

Araştırma Makalesi - Research Article

2-(karbazol-3'-il)-5-formilpiridin: Floresans Biyotiyol Sensör Özelliğinin İncelenmesi

2-(carbazole-3'-yl)-5-formylpyridine: Investigation of the Fluorescence Biothiol Sensor Property

Ahmet Battal^{1*}, Nuray Altınölçek²

Geliş / Received: 31/07/2021

Revize / Revised: 26/08/2021

Kabul / Accepted: 27/08/2021

ÖZ

Bu çalışmada 2-(karbazol-3'-il)-5-formilpiridin molekülü floresans prob olarak biyotiyol (sistein, homosistein ve glutatyon) moleküllerinin tayin ve tespitinde kullanıldı. Probu bu biyotiyollere karşı duyarlılık ve seçiciliği UV-vis ve PL spektrometreleri ile incelendi. Prob, 1:9 DMSO:HEPES Tampon çözeltisi (0.1 M, pH:7.4) içerisinde biyotiyoller arasından sisteine karşı 60 eşdeğerde emisyon artışı ile seçicilik gösterdi. Ayrıca prob ile biyotiyoller arasında oluşan yeni yapı ¹H NMR ve MS spektrometreleri ile de takip edilerek teyit edildi.

Anahtar Kelimeler- *Aldehit Grup, Biyotiyol, Fiziksel Özellikler, Karbazol, Sensör*

ABSTRACT

In this study, 2-(carbazole-3'-yl)-5-formylpyridine molecule was used as a fluorescence probe for the determination and detection of biothiol (cysteine, homocysteine and glutathione) molecules. The sensitivity and selectivity of the probe to these biothiols were examined with UV-vis and PL spectrometers. The probe showed selectivity among biothiols in 1:9 DMSO:HEPES solution (0.1 M, pH:7.4) with an emission increase of 60 equivalents against cysteine. In addition, the new structure formed between the probe and the biothiols was confirmed by monitoring with ¹H NMR and MS spectrometers.

Keywords- *Aldehyde Group, Biothiol, Physical Properties, Carbazole, Sensor*

¹*Sorumlu yazar iletişim: a.battal@alparslan.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0003-0208-1564>)

Sınıf Eğitimi Bölümü, Eğitim Fakültesi, Muş Alparslan Üniversitesi, 49100, Muş, Türkiye

²İletişim: nurayaltinolcek@hotmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-9553-1474>)

Kimya Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Bursa Uludağ Üniversitesi, 16059 Nilüfer, Bursa, Türkiye

I. GİRİŞ

Sistein (Cys), homosistein (Hcy) ve glutatyon (GSH) biyolojik öneme sahip tiyollerdir [1-3]. Vücutta bu tiyollerin eksikliği veya fazlalığı birçok hastalığa (Alzheimer, sedef hastalığı, Parkinson, karaciğer hasarı, lökosit kaybı gibi) sebep olmaktadır [3-5]. Bu nedenle biyolojik tiyollerin yüksek seçicilik ve duyarlılıkta tayini son derece önemlidir. Bu tiyoller yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kapiler elektroforez ve kütle spektrometresi (MS) gibi çeşitli analitik yöntemlerle tayin edilebilmektedir [3,4,6]. Ancak bu tayinlerde ayırma ve saflaştırmada zorluk, aletlerin pahalı ve karmaşık olması gibi dezavantajları vardır [7,8]. Bu sebeple son zamanlarda floresans spektroskopisi kolay kullanıma sahip olması, biyolojik sistemlerde hem in vivo hem de in vitro olarak çalışılabilmesi ve yüksek hassasiyetinden dolayı öne çıkmakta olup oldukça ilgi görmektedir [3,9]. Biotiyol moleküllerinde tiyol grubunun güçlü nükleofilik özellik göstermesi ise kolayca birçok reaksiyon vermesini sağlar. Örneğin, aldehitlerle halkalaşma, α,β -doymamış karbonil gruplarıyla Michael katılması ve aromatik yer değiştirme yeniden düzenleme gibi reaksiyonlar bunlardan bazılarıdır [1,10,11]. Literatürde bu konuda birçok çalışma da mevcuttur [12-18]. Biz ise bu çalışmada tiyollerin aldehitlerle verdiği halkalaşma reaksiyonunu kullanarak daha önce sentezini rapor ettiğimiz [19] 2-(N-hekzil-karbazol-3'-il)-5-formilpiridin molekülü Prob 1'in floresans sensör özelliğini inceleyeceğiz. Ayrıca bu halkalaşma reaksiyonunun oluşumunu NMR ve MS gibi spektroskopik yöntemlerle de takip ederek teyit edeceğiz.

II. MATERYAL VE METOT

A. Deneysel Ekipmanları

Prob 1, tarafımızdan dört adımda sentezlenmiş olup, sentez detayları 2020 yılında yayınlanan makalemizde paylaşılmıştır. Sigma-Aldrich firmasından satın alınan Sistein (Cys), Homosistein (Hcy) ve Glutatyon (GSH) analitlerinden Cys ve GSH buzdolabında, Hcy ise derin dondurucu içerisinde muhafaza edilmiştir. Absorpsiyon (soğurma) ve emisyon spektrumları Horiba şirketine ait Duetta Floresans ve Absorbans Spektrometresi ile alındı. Prob 1 ve analitin reaksiyonu sonucu oluşan ürünün kütle takibi Bruker marka microTOFq isimli Kütle Spektrometresi ile yapıldı. Elektrosprey iyonlaştırma tekniği ve pozitif iyon modu kullanıldı. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumları ise Bruker marka Avance III (400 MHz) kodlu NMR spektrometresi ile alındı.

B. Deneysel Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Bu sensör araştırmasında kullanılan çözeltilerin hazırlanma aşamaları aşağıda verilmiştir.

1) HEPES tampon çözeltisi (1 L, 0.1 M ve 7.4 pH değerli): HEPES Sigma-Aldrich Firmasından temin edildi. HEPES'in tampon çözeltisini hazırlamak için önce 0.9 mL saf su içerisinde 0.1 M HEPES tuzu hazırlanarak pH'ı ölçüldü. pH değerinin 5.1 olduğu görüldü. Biyolojik sistemlerde arzu edilen 7.4 pH değerli ortam elde edebilmek için hazırlanan kütlece %20'lik NaOH çözeltisi ortama damla damla ilave edilerek ortam ile pH metrenin dengeye ulaşma süreci beklendi ve pH değeri aralıklarla okundu. pH metre 7.4 pH değerini gösterdiğinde NaOH eklemesi durduruldu ve balon jöjeye 1 mL'ye kadar saf su ilave edilerek toplam hacim 1 L'ye tamamlandı. Böylece 0.1 M, 7.4 pH değerli HEPES Tampon çözeltisi hazırlandı ve buzdolabında saklanarak çalışmalarda kullanıldı.

