

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**HPLC İLE PROTEİNLERİN AYRILMASINDA DEDEKSİYON AMAÇLI YENİ
ON-LİNE YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE GIDA VE İLAÇ ANALİZİNDE
UYGULANMASI**

DOKTORA TEZİ

Ozan Emre EYUPOĞLU

**EKİM 2017
TRABZON**



**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**HPLC İLE PROTEİNLERİN AYRILMASINDA DEDEKSİYON AMAÇLI YENİ ON-LİNE
YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE GIDA VE İLAÇ ANALİZİNDE UYGULANMASI**

Ozan Emre EYUPOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12 / 09 / 17

Tezin Savunma Tarihi : 02 / 10 / 17

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Kimya Anabilim Dalında
Ozan Emre EYUPOĞLU Tarafından Hazırlanan**

**HPLC İLE PROTEİNLERİN AYRILMASINDA DEDEKSİYON AMAÇLI YENİ
ON-LİNE YÖNTEMİN GELİŞTİRİLMESİ VE GIDA VE İLAÇ ANALİZİNDE
UYGULANMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 12 /09/17 gün ve 1718 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.**

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI

Üye : Prof. Dr. Suat EKİN

Üye : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Üye : Doç. Dr. Tevfik ÖZEN

Üye : Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA



**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü**

ÖNSÖZ

Doktora tezimi hazırlarken, başından sonuna kadar bana destek veren, yardımcı olan, sonsuz bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Murat KÜÇÜK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Malzeme desteğinden dolayı Prof. Dr. Ahmet ALVER'e ayrıca teşekkür ederim. Beni destekleyen Anne ve Babama ve her zaman her konuda yanımda olan Sevgili Eşim Merve EYUPOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim. Bunun yanında BAL (Biyoaktivite laboratuvarı) çalışma grup arkadaşlarıma (özellikle Semra Alkan Türkuçar ve Uğur Kardil'e) yardımlarından ötürü teşekkür ederim. Manevi desteklerinden ötürü kardeşlerim Kerem ve Furkan EYUPOĞLU'na da minnettarım. 2211-C Öncelikli alanlara yönelik yurt içi doktora burs programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim insanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine ayrıca teşekkür ederim.

Ozan Emre EYUPOĞLU
Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘HPLC ile Proteinlerin Ayrılmasında Deteksiyon Amaçlı Yeni On-line Yöntemin Geliştirilmesi ve Gıda ve İlaç Analizinde Uygulanması’’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK ‘ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarında yaptığımı başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.

02 / 10 / 2017

Ozan Emre EYUPOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XX
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Protein Tayin Yöntemleri.....	4
2.1.1. Kjeldahl Yöntemi.....	5
2.1.2. Boya Bağlama Yöntemi.....	5
2.1.3. Gravimetrik Yöntemler.....	6
2.1.4. Spektrofotometrik Yöntemler.....	6
2.2. HPLC Sistemi ve Kromatografik Protein Ayırımı.....	14
2.2.1. Ters Faz (Reverse Phase (RP)) HPLC Kromatografisi ile Protein Ayırımı.....	15
2.2.2. Boyut Dışarılama (Size Exclusion (SEC)) HPLC Kromatografisi ile Protein Ayırımı.....	16
2.2.3. İyon Değişirme (Ion Exchange (IEC)) ve Hidrofobik Etkileşim (HIC) HPLC Kromatografileri ile Protein Ayırımı.....	17
2.3. HPLC Dedektör Çeşitleri ve Protein Dedeksiyonu.....	18
2.4. Akış Enjeksiyon Sistemi.....	21
2.5. On-line HPLC Sistemleri.....	21
2.6. On-line Teknikler ve LC-MS Uygulamaları.....	23
2.7. On-line HPLC Protein Sisteminin Avantajları ve Dezavantajları.....	24
2.8. Protein Bileşiminin Amino Asit İçeriğinin Dedeksiyona Etkisi.....	25
3. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	26

3.1.	Malzeme ve Yöntem.....	27
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar.....	28
3.1.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	29
3.2.	Hareketli Faz Çözücülerinin Hazırlanması ve Elüsyon Programı.....	30
3.3.	On-line HPLC'ye Adaptasyon Öncesi Spektrofotometrik Denemeler.....	31
3.4.	Spektrofotometrik Denemelerin HPLC'ye Uyarlanması ve Optimizasyonu	31
3.4.1.	On-line HPLC-Ninhidrin.....	31
3.4.2.	On-line HPLC-Biüret.....	32
3.4.3.	On-line HPLC-Bradford.....	33
3.4.3.1.	Akış Hızı Optimizasyonu.....	34
3.4.3.2.	Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	34
3.4.3.3.	Reaksiyon Sarmalında Gerçekleşen Reaksiyonun Sıcaklık Optimizasyonu	34
3.4.3.4.	Tübing Boyu Optimizasyonu.....	34
3.5.	Geliştirilen On-line HPLC-Protein Yönteminin Gıda ve İlaç Numunelerine Uygulanarak Kalitatif ve Kantitatif Analizi.....	34
3.6.	Seçilen Dalga Boyunun ve Kolonun Dedeksiyona Etkisi.....	35
3.7.	Tespit (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı.....	36
4.	BULGULAR VE SONUÇLAR.....	37
4.1.	Spektrofotometrik Protein Tayinlerinin Süre ve Sıcaklık Parametreleri Açısından İncelenmesi.....	37
4.2.	Spektrofotometrik Biüret Yönteminin HPLC'ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini.....	40
4.3.	Spektrofotometrik Ninhidrin Yönteminin HPLC'ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini.....	41
4.4.	Spektrofotometrik Bradford Yönteminin HPLC'ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini.....	42
4.5.	On-line HPLC-Bradford Yönteminin Optimizasyonu.....	44
4.5.1.	Reaktif Akış Hızı Optimizasyonu.....	44
4.5.2.	Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu.....	44
4.5.3.	Reaksiyon Sarmalında Gerçekleşen Reaksiyonun Sıcaklık Optimizasyonu..	45
4.5.4.	Tübing Boyu Optimizasyonu.....	46
4.6.	Geliştirilen HPLC-Bradford Yönteminin Tespit (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırının Belirlenmesi.....	51

4.7.	On-line HPLC-Bradford Yöntemiyle Farklı Gıda ve İlaç Numunelerinde Kalitatif ve Kantitatif Protein Analizi.....	53
4.8.	Geliştirilen On-line HPLC-Bradford Yönteminin 280 nm ve 595 nm'de Spektrofotometrik Ölçüme Göre Deneysel Karşılaştırılması.....	55
4.9.	Spektrofotometrik Bradford Yönteminin Organik Çözücülerle On-line HPLC Protein Uygulamalarına Model Olarak Denenmesi.....	59
5.	TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	80
6.	KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ		



