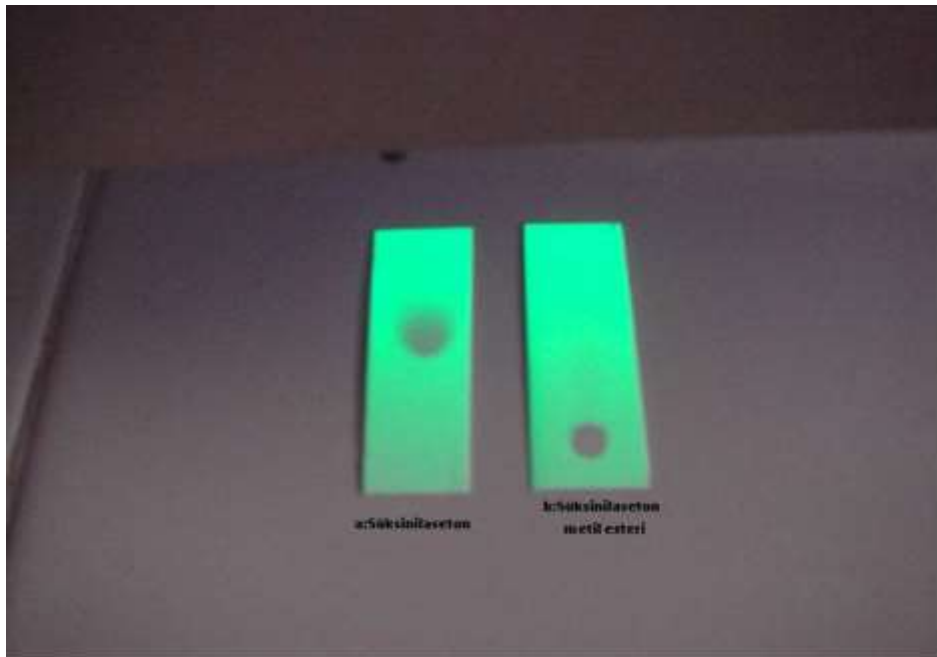
Akımın logaritmasına karşı tarama hızının logaritması grafiğe geçirildiğinde hazırlanan grafikteki eğri eğiminin 0,152 yani 0,5'ten küçük olduğu görülmüştür (Şekil 6). Bond ve arkadaşlarına göre bu eğim 0,5'ten büyük olması durumunda bileşiğin elektrot yüzeyinde adsorbe olduğu sonucuna varılır (Bond ve ark.,1980). Bu sebeple 1,95xE-05 M derişimde süksinilaseton metil esterinin indirgenme reaksiyonunun difüzyon kontrollü olduğu anlaşılmaktadır.



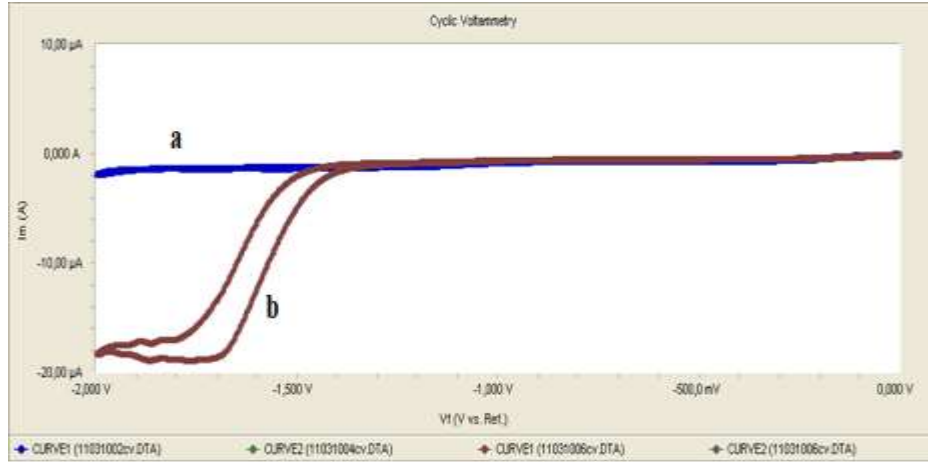
Şekil 2. Süksinilaseton için IR spektrumu.