2) Stok çözeltiler:

Prob 1: Agregasyon ve satürasyondan kaçınmak için düşük konsantrasyonlu (10^{-6} M) çözeltiler hazırlamak gereklidir. Bu sebeple önce Prob 1'in Sigma-Aldrich firmasından elde edilen susuz DMSO içerisinde 1×10^{-3} M'lik stok çözeltisi hazırlandı. Ardından istenilen çalışma konsantrasyonu olan 3.33×10^{-6} M'a seyreltilti.

Analit (Biotiyol): DMSO gibi organik çözücülerde çözünmeyen Sistein (Cys), Homosistein (Hcy) ve Glutatyon (GSH) biyotiyollerin sulu çözeltileri 0.1 M ve 7.4 pH değerli HEPES Tampon çözütüsü içerisinde hazırlandı. Tüm analit çözeltilerinin konsantrasyonu 1×10^{-3} M olarak ayarlandı.

3) NMR titrasyon ölçümleri: NMR spektrumları d_6 -DMSO ve D_2O içerisinde alındı. 2 mg Prob 1, 0.6 mL d_6 -DMSO içerisinde çözülerek NMR spektrumu kaydedildi. Biotiyoller de 2 mg tartılarak 0.6 mL D_2O içerisinde çözüldü. NMR ölçümlerinde uygun eşdeğerlikte biyotiyol çözeltileri Prob 1 içerisine eklendi ve NMR tüpleri içerisinde ölçümler alındı.

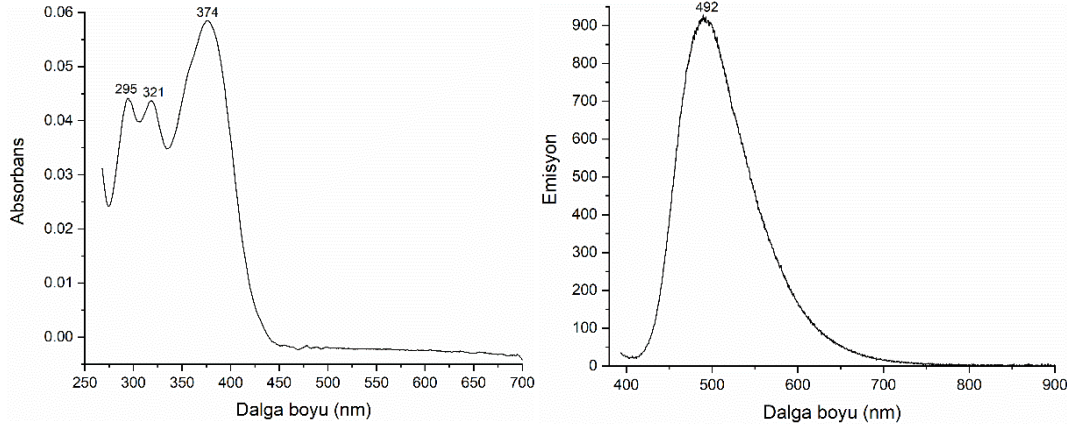
4) Absorpsiyon ve emisyon titrasyon ölçümleri: DMSO içerisinde hazırlanmış yüksek derişimli (1×10^{-3} M) Prob 1 çözeltisinden her defasında 10^7 ar mikrolitre alındı. Ardından 0.1 M, 7.4 pH değerli HEPES Tampon

çözeltisi içerisinde hazırlanan analit çözeltisinden eşdeğerliğe uygun (örneğin 1:5 stokiometri için 50 mikrolitre) hacim miktarı alınarak, Prob 1'in üzerine eklendi. Prob 1+analitin seçilen çalışma konsantrasyonuna (3.33×10^{-6} M) ulaşması için 1:9 oranındaki DMSO:HEPES tampon çözeltisi ile seyreltme yapıldı. Reaksiyon oluşum süresi kadar beklendikten sonra absorpsiyon ve emisyon spektrumları ölçüldü.

III. ARAŞTIRMA VE BULGULAR

A. Prob 1'in Absorpsiyon ve Emisyon Ölçüm Çalışmaları

Öncelikle Prob 1'in 1:9 DMSO:HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içinde absorpsiyon ve emisyon spektrumları alındı. Soğurma spektrumuna bakıldığında Prob 1'in $\pi-\pi^*$, $n-\pi^*$ ve molekül içi yük aktarım geçişlerine (ICT) ait soğurma bantları verdiği görüldü. ICT bandından ($\lambda_{uyarma}=374$ nm) uyarıldığında ise 492 nm'de emisyon verdi. Elde edilen bu UV ve PL spektrumlarının (Şekil 1), Prob 1'in DCM ve farklı çözücüler içerisindeki absorpsiyon ve emisyon spektrumlarına benzerlik gösterdiği de görüldü [19].



Şekil 1. Prob 1'in absorpsiyon ve emisyon spektrumları

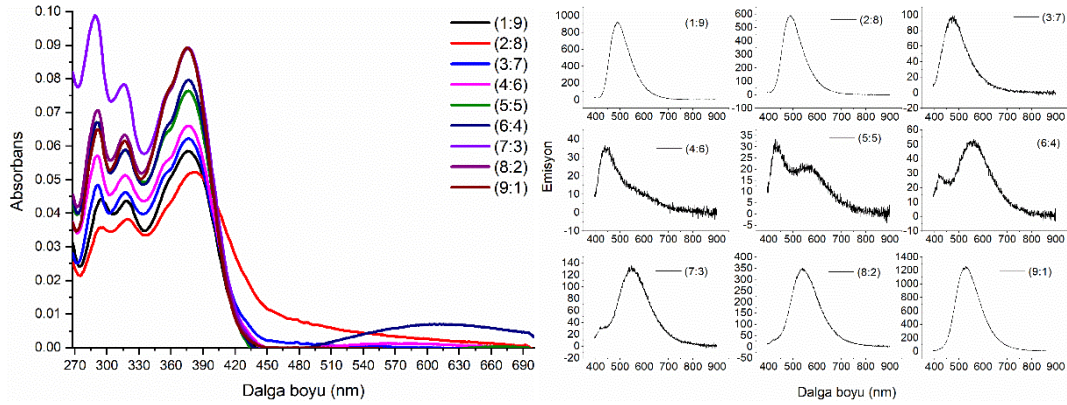
B. DMSO:HEPES Tampon Çözelti Oranının Belirlenmesi

Çalışmada takip edilecek en uygun DMSO:HEPES oranının belirlenmesi için bir takım (1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 ve 9:1) oran belirleme çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda elde edilen absorpsiyon ve emisyon spektrumları Şekil 2'de görülmektedir. Tablo 1'de ise elde edilen değerler özetlenmiştir.