Doktora Tezi

ÖZET

HPLC ile Proteinlerin Ayrılmasında Dedeksiyon Amaçlı Yeni On-line Yöntemin Geliştirilmesi ve Gıda ve İlaç Analizinde Uygulanması

Ozan Emre EYUPOĞLU

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

2017, 92 Sayfa

Protein tayininde kullanılan mevcut UV-Vis spektrofotometrik yöntemlerin taraması yapıldıktan sonra, bu yöntemlerden üstün validasyon özelliklerine sahip olanların HPLC ile protein ayrılmasına uyarlanması sayesinde kolon sonrası reaktif enjeksiyonuyla kantitatif protein tayininin yapılabileceği on-line HPLC-Protein tayin sistemi (On-line HPLC-Biüret, On-line HPLC-Ninhidrin, On-line HPLC-Bradford) geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemlerden dedeksiyon açısından üstün olan On-line HPLC-Bradford yöntemi ile ayırım sonrası 595 nm’de kantitatif miktar belirleme mümkün olmuş, 280 nm’deki yarı kantitatif ölçüme göre daha güvenilir ölçümlere imkan sağlanmıştır.

Bilinen çeşitli standart protein numunelerinin (CA ve BSA proteinleri) kullanılmasıyla on-line yöntemin optimize edilmesinden sonra tayin ve tespit sınırları belirlendi ve gıda (jelatin proteini) ve biyofarmasötik ilaç (insülin, immünglobulin G proteinleri) proteinlerinin boyut dışarılama kolonu ile kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Ayrıca organik çözücü sistemlerinin (metanol, etanol, asetonitril) proteinler (CA, BSA, immünglobulin G, insülin) ve Bradford reaktifi ile birlikte on-line HPLC’de izokratik ya da gradient uygulamaları farklı kolon sistemleri için model teşkil etmesi amacıyla % kompozisyonları değiştirilerek spektrofotometrik analizleri yapılmıştır.

0.3 mL/dk akış hızı, 70 mg/L reaktif konsantrasyonu, 30 °C sıcaklık ve 2.5 m tubing uzunluğu optimum olarak belirlenmiştir. Ayrıca son karışımda suyun yanında % 10’a kadar organik çözücünün de kullanılabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: On-line HPLC, Bradford, Comassie Blue, kantitatif protein analizi, dedeksiyon, gıda, ilaç

PhD. Thesis
SUMMARY

Improving New On-line Method Aim of Detection in Determined Proteins with HPLC And
Applying Analyzed Food And Drug

Ozan Emre EYUPOĞLU

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2017, 92 Pages

After searching UV-Vis spectrophotometric methods used for protein determination, development of an on-line HPLC-Protein determination system (on-line HPLC-Biuret, on-line HPLC-Ninhydrine, on-line HPLC-Bradford) is sought for by adapting the methods having better validation properties to protein separation with post-column reagent injection. On-line-HPLC-Bradford method, being superior in terms of detection, provided better quantitative determination at 595 nm after protein separation in comparison to the semi-quantitative protein determination at 280 nm.

By using various standard protein samples (CA and BSA proteins) the new method was optimized, limit of detection and limit of quantification values were determined, and quantitative determination of food (gelatin) and biopharmaceutic drug (insulin and immunoglobulin G) polypeptides were achieved by using size-exclusion column. In addition organic solvent systems (methanol, ethanol, acetonitrile) were evaluated spectrophotometrically by changing % compositions in order to show a model for the interaction with the determination of proteins (CA, BSA, immunoglobuline G, insuline) and Bradford reagent in the on-line HPLC system for isocratic or gradient applications and different column systems.

Optimization results were obtained as 0.3 mL/min reagent flow rate, 70 mg/L reagent concentration, 30 °C temperature and 2.5 m tubing length. It was also shown that all organic solvents below 10% mixing ratio can be used.

Key Words: On-line HPLC, Bradford, Comassie Blue, quantitative protein analysis, detection, food, drug

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Biüret reaksiyonu sonucu bakır-tetra amin kompleksi oluşumu (Kobbr, 1916).....	8
Şekil 2.2. Protein boya kompleksi oluşumu (Bradford, 1976).....	11
Şekil 2.3. Ninhidrinle amino grubu arasındaki reaksiyon (Ruhemann, 1910).....	13
Şekil 2.4. Kromotografik tabanlı yaklaşımla protein tanımlama (Flarakos vd., 2005).....	15
Şekil 2.5. On-line HPLC antioksidan aktivite tayin sistemi (Shi vd., 2009).....	22
Şekil 2.6. Florometrik metotla on-line enzim aktivite ölçümü (Shi vd., 2009).....	23
Şekil 3.1. Geliştirilen On-line HPLC-DAD-Bradford protein tayin Sistemi (SE-HPLC-Bradford) işleyiş diyagramı.....	33
Şekil 4.1. BSA ve CA proteinlerinin sabit protein konsantrasyonunda (0,25 mg/mL) Bradford reaktifiyle (100 mg/L) reaksiyonu sonucu spektrofotometrik olarak değişen sürelerde 595 nm absorbanslarının karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.2. BSA ve CA proteinlerinin sabit protein konsantrasyonunda (0,25 mg/mL) Bradford reaktifiyle (70 mg/L) reaksiyonu sonucu spektrofotometrik olarak değişen sürelerde 595 nm absorbanslarının karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.3. A: BSA proteiniyle Bradford reaktifinin spektrofotometrik kalibrasyon eğrisi, B: 1 mg/mL Amilaz, BSA, Arı zehirli proteinlerinin Bradford reaktifiyle (70 mg / L) 60 dk boyunca değişen sürelerde absorbans değişimi.....	38
Şekil 4.4. BSA ve CA (0,25 mg/mL)'nın 25, 30, 40 ve 50°C'lerde Bradford reaktifiyle spektrofotometrik olarak 10 dk'lık absorbans değişimleri.....	38
Şekil 4.5. A: 50 dk boyunca 37 °C ve oda sıcaklığında ve numune (BSA, bovine serum albumin): reaktif oranı (1:5), (5:1), reaktifteki bakır sülfat ve sodyum potasyum tartaratın 4 kat derişği kullanılması gibi parametreler değiştirilerek UV-Vis spektrofotometredeki absorbans ölçümleri, B: En iyi ölçüm için (oda sıcaklığında (1bsa:5) ve seyreltik reaktifle) oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	39
Şekil 4.6. Ninhidrin yöntemi için kalibrasyon eğrisi.....	39