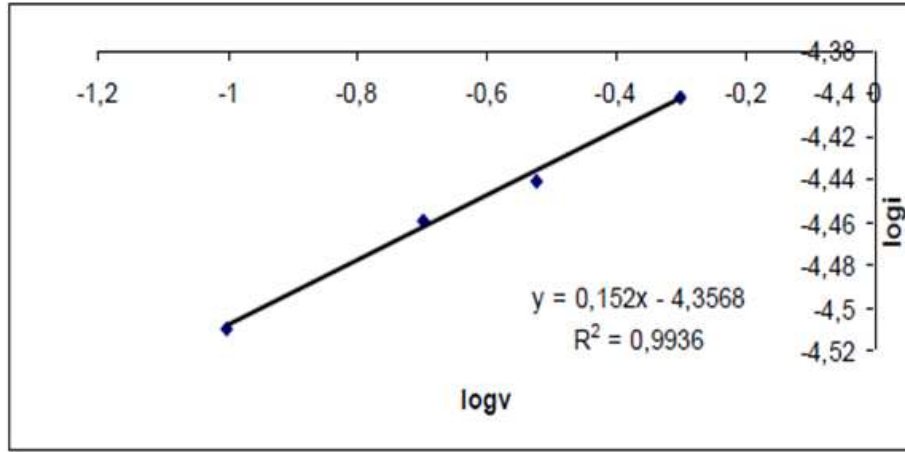
Şekil 3. Süksinilaseton metil esteri için IR spektrumu.



Şekil 4. Süksinilaseton ve süksinilaseton metil ester bileşiklerinin ince tabaka kromatografi plakaları üzerinde aldıkları yol. a) $4,57 \times 10^{-2}$ M süksinilaseton b) $2,28 \times 10^{-3}$ M süksinilaseton metil esteri.



Şekil 5. 1,95x10⁻⁵ M Süksinilaseton metil esterinin, 0,2 V tarama hızında dönüşümlü voltamogramı a) 0,1 M KCl çözeltisinde b) 0,1 M KCl çözeltisine 1,95x10⁻⁵ M süksinilaseton metil esterini ilavesi ile alınan dönüşümlü voltamogramlar.



Şekil 6. 1,95x10⁻⁵ M süksinilaseton metil esterinin, tarama hızı ve akımın logaritma grafiği.

Uslu ve arkadaşları, tarama hızı karekökü ile pik akımındaki doğrusal artışın, çalışılan CV de difüzyon kontrollü bir süreci gösterdiğini belirtmiştir (Uslu ve ark.,2004). Tarama hızının kareköküne karşı pik akım grafiği hazırlandığında pik için R²=0,8322 korelasyon katsayısı vermiştir (Şekil 7). Bu durumda difüzyon kontrolünü gösterir. Wang ve arkadaşları tarama hızının logaritmasının pik potansiyeline karşı grafiğe geçirildiğinde hazırlanan grafik doğru çıkmamışsa, bu durumda elektrokimyasal reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu söylemişlerdir (Wang ve ark., 1986). Bu şekilde tarama hızının logaritmasının pik potansiyeline karşı hazırladığımız grafiğinde doğrusallık izlenmediği için Süksinilaseton metil esterinin indirgenme reaksiyonu difüzyon kontrollü olduğu sonucuna varılmıştır.

Tepkimede aktarılan elektron sayısını bulmak için akım örneklemeli polarografi ile çalışılmıştır. Destek elektrolit (0,1 M KCl) çözeltisi ve 1,05x10⁻⁴ M süksinilaseton metil esterini eklenerek akım örneklemeli polarografi çalışılmıştır. Bu yöntem ile alınan polarogramlar da süksinilaseton metil esterinin verdiği sınır akımı, i_d = 3,14x10⁻⁷ A ile yaklaşık -1,74 V potansiyelde izlenmiştir. Ardından, örneklemeli doğrusal tarama polarogramlarından elde

edilen veriler, potansiyele karşı log i/(i_d-i) grafiğini çizmek için kullanılmıştır. Bu grafikten elde edilen doğrunun eğimi 30,705 olarak bulunmuş ve eşitlik 1' de kullanılmıştır (Şekil 8).