Tablo 1. Farklı oranlı DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltileri içerisindeki Prob 1'in absorpsiyon ve emisyon değerleri

Prob 1	DMSO:HEPES Oranları								
	(1:9)	(2:8)	(3:7)	(4:6)	(5:5)	(6:4)	(7:3)	(8:2)	(9:1)
Absorpsiyon bandının maksimum değerleri (nm)	295,	295,	291,	291,	291,	291,	289,	291,	292,
	318,	319,	318,	317,	317,	317,	316,	317,	317,
	374	380	374	375	375	375	375	375	374
Emisyon bandının maksimum değerleri (nm)	492	489	475	445	432, 560	422, 560	550	540	529

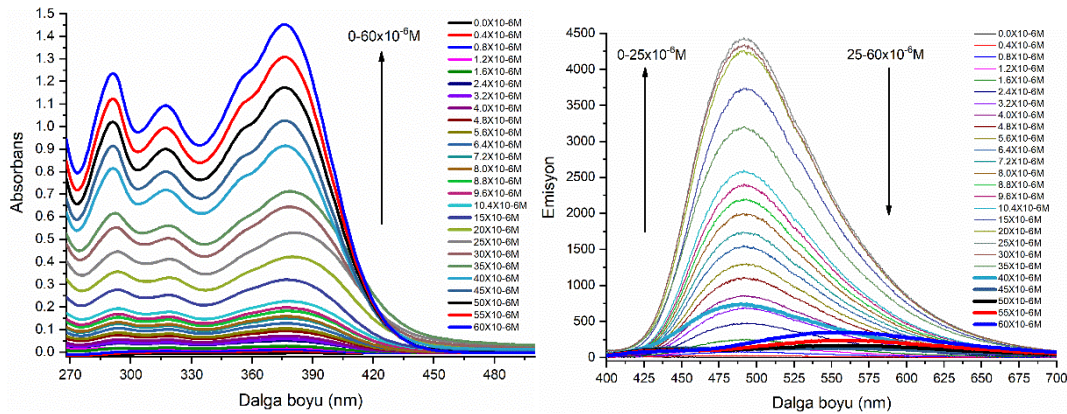
Nasıl ki analitlerin çözünmesi için suya ihtiyaç varsa organik moleküllerinde çözünebilmeleri için DMSO gibi organik çözücüye ihtiyaç vardır. Ancak biyolojik sistemlerde su oranının olabildiğince yüksek, organik çözücü oranının olabildiğince düşük tutulması gerekmektedir. Bu sebeple DMSO:HEPES oranı 1:9 olarak seçildi. 1:9 oranının tercih edilme sebepleri olarak emisyon şiddetinin büyüklüğü ve spektrumun kirlilik içermemesi sayılabilir.



Şekil 2. Farklı oranlı DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltileri içerisindeki Prob 1'in absorpsiyon ve emisyon spektrumları

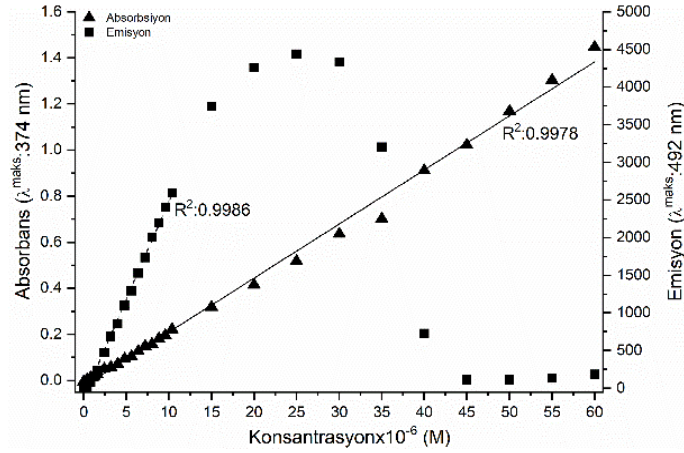
C. Prob 1'in Kalibrasyon Çalışmaları

DMSO:HEPES oranının 1:9 olarak seçilmesinden sonra agregasyondan ve satürasyondan kaçınmak için konsantrasyon aralığının belirlenmesi şarttır. Bu amaç için 0.4×10^{-6} M artışlarla $0-60 \times 10^{-6}$ M aralığında çalışmalar yürütüldü. Bu konsantrasyon değerleri için elde edilen absorpsiyon ve emisyon spektrumları Şekil 3'de görülmektedir.



Şekil 3. $0-60 \times 10^{-6}$ M konsantrasyonlu hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in absorpsiyon ve emisyon spektrumları

Çalışma konsantrasyonuna karar verebilmek için maksimum absorpsiyon ve emisyon değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak değişimi incelendi (Şekil 4).



Şekil 4. Hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in absorpsiyon ve emisyon değerlerinin konsantrasyona bağlı değişimi

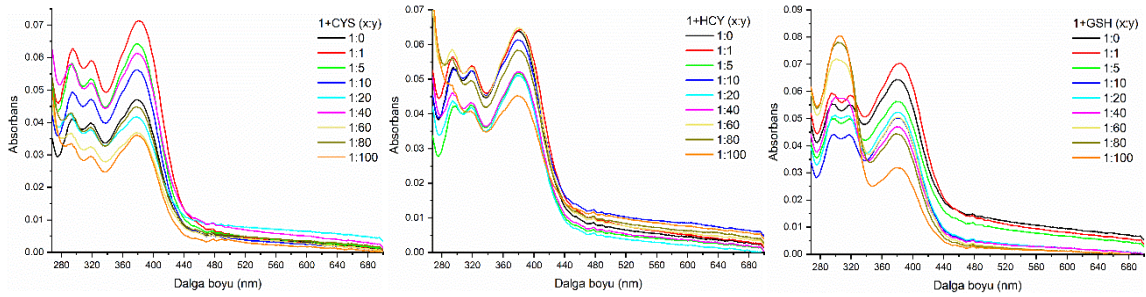
Prob 1'e ait kalibrasyon eğrisine bakıldığında, çok yüksek konsantrasyonlarda (25×10^{-6} M - 60×10^{-6} M arası) meydana gelen agregasyon sebebiyle emisyon değerinin azaldığı gözlemlendi. Ayrıca yüksek PLQY değerli (97.4%) Prob 1'in absorpsiyonunun artmasına bağlı saturasyon da görülmüştür. $0-25 \times 10^{-6}$ M arası nispeten daha düşük konsantrasyonlarda ise emisyon şiddeti lineer bir biçimde artmıştır. Analitlerin, Prob 1'in emisyonunu azaltabileceği ihtimaline karşı 3.33×10^{-6} M değeri bu çalışma için uygun konsantrasyon değeri olarak kabul edildi. Kalibrasyon eğrilerinin analiz değerleri Tablo 2'de özetlendi.