Şekil 4.7. Spektrofotometrik Biüret metodunun HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Biüret) ile BSA'nın (20 mg/mL) 280 ve 540 nm kromotogramlarının karşılaştırılması (540 nm kromatogramı büyütülmüştür.).....	40
Şekil 4.8. Spektrofotometrik olarak denenen metodun HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Ninhidrin) ve BSA'nın (20 mg/mL) bu yöntemle DAD 280 nm ve UV 570 nm kromotogramlarının karşılaştırılması (570 nm kromatogramı büyütülmüştür.).....	41
Şekil 4.9. BSA proteininin (15 mg/mL) HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Bradford) ile DAD 280 nm ve UV 595 nm kromotogramlarının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.10. BSA ve CA (karbonik anhidraz) (1 mg/mL) protein karışımının on-line HPLC-Bradford ile DAD 280 nm ve UV 595 nm kromotogramlarının karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.11. Sabit protein (1 mg/mL) ve reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) şırınga pompanın akış hızı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum akış hızı belirlenmesi grafiği.....	44
Şekil 4.12. Sabit protein konsantrasyonu (1 mg/mL) ve optimum reaktif akış hızında (0,3 mL / dk) reaktif konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum reaktif konsantrasyonu belirlenmesi grafiği.....	45
Şekil 4.13. Sabit Protein konsantrasyonu (1 mg/mL), optimum reaktif akış hızında (0,3 mL/dk) ve optimum reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) tübingteki reaksiyon sıcaklığı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum reaksiyon sıcaklığı belirlenmesi grafiği.....	45
Şekil 4.14. Sabit Protein (BSA) konsantrasyonu (1 mg/mL), optimum reaktif akış hızı (0,3 mL/dk), optimum reaktif konsantrasyonu (70 mg/L), optimum reaksiyon sıcaklığında (30 °C) farklı tubing boylarından elde edilen normalize pik alanlarından optimum tübing boyunun belirlenmesi grafiği.....	46
Şekil 4.15. BSA proteininin optimize edilen şartlarda 2,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	47
Şekil 4.16. CA proteininin optimize edilen şartlarda 2,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'dekonsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	47
Şekil 4.17. BSA proteininin optimize edilen şartlarda 2,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	48

Şekil 4.18. CA proteinin optimize edilen şartlarda 2,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	48
Şekil 4.19. BSA proteinin optimize edilen şartlarda 1,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	49
Şekil 4.20. CA proteinin optimize edilen şartlarda 1,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	49
Şekil 4.21. BSA proteinin optimize edilen şartlarda 1,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	50
Şekil 4.22. CA proteinin optimize edilen şartlarda 1,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler.....	50
Şekil 4.23. BSA’nın 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması.....	51
Şekil 4.24. CA’nın 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması.....	52
Şekil 4.25. İmmünglobulin G’nin 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması.....	52
Şekil 4.26. İnsülin’in 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması.....	52
Şekil 4.27. Jelatin’in (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm (on-line bradford)’de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması (595 nm kromatogramı 80 kat küçültülmüştür).....	53
Şekil 4.28. İnsülin’in (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm(on-line bradford)’de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması.....	54
Şekil 4.29. İmmünglobulin’in (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm’de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması.....	54
Şekil 4.30. Jelatinin pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm’de konsantrasyona karşı absorbans karşılaştırması.....	56

Şekil 4.31. BSA'nın pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbands karşılaştırması.....	57
Şekil 4.32. CA'nın pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbands karşılaştırması.....	57
Şekil 4.33. İmmünglobulin G'nin pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbands karşılaştırması.....	57
Şekil 4.34. İnsülin'in pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbands karşılaştırması.....	57
Şekil 4.35. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda İmmünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	60
Şekil 4.36. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda İnsülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	60
Şekil 4.37. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	61
Şekil 4.38. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	61
Şekil 4.39. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	61
Şekil 4.40. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	62
Şekil 4.41. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda İmmünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	62

Şekil 4.42. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda İmmünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	62
Şekil 4.43. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	63
Şekil 4.44. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	63
Şekil 4.45. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	63
Şekil 4.46. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	64
Şekil 4.47. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	64
Şekil 4.48. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	64
Şekil 4.49. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	65
Şekil 4.50. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	65
Şekil 4.51. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	65

Şekil 4.52. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	66
Şekil 4.53. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	66
Şekil 4.54. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	66
Şekil 4.55. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	67
Şekil 4.56. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	67
Şekil 4.57. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	67
Şekil 4.58. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	68
Şekil 4.59. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	68
Şekil 4.60. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	68

Şekil 4.61. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	69
Şekil 4.62. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	69
Şekil 4.63. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	69
Şekil 4.64. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	70
Şekil 4.65. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	70
Şekil 4.66. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	70
Şekil 4.67. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	71
Şekil 4.68. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	71
Şekil 4.69. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	71
Şekil 4.70. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması.....	72

Şekil 4.71. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	72
Şekil 4.72. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	72
Şekil 4.73. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	73
Şekil 4.74. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C ₁₈ kolonda İmmünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması.....	73
Şekil 4.75. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbandslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	73
Şekil 4.76. CA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbandslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	74
Şekil 4.77. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbandslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	74
Şekil 4.78. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbandslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	74
Şekil 4.79. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbandslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	75

Şekil 4.80. İnsülin proteininin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	75
Şekil 4.81. İmmünglobulin G proteininin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	75
Şekil 4.82. BSA proteininin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	76
Şekil 4.83. İnsülin proteininin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	76
Şekil 4.84. İmmünglobulin G proteininin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	76
Şekil 4.85. BSA proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7.0 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	77
Şekil 4.86. İnsülin proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7.0 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	77
Şekil 4.87. İmmünglobulin G proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7.0 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması.....	77

- Şekil 4.88. BSA proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması..... 78
- Şekil 4.89. İnsülin proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması..... 78
- Şekil 4.90. İmmünglobulin G proteininin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7.0 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanlarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması..... 78

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1. Kromotografik yöntemlerin karşılaştırılması (Kromidas, 2006).....	18
Tablo 2.2. Bazı proteinlerin amino asit içeriği.....	25
Tablo 3.1. Mevcut spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması.....	26
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	28
Tablo 3.3. Kimyasallar ve üretici firmalar.....	29
Tablo 3.4. Standart çözeltilerin ve kullanılan reaktiflerin hazırlanışları.....	29
Tablo 3.5. Bütün HPLC denemelerinde uygulanan HPLC elüsyon izokratik program.....	30
Tablo 4.1. BSA (20 mg/mL) proteininin piklerinin 280 nm ve 540 nm’ deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri.....	40
Tablo 4.2. BSA proteininin (20 mg/mL) piklerinin 280 nm ve 570 nm’ deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri.....	41
Tablo 4.3. BSA proteininin (15 mg/mL) piklerinin 280 nm ve 595 nm’ deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri.....	42
Tablo 4.4. BSA ve CA (karbonik anhidraz) (1 mg/mL) proteinlerinin piklerinin 280 nm ve 595 nm deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri.....	43
Tablo 4.5. BSA, immünglobulin G, CA (karbonik anhidraz), insülin proteinlerinin 280 ve 595 nm tespit ve tayin limitleri.....	53
Tablo 4.6. Jelatin (1 mg/mL), immünglobulin G (1 mg/mL), insülin (1 mg/mL)’nin 280 ve 595 nm’deki pik alanları.....	55
Tablo 4.7. 280 nm ve 595 nm için pH 7,0 fosfat tamponu çözücü matrisinde HPLC’de on-line ve spektrofotometrede off-line uygulamalardaki proteinlerin absorban karşılaştırılması.....	56
Tablo 4.8. İki farklı yöntemin (spektrofotometrik (off-line) ve on-line HPLC) matematiksel normalizasyonla % sitokiyometrik protein –Comassie Brilliant Blue G250 bağlanma oranı karşılaştırılması (Ku ve arkadaşları tarafından 2013’te yapılan hesaplama modeli modifiye edildi).....	59