$$m = \frac{nF}{22,303RT} \quad (1)$$

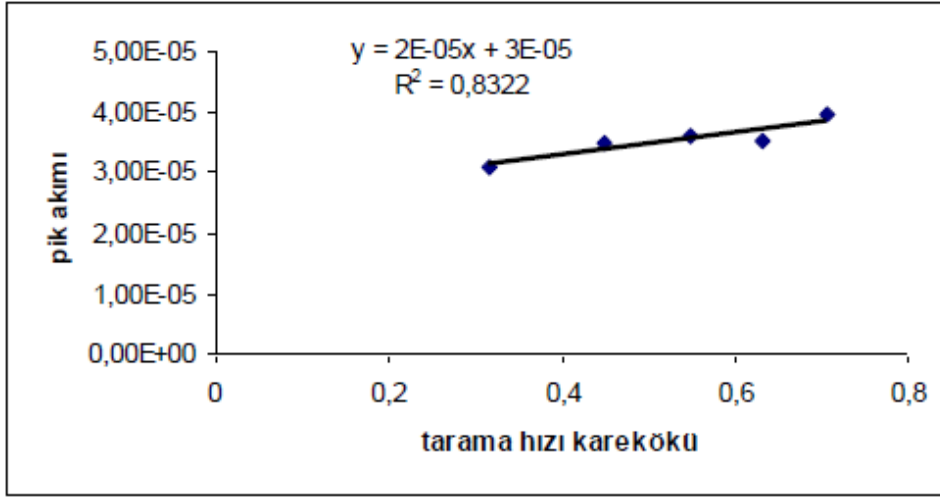
m: doğru eğimi;

R= ideal gaz sabiti (8,314 j/molK);

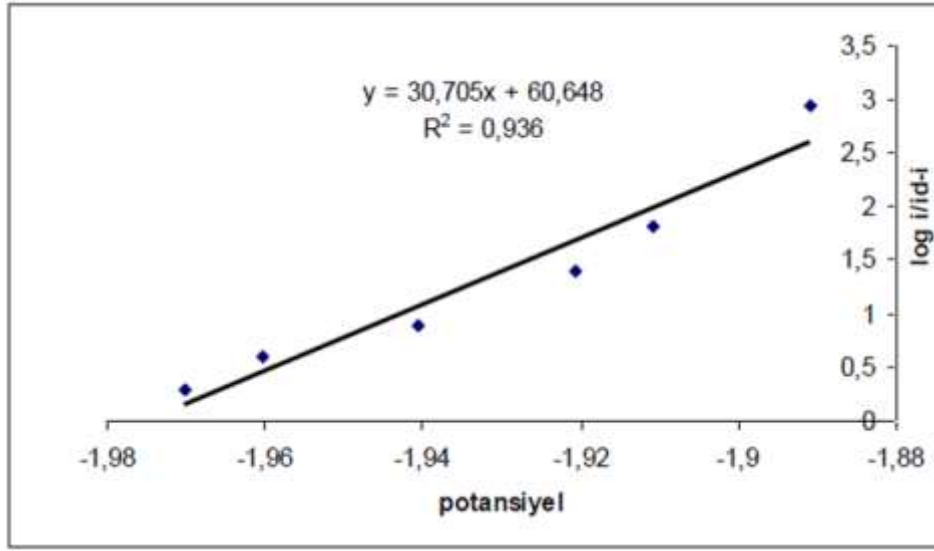
F= Faraday sabiti (96486); T: sıcaklık (K);

n: aktarılan elektron sayısı

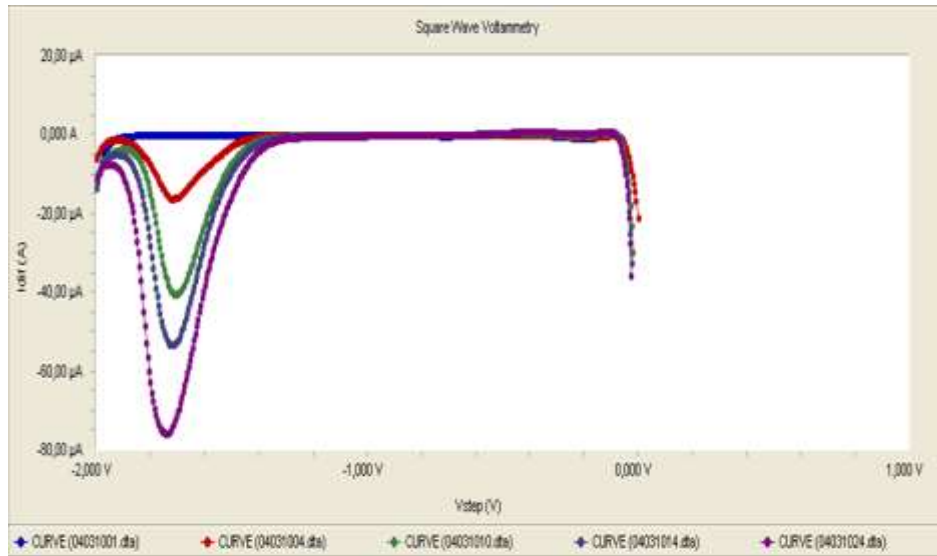
Eşitlik 1 de yapılan hesaplamalar sonrası n değeri 2 çıkar. Bu durum bize süksinilaseton metil esterinin elektrokimyasal reaksiyonda aktarılan elektron sayısının iki olduğunu vermektedir. Süksinilaseton metil esterinin kalibrasyon eğrisini hazırlamak için; süksinilaseton metil esterini kare dalga voltametri yöntemiyle 3,25x10⁻⁶ - 5,83x10⁻⁵ mol / L derişim aralığında çalışılmış, alınan voltamogramlar Şekil 9 ve Şekil 10' da sunulmuştur. Kalibrasyon eğrisi ile bulunan geçerlilik değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Tabloya göre tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri sırasıyla 2,72x10⁻⁷ ve 9,08x10⁻⁷ M olarak bulunmuştur.