Tablo 2. Prob 1'in kalibrasyon eğrilerinin lineer regresyon analiz değerleri

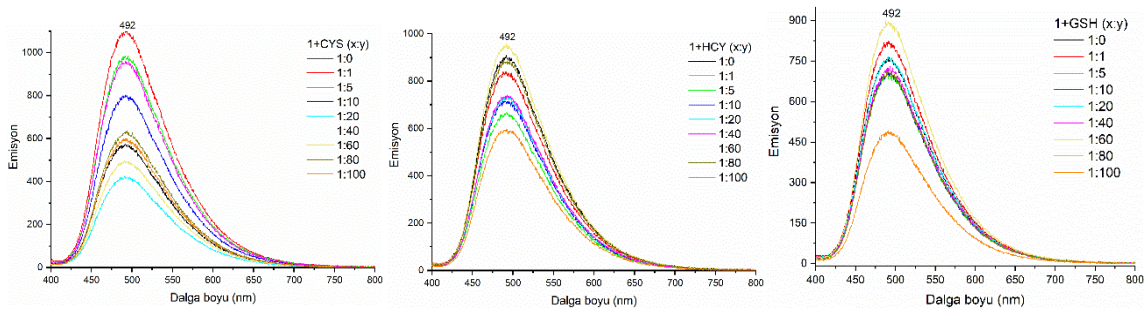
	Absorpsiyon	Emisyon
Lineer Regresyon Eşitliği	$y = a + b \cdot x$	$y = a + b \cdot x$
Artık kareler toplamı	6.67403×10^{-5}	1.34941×10^{-8}
Pearson Korelasyon Katsayısı (R^2)	0.99366	0.99242
Düzeltilmiş R^2	0.98526	0.98239
y-kesim Noktası (a)	-0.00336	-7495.44074
y-kesim Noktasının Standart Hatası	0.00193	2749.99551
Eğim (b^*)	0.01953	25368.84699
Eğimin Standart Hatası	9.01728×10^{-4}	1282.19202

D. Absorpsiyon ve Emisyon Titrasyon Çalışmaları

Şekil 5 ve Şekil 6'ya bakıldığında absorpsiyon ve emisyon spektrumlarında tutarsız değişimler olduğu görüldü. Bu değişimlerin biyotiyollerden, tampon çözeltisinden ya da sudan kaynaklı mı olduğu düşünüldü. Bunun nedenini bulmak için sadece su, farklı tampon çeşitleri (sodyum borat ve PBS) ve farklı pH değerleriyle de denemeler yapıldı fakat net bir sonuç elde edilemedi. Bu değişimlerin giderilmesi ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir. Benzer problemler 2-(N-hekzil-karbazol-3-il)-4-formilpiridin molekülü floresans prob (Prob 2) olarak biyotiyollerin tespitinde kullanıldığında da gözlenmişti [20]. Prob 1 ile Prob 2 birbirinin yapı izomerleri olup piridin halkasındaki formil grubunun pozisyonu farklılık göstermektedir.



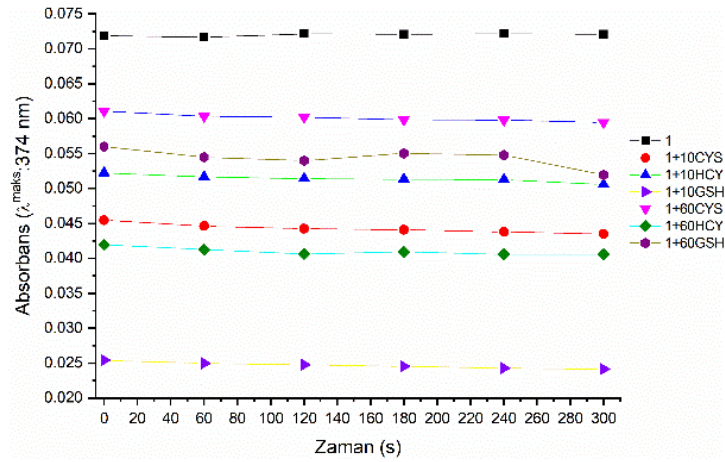
Şekil 5. Hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in üç farklı analit ile titrasyonundaki absorpsiyon spektrumları



Şekil 6. Hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in üç farklı analit ile titrasyonundaki emisyon spektrumları

E. Prob 1'in Kinetik Mekanizma Çalışmaları

1) Absorpsiyon spektrumunun değişimi:



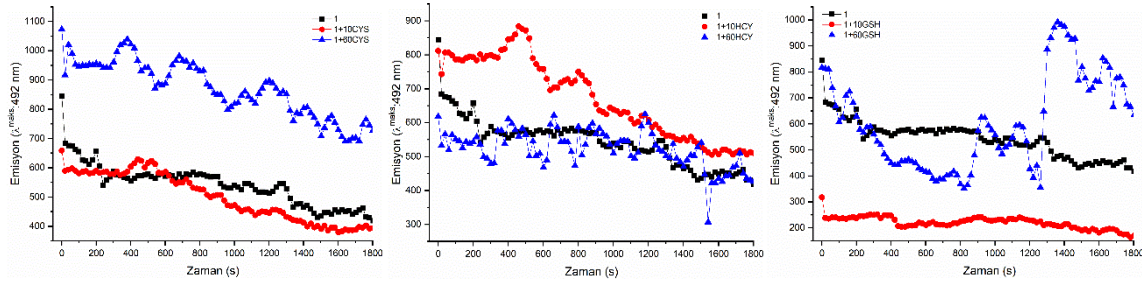
Şekil 7. Hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in absorpsiyon bandının üç farklı analit ile değişik titrasyon değerlerindeki zamana bağlı değişimi

Prob 1'in maksimum ICT absorpsiyon bandının zamana ve çözelti içerisine eklenen analite bağlı olarak değişimi incelendi. Şekil 7'den de görüldüğü gibi Prob 1'in absorpsiyonunun zamanla değişmediği sabit kaldığı görülmektedir. Prob 1'e 10 eşdeğer Cys eklendiğinde absorpsiyonda önce büyük bir azalma görülüp, 60 eşdeğer eklendiğinde ise tekrardan bir artış görüldü. Diğer taraftan Prob 1'e sırasıyla 10 ve 60 eşdeğer Hcy eklendiğinde kademeli olarak bir azalma görüldü. GSH analitinin eklenmesiyle ise önce büyük bir azalma ardından Cys de olduğu gibi tekrar bir artış görüldü. Bu değerler Tablo 3'te özetlendi.