KISALTMALAR DİZİNİ

AR-GE	Araştırma-geliştirme
ACN	Asetonitril
ABTS	2,2'- azino-bis -3 etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit
BCA	Bovine carbonic anhydrase
BSA	Bovine serum albumine
CA	Carbonic anhydrase
CBBG	Coomassie brilliant blue G-250
CDD	Conductivity detector
DAD	Diode array detector
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	Ditiyotrietol
ECD	Electro chemical detector
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ELSD	Evaporative light scattering detector
FLD	Floresans dedektör
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
HIC	Hidrofobik etkileşim kromatografisi
ICP-MS	Inductive coupled plasma-mass detector
IEC	İyon değişim kromatografisi
Ig G	İmmünglobulin G
LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
OPA	O-fitalaldehit
PDA	Photo diode array detector
PVP	Poli vinil prolidin
PES	Poli eter sülfan
RID	Refractive index detector
RP-HPLC	Reverse phase high performance liquid chromatography
SEC	Boyut dışarılama kromatografisi

SDS	Sodyum dodesil sülfat
TOF-MS	Tandem of flight mass detector
t_R	Retention time
UV	Ultra violet
g	Gram
Da	Dalton
kDa	Kilo dalton
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
ppm	Milyonda bir
M	Molar
ϵ	Molar absorptivite katsayısı
nm	Nanometre
ng	Nanogram
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
cm	Santimetre
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Proteinler, gerek gıda endüstrisi, gerek ilaç endüstrisi ve gerekse biyoteknolojik üretim amaçlı olsun dozajın dikkate alınmasını gerektiren ve bunun için de kalitatif dedeksiyonun yanında kantitatif dedeksiyonu zorunlu kılan hassas tayin ölçekli cihazları gerektiren önemli moleküllerdir. Protein tayinlerinde büyük oranda spektrofotometreler kullanılır ve 280 nm'deki spesifik dalga boyundaki absorbanstan yaygın olarak yararlanılır. Fakat bu yöntem sadece sistein, tirozin ve triptofan aminoasitlerini içeren proteinlere uygulanabilmektedir. Bu sorunun çözümü için proteinlerdeki peptid bağına dayalı yöntemler geliştirilmiş, tayin için kullanılan farklı reaktiflerin proteinle olan reaksiyonları sonucu oluşturdukları farklı ürünlerin spesifik dalga boylarından da yararlanılmıştır.

Bu yöntemler numunedeki proteinlerin tamamını ölçmektedir. Spektrofotometrik yöntemler gelişmiş ayırım ve tayini bir arada yapabilen HPLC cihazları ile kombine edilmiştir. Hatta TOF-MS gibi gelişmiş MS dedeksiyon sistemine sahip kütle fragmentasyonu ile protein miktarı ve yapısı bilgisi veren sistemlerde mevcuttur (Caira vd., 2013).

MS sistemi hem daha pahalı hem de protein miktarıyla ilgili net, tam bir bilgi verememektedir. Bu açıdan peptid bağı üzerinden sinyal ölçümünün önemli olduğu daha kantitatif dedeksiyon yöntemlerinin HPLC sisteminde kullanılması gereklidir. Bu amaçla geliştirilmiş on-line HPLC-Protein tayin yöntemleri ile (on-line Biüret, on-line Bradford) spektrofotometrik ölçümlere dayalı ayırım ve miktar belirlemenin eş zamanlı oluşu gibi önemli özelliklerin uygulanabilirliği ve 280 nm'deki yarı kantitatif ölçümlere göre daha güvenilir kantitatif ölçümlere imkan sağlamıştır. Bu da daha hızlı daha duyarlı daha ucuz bir analiz sonucu vermiştir.

Bu çerçevede mevcut spektrofotometrik yöntemlerin taraması yapılmış ve ardından on-line HPLC antioksidan sistemleri gibi (Niederlander vd., 2008; Raudonis vd., 2012; Shi vd., 2009; Arslan Burnaz vd., 2017; Aktas Karaçelik vd., 2015) sistem olan kolon sonrası protein ayırımıyla eş zamanlı protein tayininin yapılabileceği bir sistemle mevcut spektrofotometrik tayinler olan Ninhidrin, Biüret ve Bradford yöntemlerinin on-line sisteme uyarlanması amaçlanmış olup geliştirilen metod çeşitli proteinlerle optimizasyonu yapıldıktan sonra çeşitli gıda ve peptid türü ilaç numunelerine uygulanmıştır. Böylece literatüre hem yeni hem de kullanışlı kantitatif protein tayin sistemi metodolojisi kazandırılmıştır.

Metod aynı zamanda biyolojik numunelerde, örneğin insan vücut sıvılarındaki peptid ve proteinlerin ayrılmasını ve de miktarlarının güvenli şekilde belirlenmesini sağlayacaktır. Geliştirilen yöntemin uygulama alanları çok geniş olup özellikle gıda ve biyomateryallerdeki özellikle elde standardı bulunmayan peptid ve proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için çok kullanışlı olacağı açıktır. Bu materyallerin protein içeriği çok duyarlı bir şekilde belirlenebileceğinden ilaç AR-GE faaliyetleri ve laboratuvar tanı teşhis analizlerinde (gıda ve sağlık) ülkemize duyulan güven arttırılarak akredite laboratuvar sayımız geliştirilecek ve ülkemizin dünya ülkeleri arasındaki sıralaması yükselecektir. Bu durum stratejik açıdan ülkemizin dış ülkelere bağımlılığını azaltarak kendi ekonomisine katma değer kazandırmasını temin edecek faktörlerden biri olabilecektir.