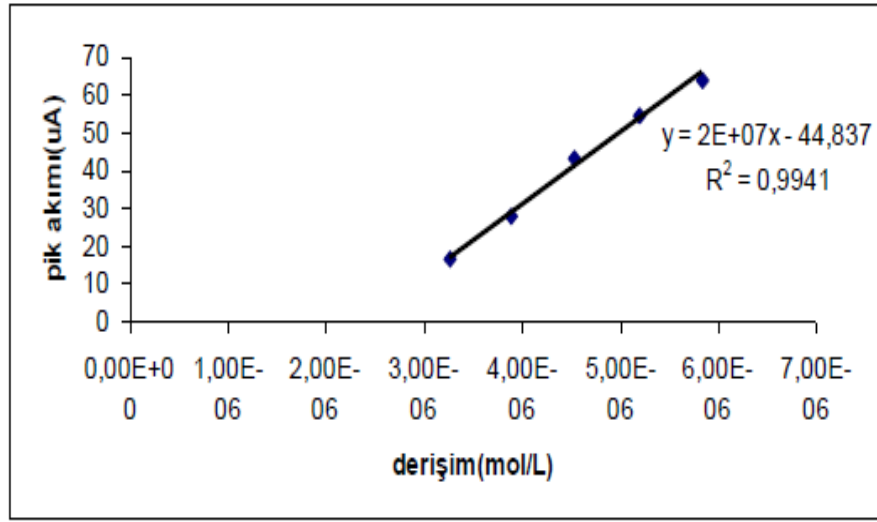
Şekil 7. $1,95 \times 10^{-5}$ M süksinilaseton metil esterinin, tarama hızının kareköküne göre akım değerleri grafiği.



Şekil 8. $1,05 \times 10^{-4}$ M süksinilaseton metil esterinin, tarama hızı; 0,05 V/s iken, potansiyele göre $\log i/(id-i)$ değişim grafiği.



Şekil 9. 0,1 M KCl çözeltisinde $3,25 \times 10^{-6}$ – $5,83 \times 10^{-5}$ M derişimleri arasında süksinilaseton metil esterinin kare dalga voltamogramları.



Şekil 10. Kare dalga voltametri ile 3,25xE-06 – 5,83xE-05 M derişim aralığındaki Süksinilaseton metil esteri için kalibrasyon eğrisi grafiğı.

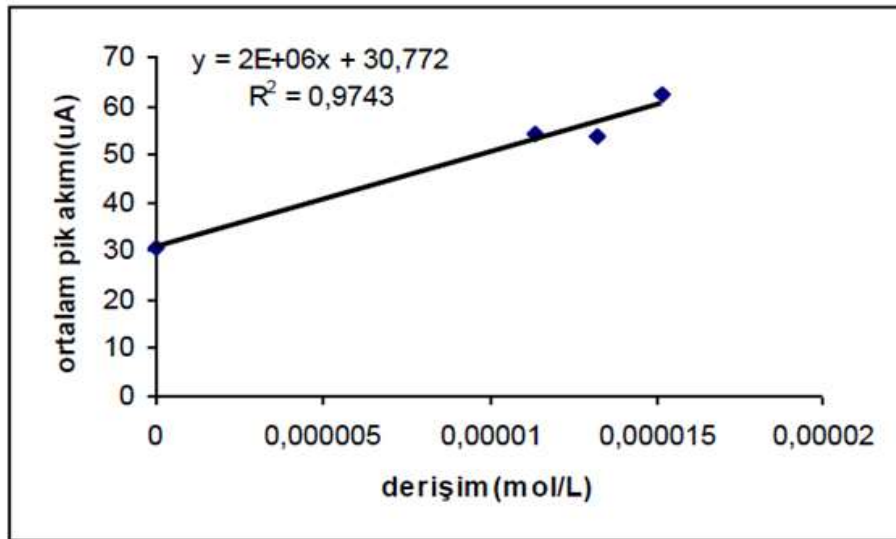
Tablo 1. Önerilen SQW yöntemi ile süksinilaseton metil esterinin doğrusal regresyon ve istatistiksel parametreleri