Tablo 3. Prob 1'in üç farklı analit ile değişik titrasyon değerlerindeki absorpsiyon ve emisyon değerlerinin zamana bağlı değişimi

	Absorpsiyon ($\lambda^{\text{maks}}:374 \text{ nm}$)		Emisyon ($\lambda^{\text{maks}}:492 \text{ nm}$)		
	0 s	300 s	0 s	300 s	1800 s
Analit yok	0.072	0.072	844.4	587.7	418.6
10Cys	0.045	0.044	658.5	578.7	393.1
10Hcy	0.052	0.051	811.2	799.6	509.8
10GSH	0.025	0.024	317.4	249.5	170.1
60Cys	0.061	0.059	1073.6	961.1	727.9
60Hcy	0.042	0.041	617.5	478.9	425.5
60GSH	0.056	0.052	816.2	249.5	633.0

2) Emisyon spektrumunun değişimi:



Şekil 8. Hacimce 1:9 DMSO-HEPES (0.1 M, pH:7.4) tampon çözeltisi içerisindeki Prob 1'in 492 nm'deki emisyon bandının üç farklı analit ile değişik titrasyon değerlerindeki zamana bağlı değişimi

Prob 1'in maksimum emisyon bandının zamana ve çözelti içerisine eklenen analite bağlı olarak değişimi incelendi. Şekil 8'den görüldüğü gibi Prob 1'in 492 nm'deki emisyon şiddetinin zamanla azaldığı görülmektedir. Bu azalmanın nedenini bulmaya yönelik çalışmalar (farklı çözücü, farklı tampon çözelti ve farklı pH değeri) yapılmasına rağmen tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun üzerine çalışmalarımız devam etmektedir. Diğer taraftan Prob 1'e 10 eşdeğer Cys eklenmesiyle 492 nm'deki emisyon şiddetinde bir değişim söz konusu olmazken, 60 eşdeğer Cys eklendiğinde arttığı görüldü. Bu da Prob 1'in Cys ile reaksiyon verdiğini göstermektedir. Ancak 10 eşdeğer Hcy eklendiğinde 492 nm'deki emisyon şiddetinde bir artış görülürken, 60 eşdeğer eklendiğinde ise azalış görüldü. Diğer taraftan 10 eşdeğer GSH eklendiğinde önce 492 nm'deki emisyon şiddetinde azalış, 60 eşdeğer eklendiğinde ise artış görüldü. Bu değerler de Tablo 3'te özetlendi.

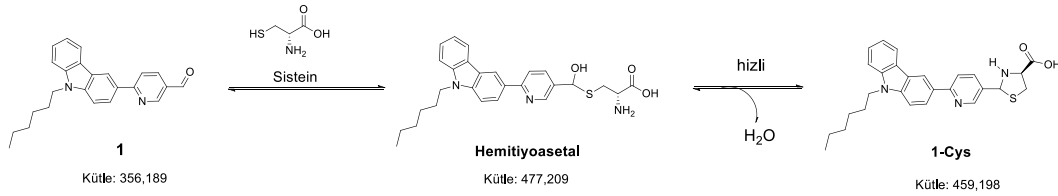
Yine emisyon kinetiğine bakıldığında ise herhangi bir biyotiyol katılmadığında emisyon şiddetinin zamanla değişmediği izlenmiştir. Cys eklendiğinde ise 10 ve 60 eşdeğerlilik durumunun her birinde emisyon şiddeti azalmıştır ki bu durum Prob 1'in Cys ile etkileştiği anlamına gelmektedir. Hcy eklendiğinde ise önce azalış sonrasında ise bir miktar artış olması Prob 1'in Hcy ile etkileştiğini ama bu etkileşiminin Cys'ye göre daha yavaş olduğunu göstermiştir. Ancak farklı eşdeğerliliklerdeki GSH ile emisyon şiddetinin değişim göstermemesi Prob 1'in GSH ile reaksiyona girmediğini gösterir.

F. Prob 1'in Biyotiyollerle Oluşturduğu Yapının Reaksiyon Mekanizması

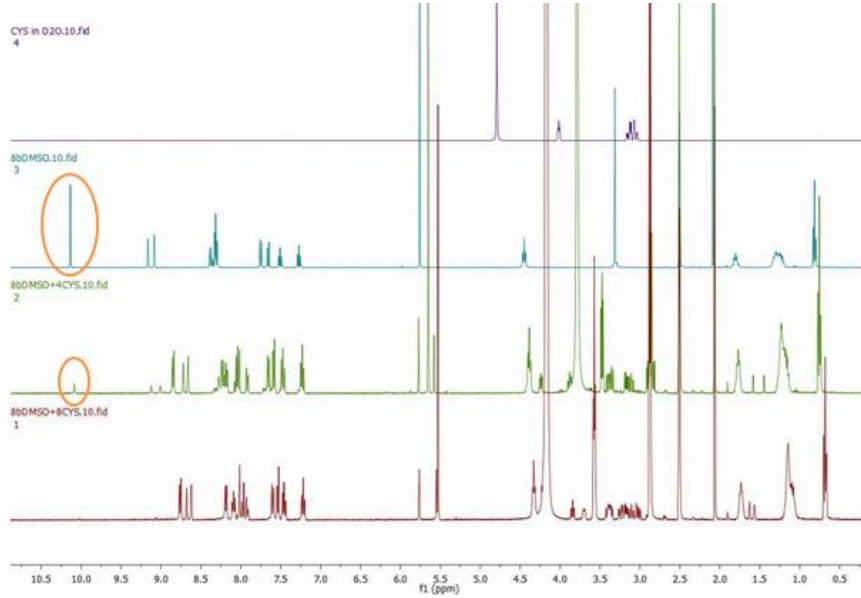
Aldehitler biyotiyoller ile önce nükleofilik katılma reaksiyonu ardından da molekül içi halkalaşma reaksiyonu verirler. Örneğin aldehitler sistein ve homosistein ile reaksiyona girdiğinde önce kinetik ürün olan hemitiyoasetaller oluşur zamanla bu hemitiyoasetaller halkalaşarak termodinamik ürün olan beş halkalı 1,3-tiyazolidinleri ve altı halkalı 1,3-tiyazinanları oluşturur [21]. GSH ile reaksiyona girdiklerinde ise 10 halkalı 7-oxo-1,3,8-thiadiazecane oluştururlar [22]. Reaksiyon sonucu bu ürünlerin oluşumu genellikle ^1H NMR ve MS spektrometreleri kullanılarak belirlenebilir.