2.GENEL BİLGİLER

Nükleik asit, protein gibi biyokimyasal sarf malzemeleri üreten ve tanı amaçlı kullanan cihazların geliştirilmesi 2023' te ülkemiz bilim, teknoloji ve yenilik politikalarının vizyon hedefleri arasındadır. Bu açıdan on-line HPLC-DAD-UV protein analizi, eş zamanlı olarak proteinlerin ayrılması ve miktarı tayin metodolojisi 280 nm'deki yarı kantitatif yöntemle göre daha duyarlı peptid bağı üzerinden ölçen ve farklı matrislerin HPLC ile protein ayrımının yapılmasına ve ardından hızlı ve kesin bir metodolojik ölçüme imkan veren teşhis, tanı ve üretim açısından önem arz edebilecek bir sistemdir. Ayrıca UV-DAD dedeksiyon sistemi ile yapılan analizler MS ile yapılan analizlere göre çok daha ucuzdur ve analiz laboratuvarlarında daha yoğun olarak kullanılmaktadır.

Canlılarda görülen biyolojik etkileri, etken maddenin yapı özelliklerini, etken maddenin verildiği dozaj şeklinin türünü, dozaj şeklinin imalatında kullanılan farmasötik yöntemleri inceleyen bilim dalı biyofarmasötiktir. Biyofarmasötikler bir hastalığı önlemek veya tedavi etmek üzere uygulanabilen virüs, terapötik serum, toksin, antitoksin, aşı, kan ürünleri ve türevleri, allerjenik ürün ya da sitokin, interferon, trombolitik gibi terapötik proteinler ve peptidlerdir. Biyofarmasötik yapılı biyobenzer tıbbi ürünlerin farmasötik şekil, dozaj ve uygulama yolu referans ürün ile güvenilirlik, saflık ve moleküler yapılar açısından benzer olmalıdır (Kamal vd., 2012). Ürün-moleküler yapı karşılaştırılabilirliği protein içeriği açısından (yapı ve dozaj) kromatografik yöntemlerle karşılaştırılarak belirlenebileceğinden geliştirilen yöntem bu amaca yönelik hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Bunun yanında gıda hammaddelerinde ve katkılarında bulunan protein ve enzimlerin gıda numunesindeki miktarı daha duyarlı bir şekilde belirlenebilecektir.

Gıdalara katılabilecek protein türevli katkı maddelerinin sağlık açısından gerekli miktarları önem arz etmektedir. Örneğin insanlarda ekmek ununda mevcut olan gluten proteinine duyarlılık ve buna bağlı alerjik etki gözlenebilmektedir. Bu proteinin kullanımının sınırlı veya kontrollü olmasını gerektiren çölyak hastalığı bu protein grubuna karşı hassasiyetten kaynaklanmaktadır. Batı ülkelerinde hazır gıdalarda, içindekiler listesinde belirtilmesi gereken belli bir oranın üzerinde risk taşıyan allerjenlerin başındadır (Mansueto vd., 2014). Dolayısıyla unda eğer yüksek oranda gluten proteini mevcutsa bu alerjik etkiye duyarlı kişilerde sağlık açısından bir tehdit söz konusu olacağı için glütenin düşük miktarlarının bile gıdalarda hızlı ve kesin kantitatif ölçümü önem arz etmektedir.

Benzer bir durum çeşitli sütlerde bulunan proteinlere karşı allerjik reaksiyonların görülmesinde söz konusudur. Bu açıdan numunenin keçi sütü - inek sütü protein içeriği açısından (nitel ve nicel olarak) ayırt edilmesi önemlidir.

2.1. Protein Tayin Yöntemleri

Bir çözeltildeki toplam protein miktarının belirlenmesi, bilimsel araştırmalarda, gıda analizlerinde, endüstriyel ve biyoteknolojik birçok ürünün analizinde kullanılır. Proteinlerin saflaştırma basamaklarında mutlaka protein tayinleri yapılmalıdır. Saflaştırılan protein bir enzimse ek olarak aktivite tayinlerinin de yapılması gerekir. Özellikle kromatografik ve elektroforetik ayırmalarda deneylerin optimizasyonu için miktar tayini yapılması gerekir.

Günümüzde teşhis için önemli olan enzim ve serum proteinlerinin hemen hepsi otomasyonlu spektrofotometrik yöntem ve kitler kullanılarak yapılmaktadır.

Spektrofotometrede çalışılan her dalga boyu aralığının kendi avantajı vardır. Düşük dalga boyu sınırlı numune analizine izin veren duyarlılığı geliştirirken daha büyük dalga boyları daha büyük lineer dinamik aralık sağlar (Hong vd., 2012).

Temel biyokimyasal işlemlerde de spesifik aktivite tanımı için biyolojik örneğin protein miktarından yararlanır (aktivite / mg protein). Protein tayin yöntemleri aşağıdaki genel başlıklar altında toplanabilir:

1. Kjeldal Yöntemi
2. Boya Bağlama Yöntemleri
3. Gravimetrik Yöntemler
4. Spektrofotometrik Yöntemler
 - Görünür Bölgedeki Ölçümler
 - Ultraviyole Bölgedeki Ölçümler
 - Florimetrik Ölçümler

Protein tayin yönteminin seçimi, belirlenecek proteinin örnekteki miktarına, örneğin yapısına (en uygun örnekler sıvı halde olanlardır), yöntemin o proteine spesifikliğine, girişim yapan maddelerin varlığına (protein çöktürmesi yaptıktan sonra yıkama işlemleriyle bu maddeler ayrılabilir) bağlıdır.

Amino asitler ve tuzlar gibi küçük moleküller ise diyalizle uzaklaştırılabilir ve miktar tayini yapılacak proteinin amino asit bileşimine bağlıdır.

Yakın ve uzak UV dalga boyları protein ölçümünde yaygın kullanılan triptofan gibi aromatik amino asitlere cevap verir. Daha yüksek duyarlılık düşük dalga boylarında (amid peptid bağının güçlü absorpsiyonunun olduğu 214 ya da 220 nm'de) dedeksiyon sağlar (Hong vd., 2012).

2.1.1. Kjeldahl Yöntemi

Azot miktarını belirlemek için kullanılan oldukça eski bir yöntemdir. Bu yöntemde bileşiklerde bulunan azot, derişik H_2SO_4 'le ve Cu^{2+} iyonları, civa iyonları ve metalik selenyum gibi katalizörlerle reaksiyona sokularak NH_3 'a dönüşür. Böylece NH_3 asidik ortamda NH_4^+ iyonları halinde tutulur. Çözelti H_2SO_4 ilavesinden sonra kahverengi-siyah bir renk alır, ısıtıldıkça berraklaşır. Soğuyan karışım distilasyon cihazına alınır ve ortamın kuvvetli bazik olması için NaOH ilave edilir. Oluşan NH_3 destillenerek alınır ve borik asit çözeltisinde tutulur. NH_4^+ iyonları, ayarlı HCl ile titre edilir. Proteindeki azot oranından hareket ederek protein miktarı belirlenir (Kjeldahl,1883).

Bu yöntemle; aminlerde, proteinlerde ve amitlerde bulunan amonyak azotları tayin edilebilir. Ancak bu yöntem, ortamda protein dışında başka azot kaynağı olduğu durumlarda kullanılamaz. Böyle bir durumda proteinler çöktürüldükten sonra tayin yapılmalıdır.