Parametre	Kare dalga voltametrik yöntem
Doğrusal Derişim Aralığı	3,25xE-06 – 5,83xE-05 M
Eğim	2,00xE07
Kesim Noktası	44,827
S _a *	3,90
S _b **	8,44xE-05
LOD	2,72xE-07
LOQ	9,08xE-07
Regresyon Katsayısı	0,9941

S_a* kesim noktasının standart sapması, S_b** eğimin standart sapması

Amniyon sıvısından süksinilaseton metil esterinin geri alınabilirliği için; Amniyotik sıvıya katılan süksinilaseton metil esterinin ve geri alınabilirlik değerlerini belirlemek

amacıyla standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Standart eklemede katılan süksinilaseton metil ester konsantrasyonları sırasıyla 1,13xE-05, 1,32xE-05 ve 1,52xE-05 mol/L olan çözeltilerdir. Kare dalga voltametri yöntemi sonucunda alınan voltamogramlardan elde edilen ortalama pik akımları - konsantrasyon grafiğı hazırlanmıştır. Bulunan doğrunun x ekseninden geçtiğı nokta amniyotik sıvıya eklenen süksinilaseton metil ester miktarının belirlenmesine olanak sağlamıştır (Şekil 11). Eklenen örneklerdeki süksinilaseton metil esterinin % geri alınabilirlik değerleri Tablo 2’de verilmiştir. Bu tabloya göre amniyon sıvılarında ise süksinilaseton metil esterinin geri alınabilirlik değeri ortalama %88,1 olarak bulunmuştur. Bu değerde yöntem validasyonunda bir kriter olarak kullanılan %80-120 aralığında yer almaktadır (Ermer ve ark., 2005). Süksinilaseton metil esteri, KCl destek elektrolit ortamında bir adet indirgenme piki vermektedir. Esterleşme mekanizması ve elektrot yüzeyinde gerçekleştiğı düşünölen mekanizma Şekil 12’de verilmiştir.

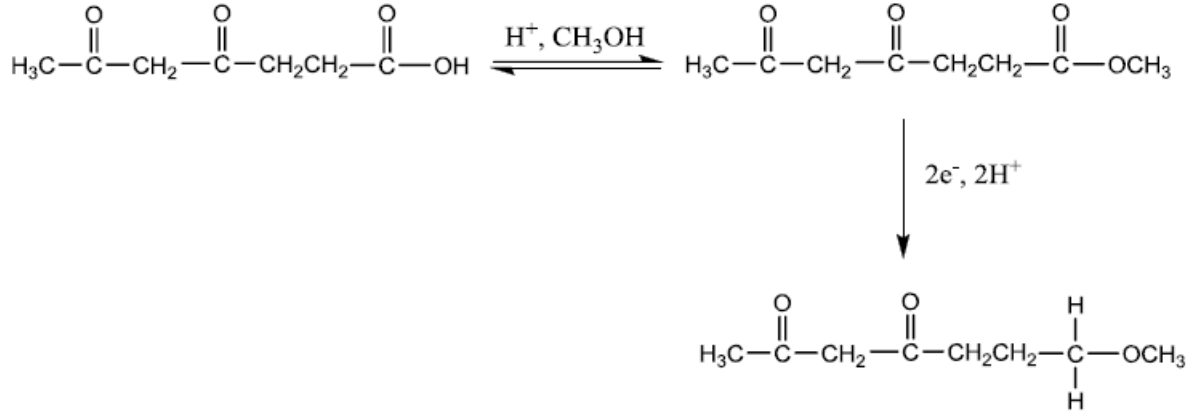


Şekil 11. Amniyon sıvısına eklenen süksinilaseton metil esteri miktarı ve geri alınabilirliğini tespit etmek için yapılan standart ekleme grafiğı.