İlk olarak Prob 1 Cys ile reaksiyona girdiğinde beş halkalı 1,3-tiyazolidin halkasına sahip 1-Cys oluşması beklendi (Şekil 9). Bu ürünün oluşumu ^1H NMR ve MS spektrometreleri kullanılarak incelendi. Prob 1'in ^1H NMR spektrumu incelendiğinde 10.13 ppm'de karakteristik aldehit piki görülmektedir (Şekil 10). Prob 1 dört

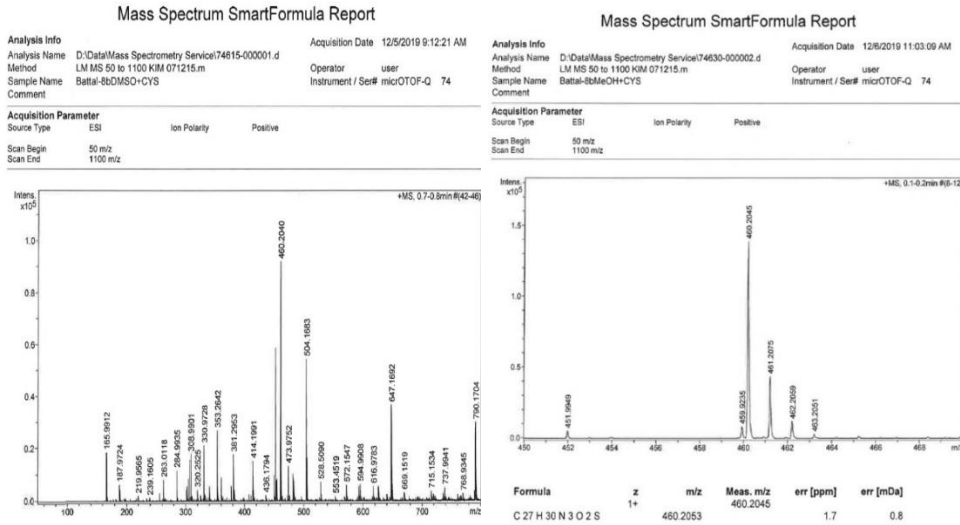
eşdeğerlilikte Cys ile reaksiyona girdiğinde karakteristik aldehit pikinin azaldığı ve 1,3-tiyazolidin halkasına ait yeni piklerin ortaya çıktığı görüldü. Sekiz eşdeğerlilikte Cys ile reaksiyona girdiğinde ise karakteristik aldehit piki kaybolup, Prob 1'in tamamen ürüne dönüştüğü görüldü. ESI-MS spektrumunda ise moleküler iyon piki 460.20'de görüldü (Şekil 11a). Bu iyonun HRMS ile analizinden elde edilen molekül formülü ile 1-Cys'nin molekül formülünün birbiriyle 1.7 ppm hata payı ile uyumlu olduğu görüldü (Şekil 11b).



Şekil 9. 1-Cys'nin mekanizması

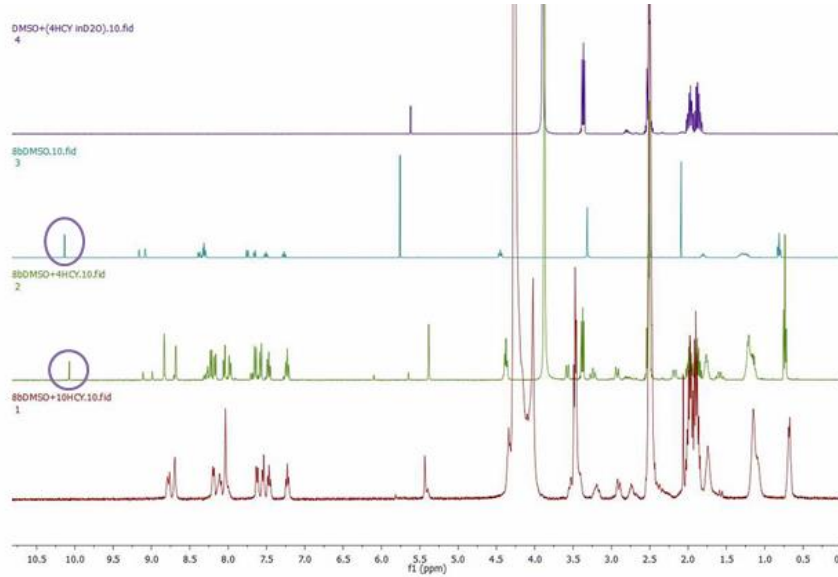
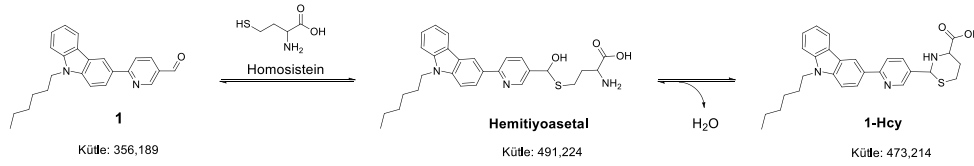


Şekil 10. Yukarıdan aşağıya sırayla Cys, Prob 1, Prob 1+ 4 eşdeğer Cys ve Prob 1+8 eşdeğer Cys'nin ¹H NMR spektrumları

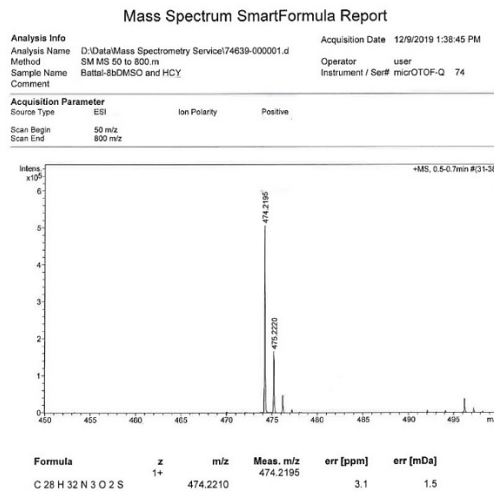


Şekil 11. Prob 1-Cys'nin MS (a) ve HRMS (b) Spektrumları

Ardından Prob 1 Hcy ile reaksiyona girdiğinde altı halkalı 1,3-tiyazinan halkasına sahip 1-Hcy oluşması beklendi (Şekil 12). Bu ürünün oluşumu da ¹H NMR ve MS spektrometreleri kullanılarak incelendi. Prob 1 dört eşdeğer Hcy ile reaksiyona girdiğinde yine karakteristik aldehit pikinin azaldığı ve altı halkalı 1,3-tiyazinan halkasına ait yeni piklerin ortaya çıktığı görüldü (Şekil 13). Sisteinden farklı olarak Prob 1 on eşdeğer Hcy ile reaksiyona girdiğinde karakteristik aldehit piki tamamen kaybolup ürüne dönüştüğünü görüldü. ESI-MS spektrumunda ise moleküler iyon piki 474.21' de görüldü (Şekil 14). Bu iyonun HRMS ile analizinden elde edilen molekül formülü ile 1-Hcy'nin molekül formülünün birbiriyile 3.1 ppm hata payı ile uyumlu olduğu görüldü (Şekil 14).