2.1.2. Boya Bağlama Yöntemi

Proteinlerin çeşitli kimyasal reaktiflerle oluşturduğu renkli bileşiklerin belirli dalga boylarında verdikleri absorpsiyona dayalı ölçümlerdir. Bu yöntemin dezavantajı, farklı proteinler, farklı kolorimetrik reaktiflerle farklı reaksiyonlar verir.

Reaktifle protein örneğinin reaksiyonu sonucu oluşan absorpsiyon, örnekteki proteinin bağıl miktarını hesaplamak için kullanılır (protein standardına göre bağıl miktar) (Luca ve Reis, 2004).

2.1.3. Gravimetrik Yöntemler

Protein suda çözülür ve 95 °C'de tüm su uçuncaya kadar kurutulur. Daha sonra sıcaklık fiziksel olarak bağlı bulunan suyun uzaklaştırılması için 105-110 °C'ye kadar artırılır. Protein çözeltisinin soğutulup bir vakum desikatöründe P₂O₅ ile kurutulduktan sonra kuru ağırlığı belirlenir. Bir çalışmada amilaz varlığı bu yöntemle belirlenmiştir (Mertens, 2002). Bu yöntem $\epsilon^{%1}_{280}$ değerini belirlemek için kullanılır. Kuru ağırlık 0.073 g olarak belirlenmiş olsun. Bu 100 mL suda çözüldüğü zaman; konsantrasyon = 0.073 g /100 mL = % 0.073 olarak bulunur. $A_{280} = 0.815$ olarak bulunsun, $A_{280} = \epsilon \times l \times c$ $l = 1$ cm olduğundan $\epsilon = A_{280}/c$ bulunur. $\epsilon^{%1}_{280} = 0.815 / 0.073 = 11.16$ olur.

2.1.4. Spektrofotometrik Yöntemler

Spektrofotometrik yöntemler, protein konsantrasyonunun belirlenmesinde çok fazla kullanılır. Lambert-Beer yasasına göre absorbans konsantrasyonla ilgili olduğundan böylelikle örnekteki protein miktarı hesaplanabilir.

$$A = \epsilon \times l \times c$$

A = Absorbans

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı (ekstinksiyon katsayısı, M⁻¹ cm⁻¹)

l = Işığın geçtiği yol (cm)

Her proteinin kendi molar ekstinksiyon katsayısı (ϵ) vardır. Bu işlemlerde molar konsantrasyon kullanılır ve ışığın geçtiği yol ise genel olarak 1 cm olduğu için molar ekstinksiyon katsayısının birimi M⁻¹cm⁻¹'dir.

Absorbans skalanın dışına çıkarsa protein örneği tamponla seyreltilir ve ölçüm tekrarlanır. Buna alternatif olarak daha kısa ışık yolu olan bir küvet de kullanılabilir. Belirli bir dalga boyunda molar absorpsiyon katsayısının belirlenmesi için o madde için hazırlanan stok çözeltilerden seyreltmeler yapılır ve bir seri çözeltiler hazırlanır. Bunların absorpsiyon değerleri konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilir ve bu doğrunun eğiminden ϵ belirlenir.

Ultraviyole Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler: Tirozinde bulunan fenolik ve triptofandaki indolik grupların ve sisteindeki S gruplarının 280 nm'de maksimum absorbans göstermesinden yararlanılarak protein miktarı belirlenmektedir. Yöntem çok duyarlı değildir (0.02–2.0 mg protein/mL). Ancak protein örneğinde bir ön işleme gerek olmadan yapılan kolay ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle çok kullanılır (Warburg ve Christian, 1941).

280 nm'deki absorbans değerleri protein miktarını kabaca verir. Ancak ekstinksiyon katsayısı biliniyorsa o zaman daha hassas sonuçlar alınır.

Bu teknik genellikle kolon kromatografisinde protein pikinin nerede elue olacağını belirlemek için ve ham protein karışımlarındaki protein miktarlarının belirlenmesi için kullanılır. Protein çözeltisinin saflık düzeyi yükseldikçe hatalar da en aza indirgenir. Bu nedenle bu yöntem genellikle yarı saf veya saf protein çözeltilerine uygulandığında çok daha hassas sonuçlar elde edilir. UV absorbans yönteminde aynı konsantrasyondaki iki farklı proteinin aromatik amino asit içerikleri farklıysa farklı UV absorpsiyon değeri verir. Bu durum örnek proteinle aynı olan bir standartla deney yapılmasıyla ortadan kaldırılır.

Bu yöntemin önemli bir sakıncası, 260 nm'de maksimum absorpsiyon veren nükleik asitlerle proteinlerin girişim yapmalarıdır. Nükleik asit artıkları ile kontamine olmuş ilk kaba ekstrlerle çalışıldığında hatalı sonuçlar elde edilebilir. Burada nükleik asit ve protein için belirli konsantrasyonlardaki A_{280} ve A_{260} değerleri verilmektedir. Buradan yararlanarak hata düzeltme faktörleri belirlenmiş ve listelenmiştir (Warburg ve Christian, 1941). Yöntemin uygulanışı kısaca şöyledir:

1. Protein çözeltisinin 260 nm ve 280 nm' de absorbansları ölçülür.
2. A_{280}/A_{260} oranı belirlenir.
3. Hata düzeltme faktörü formülde yerine koyularak protein miktarı hesaplanır.

Uzak Ultraviyole Bölgedeki Ölçümler: Proteinlerdeki peptit bağları 191-194 nm'de bir maksimum absorbans gösterirler. Bu teknik protein örneğinde herhangi bir işleme gerek olmayan pratik ve kolay bir yöntem olmasına rağmen kullanılan tamponlarla girişim söz konusu olabilir. Çünkü bu dalga boyunda alkoller, kullanılan tamponlardaki iyonlar ve karboksilik asitler de absorbans verir. Bu nedenle protein tayini için fazla kullanılmaz. Bu yöntem proteinlerin amino asit bileşimine bağlı olmadığı için 280 nm'deki ölçümlere göre daha başarılıdır. Ancak oksijen bu bölgede absorpsiyon yaptığı için bu amaçla rutin spektrofotometreler dışında özel cihazlar kullanılmalıdır.

Eğer protein örneği çok az tirozin ve triptofan amino asitlerini içeriyor veya hiç tirozin ve triptofan amino asitlerini içermiyorsa protein miktarı 205 nm' deki absorbansı ölçülerek belirlenebilir. 205 nm'deki absorbansın büyük bir kısmı peptit bağlarından kaynaklanmaktadır (Scopes, 1974).

Protein örneği triptofan ve tirozin içeriyorsa, 280 nm' deki absorbands ölçümüyle 205 nm' deki ölçümlerin kombinasyonu sonucu elde edilen formül kullanılarak daha uygun sonuçlar elde edilir. Protein derişimi (mg / mL) = $27 \times 120 \times A_{280} / A_{205}$ (Scopes, 1974).