Tablo 2. Eklenmiş örneklerdeki süksinilaseton metil esterinin % geri alınabilirlik değerleri*

Amniyon sıvısı	Eklenen süksinilaseton metil ester miktarı (M)	Geri alınan süksinilaseton metil ester miktarı (M)	% geri alınabilirlik
AS1	9,27xE-06	6,77x E-06	73,05(±0,99)
AS2	9,27x E-06	9,73 x E-06	104,96(±0,56)
AS3	9,27x E-06	8,63x E-06	88,76(±0,52)
AS4	9,27x E-06	7,94x E-06	85,63(±1,02)

*Her bir numune için üç kere ölçüm alınmıştır.



Şekil 12. Süksinilasetonun asidik ortamda metil alkol ile verdiği esterleşme tepkimesinin mekanizması.

4. Sonuç

Literatür araştırmalarında süksinilaseton ve süksinilaseton metil esterleri için amniyotik sıvıda civa elektrot ile elektrokimyasal davranışının açıklandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Civa elektrotta ortaya çıkan indirgenme akımının difüzyon kontrollü olduğu elektrot yüzeyinde adsorplanmadığı açıklanmıştır. Süksinilasetonun amniyotik sıvıda esterleşme mekanizması verilmiştir. Önerilen voltametri yöntemi, süksinilaseton metil esterleri dolayısıyla süksinilaseton için amniyotik sıvıda kolaylıkla uygulanabilir. Önerilen analitik prosedür hem maliyet hem de zaman açısından basit ve ekonomiktir. Yöntemin geçerliliği ve geri alınabilirliği kabul edilebilir sınırlarda görünmektedir.

Katkı Oranı Beyanı

Yazar(lar)ın katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Tüm yazarlar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	S.M.K.	B.Y.E.	A.N.O.
K	30	20	50
T		100	
Y		100	
VTI	90	10	
VAY	80	10	10
KT	60	40	
YZ		100	
KI		100	
GR		100	
PY	50	10	40
FA	50		50

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

Çatışma Beyanı

Yazarlar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedirler.

Etik Onay Beyanı

Amniyotik sıvılar Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan alınarak kullanılmış olup Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik

Araştırma Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır (onay tarihi: 16 Nisan 2008, onay numarası: OMÜ Etik 2008/164).

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışmanın Ondokuzmayıs Üniversitesinde OMÜ F-445 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim. 2010. Prenantal Diagnosis. URL: <http://www.genetikbilimi.com/genbilim/prenantal.htm> (Erişim tarihi: 15 Haziran 2010).
- Bond AM. 1980. Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry. Marcel Dekker, New York, USA, pp: 196.
- Cerda B, Cherkasskiy A, Li Y. 2008. United States Patent Application Publication. Pub. No. US2008/0274563 A1.
- Cry D, Giguère R, Vilain, LB, Drouin R. 2006. A GC/MS validated method for the nanomolar range determination of succinylacetone in amniotic fluid and plasma: An analytical tool for tyrosinemia type I. *J Chromatogr B*, 832: 24-29.
- Ermer J, Miller JHM. 2005. Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. In: Ermer J, Miller JHM editors. Wiley, VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp: 200.
- Macsai MS, Schwartz TL, Hinkle D, Hummel MB, Mulhern MG, Rootman D. 2001. Tyrosinemia Type II: Nine Cases of Ocular Signs and Symptoms. *Am J Ophthalmol*, 132: 522-527.
- Michael HG, Khaja B, Alberto B, Hsiao-Jan C, Yin-Hsiu C, George D, Christine D, Roberto G, Amy H, Xinying H, Shu-Min K, Hamid K, Tracy K, Francyne K, Hsuan-Chieh L, Monica M, Adrienne M, Joseph O, Yin P, Enzo R, Andreas R, Nicolas SF, Coleman TT, Frédérick MV, Li-yun W, Dietrich M. 2022. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry in newborn screening laboratories. *Int J Neonatal Screen*. 8,4: 62.
- Shinka T, Ohse M, Inoue Y, Kuhara T. 2005. Stability of 5-aminoevulenic acid on dried urine filter paper for a dignostic marker of tyrosinemia type I. *J Chromatogr B*, 823: 44–46.
- Tuma P, Samcova E, Anđelova K. 2006. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogr B*, 839:12-18.
- Uslu B, Ozkan SA. 2004. Anodic voltammetry of abacavir and its determination in pharmaceuticals and biological fluids *Electrochim Acta*, 49(25): 4321–4329.
- Wang J, Tuzhi P, Lin MS and Tapia T. 1986. Trace measurements of the antineoplastic agent methotrexate by adsorptive stripping voltammetry. *Talanta*, 33 (9): 707-712.