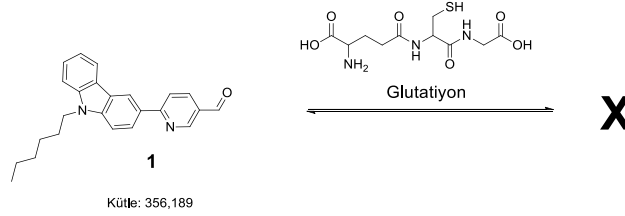


Şekil 13. Yukarıdan aşağıya sırayla Hcy, Prob 1, Prob 1+ 4 eşdeğer Hcy ve Prob 1+10 eşdeğer Hcy'nin ¹H NMR spektrumları

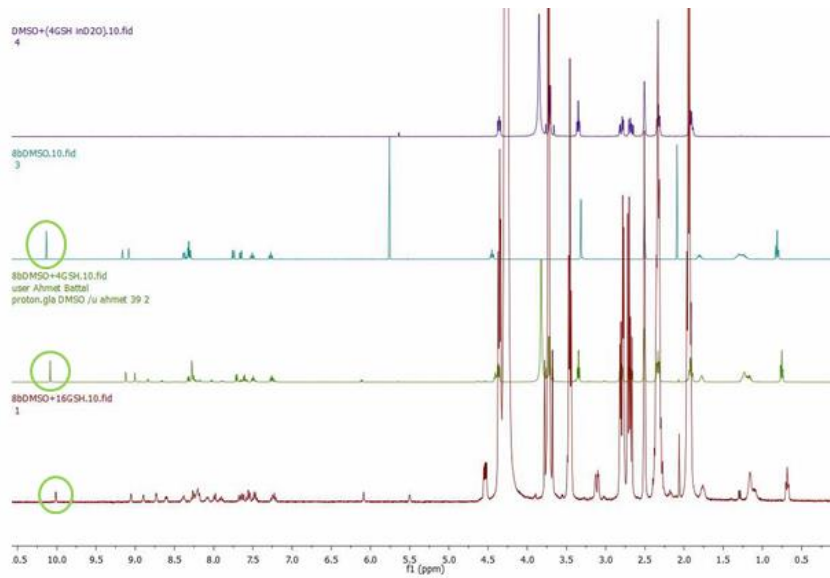


Şekil 14. Prob 1-Hcy'nin MS ve HRMS Spektrumları

Son olarak Prob 1'in GSH ile reaksiyonu incelendi (Şekil 15). Fakat Prob 1 onaltı eşdeğer GSH ile bile reaksiyona sokulduğunda karakteristik aldehit piki kaybolmadı (Şekil 16). Bu da Prob 1'in GSH ile reaksiyon vermediğini gösterdi. Ayrıca ESI-MS analizinde 1-GSH yapısının oluşmadığı da izlendi (Şekil 17).



Şekil 15. Prob 1'in GSH ile reaksiyonu

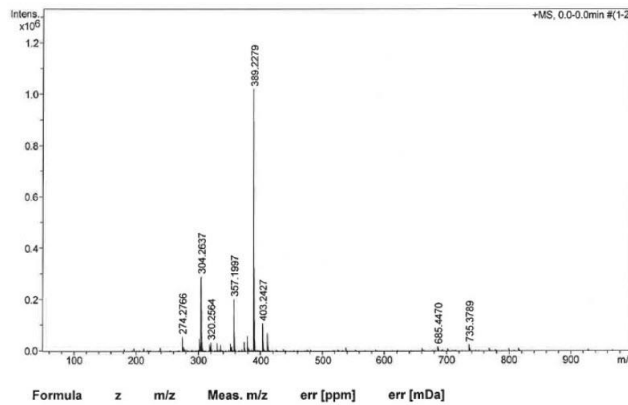


Şekil 16. Yukarıdan aşağıya sırayla GSH, Prob 1, Prob 1+ 4 eşdeğer GSH ve Prob 1+16 eşdeğer GSH'in ¹H NMR spektrumları

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info
Analysis Name D:\Data\Mass Spectrometry Service\74741-000001.d
Method LM MS 50 to 1100 KIM 071215.m
Sample Name Battal-8bMeOH+GSHmore...
Comment
Acquisition Date 12/16/2019 11:06:14 AM
Operator user
Instrument / Ser# micrOTOF-Q 74

Acquisition Parameter
Source Type ESI Ion Polarity Positive
Scan Begin 50 m/z
Scan End 1100 m/z



Şekil 17. Prob 1-GSH'in MS Spektrumu

IV. SONUÇLAR

Bu çalışmada 2-(karbazol-3'-il)-5-formilpiridin molekülünün floresans sensör özelliği incelenmiştir. PL sonuçları bu molekülün sisteine karşı seçici olduğu göstermekle birlikte, absorpsiyon ve emisyon spektrumundaki beklenmeyen sonuçların açığa kavuşturulması için birtakım ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Ancak bu çalışma biyotiyol sensör alanına katkı sağlaması açısından dikkate değerdir. NMR sonuçlarına göre; Prob 2 CYS ile 3 eşdeğerlilikte, Prob 1 ise 8 eşdeğerlilikte reaksiyon vermiştir. Prob 1 ve Prob 2, ancak 10 eşdeğerlilikte HCY ile reaksiyona girmektedir. Diğer taraftan Prob 1 ve Prob 2, 16 eşdeğerlilikte bile GSH ile reaksiyon vermemiştir.