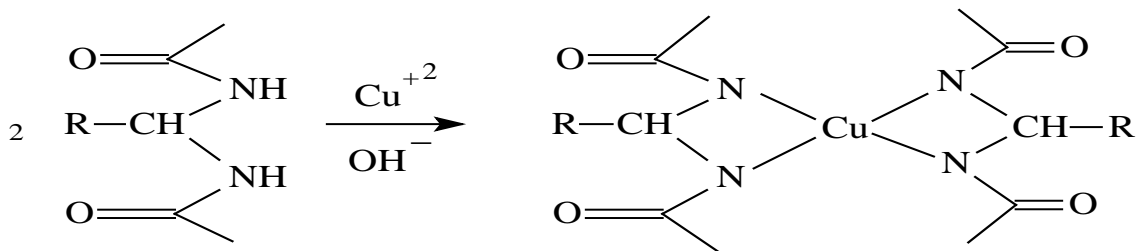
Görünür Bölgedeki Spektrofotometrik Ölçümler:

- Biüret Yöntemi:

Biüret reaksiyonunu iki veya daha fazla peptit bağı içeren maddeler verir. Bu yöntem adını ürenin kuru ısıtılması sonucu oluşan biüret isimli maddeden ($H_2N-CO-NH-CO-NH_2$) almaktadır. Bu yöntemde alkali ortamdaki Cu^{2+} iyonları protein ve peptitlerdeki peptit bağı azotuyla mavi-menekşe renkli kompleks verirler. Renk şiddeti 540 nm'de fotometrik olarak tayin edilebilir. Bakır iyonları ile koyu mavi renkli bakır-tetraamin kompleksi oluşur (Kobbr, 1916) (Şekil 2.1).

Ortamda amonyum iyonları bulunduğu zaman (tampon olarak Tris kullanılması ve amonyum sülfat ile protein çöktürülmesi) bu yöntem uygulanamaz. Böyle bir durumda bakır iyonları amonyakla koyu mavi renkli bakır-tetraamin kompleksi oluşturur. Biüret yönteminin duyarlılığı düşüktür (1-10 mg protein/mL).

Ancak kullanılan reaktiflerin ucuz, hazırlanmasının kolay olması ve diğer yöntemlere göre girişim etkilerinin daha az olmasından dolayı kullanılmaktadır. Bu yöntemle miktar tayini yapılabilmesi için örnekteki protein miktarının 1-20 mg civarında olması gerekmektedir. Cu^{2+} iyonları ana zincire bağlandığı için bu yöntem proteindeki amino asit içeriğinden etkilenmez.



Şekil 2.1. Biüret reaksiyonu sonucu bakır-tetraamin kompleksi oluşumu (Kobbr, 1916).

-Lowry Yöntemi:

Protein tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisinin (Folin-Ciocalteu reaktifi) alkali koşullarda proteinlerdeki fenolik amino asitlerle verdiği reaksiyona dayanmaktadır. Bu yöntemde alkali koşullarda iki farklı reaksiyon gerçekleşmektedir.

Birinci reaksiyonda peptit bağları ile Cu^{2+} arasında biüret reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır oluşur. İkinci reaksiyonda ise Folin-Ciocalteu ayırıcı, tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenir ve mavi renkli hetero polimolibden kompleksi meydana getirir. Oluşan kompleks 600-800 nm aralığında absorpsiyon piki verir. Lowry yöntemine proteinin amino asit bileşiminin etkisi orta düzeydedir.

Ancak amino türevleri, tamponlar, deterjanlar, lipitler, karbohidratlar ve şelatlayıcı ajanlar bu yöntemle girişim yapmaktadır. Protein örneği seyreltilerek bu girişim etkileri azaltılabilir. Ayrıca bu etkilerin önlenmesi için, yöntemin her bir girişim etkisi için farklı modifikasyonları bulunmaktadır. Lowry yöntemi, tirozin ve triptofan içeriği fazla olan proteinlerle daha fazla hassasiyet gösterdiği için bu amino asitler açısından zengin olan proteinlerde oldukça iyi sonuçlar alınmaktadır.

Bu yöntemin hassasiyeti 30-150 $\mu\text{g/mL}$ civarındadır. Reaksiyon pH'a çok fazla bağlıdır (pH 10-10.5). Bu nedenle uygun bir pH'ın sağlanabilmesi için reaktifin seyreltilmesi gerekebilir.

Reaksiyon oda sıcaklığında 40 dakikada tamamlanır. Absorbans okuması cam veya polistiren küvetler kullanılarak 750 nm' de yapılır. Ancak 600 ve 650 nm'de absorbans ölçümleri yapılmaktadır. Lowry yöntemi, hassasiyetinin iyi olması ve kolaylığı açısından protein biyokimyası işlemlerinde çok fazla kullanılır. En fazla gıda proteinlerinin tayininde kullanılır. Çünkü gıda karışımından proteinleri izole etmeye gerek yoktur. Biüret yöntemine göre 50-100 kez daha hassastır. 280 nm' de absorbans yöntemine göre ise 10-20 kez hassastır. Diğer yöntemlere göre daha spesifiktir.

Dezavantajları: Renk oluşumu proteinlere göre farklılık gösterebilir. Renk tamamen protein konsantrasyonuyla orantılı olmayabilir. Lipitler, sakkaroz, fosfat tamponları, monosakkaritler ve hegzaminlar girişim yaparlar (Lowry, 1951).

-Bikinkoninik (BCA) Asit Yöntemi:

Lowry yönteminin farklı bir uygulaması olan bu teknik, Smith ve arkadaşları tarafından 1985'te geliştirilmiştir. Diğer protein tayin yöntemlerine göre daha yenidir ve reaktif olarak bikinkoninik asit (BCA) kullanılır.

Bu yöntem alkali çözeltideki proteinlerin Biüret reaktifi ile Cu^{2+} den Cu^+ ya indirgenmesi ve daha sonra Cu^+ nın BCA ile verdiği renkli kompleksin 562 nm'deki spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Renk yeşilden koyu mora dönüşür. Yöntemin duyarlılığı Lowry metoduna yakındır (20–100 μg protein/mL). Mikro ölçüm işlemi ile duyarlılığın daha da artırılması mümkündür. BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan az etkilenir ve girişim etkisi gösteren çok fazla bileşik yoktur. Ancak BCA reaktifi pahalıdır ve tekrarlanabilirlik düşüktür.

Amino asitler, deterjanlar, lipitler, şekerler ve nükleik asitler Lowry metoduna göre daha iyi tolere edilir. İndirgen şekerler ve bakır şelatlayıcı maddeler bu yöntemde girişim etkisi gösterir. Cu^{2+} iyonları ile şelat oluşturan EDTA gibi maddeler de girişime yol açar. Ditiyotritol, glutatyon ve 2-merkaptoetanol gibi indirgeyici reaktifler de Cu^{2+} iyonlarını Cu^+ ya indirgeyerek oldukça fazla girişim etkisi gösterir (Smith vd., 1985).