TEŞEKKÜR

A.B. ve N.A. değerli katkı, teşvik ve yardımlarından dolayı Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Mustafa Tavaslı'ya çok teşekkür eder. A.B., 2219 kodlu Yurtdışı Doktora Sonrası Araştırma Burs (Burs Numarası:1059B191800354) kapsamında destek veren TÜBİTAK'a teşekkür eder. Ayrıca A.B. laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullanıma açık yardımcı olan Glasgow Üniversitesi'nden Prof. Dr. Peter Skabara'ya ve Duetta Spektrometresiyle ölçüm imkânı tanıyan Dr. William Peveler'e minnettardır. Yine A.B., tüm değerli fikir ve yardımları için Glasgow Üniversitesi'nden Dr. Oleksandr'a, Dr. Holly A. Yu'a ve Hao Yang'a teşekkür eder.

KAYNAKLAR

- [1] Ding, S., Liu, M., & Hong, Y. (2018). Biothiol-specific fluorescent probes with aggregation-induced emission characteristics. *Science China Chemistry*, 61(8), 882-891.
- [2] Peng, H., Chen, W., Cheng, Y., Hakuna, L., Strongin, R., & Wang, B. (2012). Thiol Reactive Probes and Chemosensors. *Sensors*, 12(11), 15907-15946.
- [3] Huo, F., Kang, J., Yin, C., Zhang, Y., & Chao, J. (2015). A turn-on green fluorescent thiol probe based on the 1,2-addition reaction and its application for bioimaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 139-143.
- [4] Lin, W., Yuan, L., Cao, Z., Feng, Y., & Long, L. (2009). A Sensitive and Selective Fluorescent Thiol Probe in Water Based on the Conjugate 1,4-Addition of Thiols to α,β -Unsaturated Ketones. *Chemistry – A European Journal*, 15(20), 5096-5103.
- [5] Ang, C. Y., Tan, S. Y., Lu, Y., Bai, L., Li, M., Li, P., . . . & Zhao, Y. (2014). "Turn-on" fluorescence probe integrated polymer nanoparticles for sensing biological thiol molecules. *Scientific Reports*, 4(1), 7057.
- [6] Liu, Y., Li, M., Wong, K. M.-C., Tong, Y., Yang, H., & Kong, J. (2019). A New Quinone Based Fluorescent Probe for High Sensitive and Selective Detection of Biothiols and Its Application in Living Cell Imaging. *International Journal of Analytical Chemistry*, 7536431.
- [7] Zhao, H., Chen, M., & Ma, C. (2019). Fluorescent Method for the Detection of Biothiols Using an Ag⁺-Mediated Conformational Switch. *Sensors*, 19(4), 934.
- [8] Wang, L., Zhuo, S., Tang, H., & Cao, D. (2018). An efficient fluorescent probe for rapid sensing of different concentration ranges of cysteine with two-stage ratiometric signals. *Dyes and Pigments*, 157, 284-289.
- [9] Miao, Q., Li, Q., Yuan, Q., Li, L., Hai, Z., Liu, S., & Liang, G. (2015). Discriminative Fluorescence Sensing of Biothiols in Vitro and in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 87(6), 3460-3466.
- [10] Chen, C., Zhou, L., Huang, X., & Liu, W. (2017). Rapid detection of intracellular Cys over Hcy and GSH using a novel two-photon coumarinocoumarin-based colorimetric and fluorescent probe. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(29), 5892-5897.
- [11] Niu, L. Y., Guan, Y. S., Chen, Y.-Z., Wu, L. Z., Tung, C. H., & Yang, Q. Z. (2012). BODIPY-Based Ratiometric Fluorescent Sensor for Highly Selective Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine. *Journal of the American Chemical Society*, 134(46), 18928-18931.
- [12] Guo, F., Tian, M., Miao, F., Zhang, W., Song, G., Liu, Y., . . . & Wong, W. Y. (2013). Lighting up cysteine and homocysteine in sequence based on the kinetic difference of the cyclization/addition reaction. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(44), 7721-7728.
- [13] Kaur, M., Yoon, B., Kumar, R., Cho, M. J., Kim, H. J., Kim, J. S., & Choi, D. H. (2014). A Carbazole Based Bimodal "Turn-On" Fluorescent Probe for Biothiols (Cysteine/Homocysteine) and Fluoride: Sensing, Imaging and its Applications. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(12), 3437-3442.
- [14] Gong, P., Sun, J., Xue, P., Qian, C., Zhang, Z., Sun, J., & Lu, R. (2015). Luminescent nanofibers fabricated from triphenylvinyl substituted carbazole derivatives via organogelation for sensing gaseous nitroaromatics. *Dyes and Pigments*, 118, 27-36.

- [15] Pang, L., Zhou, Y., Wang, E., Yu, F., Zhou, H., & Gao, W. (2016). A “turn-on” fluorescent probe used for the specific recognition of intracellular GSH and its application in bioimaging. *RSC Advances*, 6(20), 16467-16473.
- [16] Chen, P. Z., Zhang, H., Niu, L. Y., Zhang, Y., Chen, Y. Z., Fu, H. B., & Yang, Q. Z. (2017). A Solid-State Fluorescent Material Based on Carbazole-Containing Difluoroboron β -Diketonate: Multiple Chromisms, the Self-Assembly Behavior, and Optical Waveguides. *Advanced Functional Materials*, 27(25), 1700332.
- [17] Song, H., Zhang, J., Wang, X., Zhou, Y., Xu, C., Pang, X., & Peng, X. (2018). A novel “turn-on” fluorescent probe with a large stokes shift for homocysteine and cysteine: Performance in living cells and zebrafish. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 259, 233-240.
- [18] Wang, X. D., Fan, L., Ge, J. Y., Li, F., Zhang, C. H., Wang, J.J., . . . & Dong, C. (2019). A lysosome-targetable fluorescent probe for real-time imaging cysteine under oxidative stress in living cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 221, 117175.
- [19] Altinolcek, N., Battal, A., Tavasli, M., Peveler, W. J., Yu, H. A., & Skabara, P. J. (2020). Synthesis of novel multifunctional carbazole-based molecules and their thermal, electrochemical and optical properties. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 16, 1066-1074.
- [20] Altinolcek, N., & Battal, A. (2021). The Investigation of Fluorescence Biothiol Sensor Properties of 2-(N-hexyl-carbazole-3'-yl)-4- formylpyridine. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(3), 2184-2194.
- [21] Kamps, J. J. A. G., Hopkinson, R. J., Schofield, C. J., & Claridge, T. D. W. (2019). How formaldehyde reacts with amino acids. *Communications Chemistry*, 2(1), 126.
- [22] Hopkinson, R. J., Barlow, P. S., Schofield, C. J., & Claridge, T. D. W. (2010). Studies on the reaction of glutathione and formaldehyde using NMR. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(21), 4915-4920.