-Bradford (Coomassie Brilliant Blue) Yöntemi:

Boya bağlama esaslı yöntemlerin en yaygını 1976 yılında geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G–250 boyasının kullanıldığı yöntemdir. Proteinlerin asidik ve bazik grupları uygun koşullarda organik boyalarla etkileşerek renkli bileşikler oluşturur. Özellikle aromatik boyar maddeler proteinlere çok sağlam bağlanırlar. Proteinlerin tayin edilmesi işlemlerinde Orange G, Amido siyahı, Bromkrezol yeşili ve Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) gibi boyalar kullanılmaktadır.

Coomassie Brilliant (CB) boyalarının proteinlere bağlanması ilk kez Fazekas de St Groth ve arkadaşları tarafından 1963 yılında çalışılmıştır. Yöntem bu boyanın farklı konsantrasyondaki protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturmasından yararlanılarak geliştirilmiştir (Bradford, 1976).

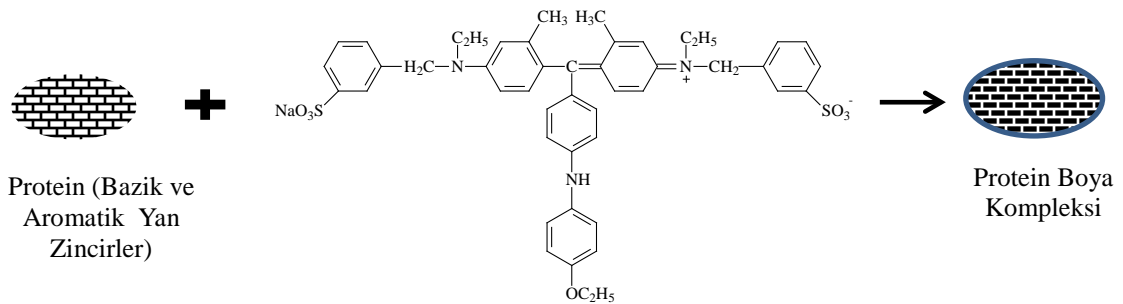
Boya özellikle arginin gibi bazik amino asitlere ve bazı aromatik amino asitlere bağlanmaktadır. Bu yöntemle oldukça geniş bir aralıkta protein tayini yapmak mümkündür. Kolay ve hassas bir yöntemdir. Arginin amino asidi bu boyayla diğer amino asitlere göre sekiz kat daha fazla cevap verir. Çalışılan arginine zengin bir proteinse standardın da aynı şekilde arginine zengin olması gerekir. G-250 boyası sulu ortamda kırmızı (A) ve mavi (B) olmak üzere iki şekilde bulunur (Bradford, 1976).

Asidik ortamda kırmızı renkli (A) şekli fazladır ve 470 nm’ de maksimum absorpsiyon yapar. Bu boya, pozitif yüklü bir proteine bağlandığında ise 595 nm’ de mavi bir renk oluşturur (Şekil 2.2). Renk oluşumu 5 dakikada tamamlanır, ancak 10-15 dakikada çökmeler olabilir.

Sedmak ve Grossberg 1977’de, boya-protein kompleksinin boyanın kaynağına bağlı olarak maksimum absorbans aralığının 595-620 nm arasında değiştiğini bildirmiştir. Bu araştırmacılar protein miktarının belirlenmesi için 620 ve 464 nm’ deki absorbansların oranının kullanılmasının daha uygun olacağını ve asidik bir ortam oluşturmak için fosforik asit yerine perklorik asit veya hidroklorik asit kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Zor ve Selinger 1996’da ise 590 ve 450 nm dalga boylarının oranının kullanılmasının tayin sisteminin lineerliğini de arttırdığını belirtmiştir. Bu oranın kullanılması aynı zamanda tayinin hassasiyetini de artırır. Bu yöntemde duyarlık 150-750 µg protein/mL civarındadır. Bu duyarlık mikro tayinlerle daha da artırılabilir (25–200 µg protein/mL). Boya-protein kompleksinin ekstinksiyon katsayısı substratın 10 kata kadar olan farklı konsantrasyonunda bile kararlıdır.

Örneğin absorbansı lineer bölgenin üstüneyse toplam hacim 5 mL oluncaya kadar Bradford çalışma tamponuyla seyreltilebilir. Kör de aynı hacme seyreltilmelidir (Spector, 1978). Bradford yöntemi kolonlarda bulunan immobilize proteinlerin ve membrana bağlı proteinlerin konsantrasyonunu belirlemek için de kullanılır (Fanger, 1987).



Şekil 2.2. Protein boya kompleksi oluşumu (Bradford, 1976).

-Gümüş Bağlama Yöntemi:

Gümüş iyonlarının proteinlerle bağlanmasıyla oluşan renkli bileşiğin 420 nm’deki absorbansının okunmasıyla yapılır.

Oldukça yüksek bir hassasiyeti vardır (150 ng – 20 µg protein/mL). Ancak şelatlayıcı ajanlar (EDTA) tarafından, % 0.01 den fazla SDS'den ve DTT ve 2-merkaptolanol gibi indirgeyici ajanlardan kolayca etkilenecek şekilde bozulur (Moeremans, 1985).

-Kolloidal Altın Yöntemi:

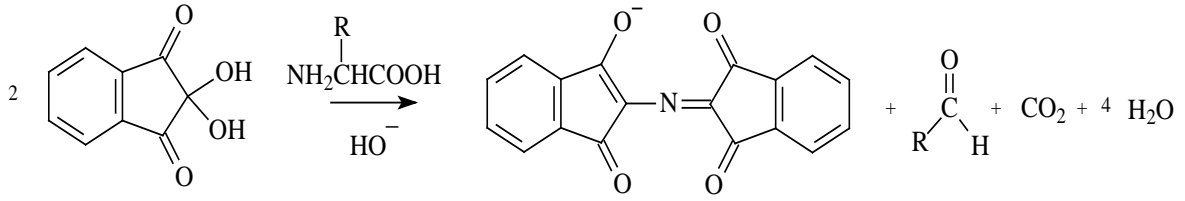
Bu yöntemin temeli, asidik ortamda (+) yüklü proteinlerin (-) yüklü kolloidlerle etkileşmesi ve oluşan rengin 560 nm' de okunmasıdır. Bu yöntem 2-60 µg protein/mL aralığında bir duyarlılığa sahiptir. Bu işlemde proteinlerin bağlanması için genellikle nitroselüloz membranlar kullanılmaktadır. Membrana bağlı proteinler kolloidal altın çözeltisi ile 2-16 saat inkübe edildikten sonra örnekteki protein miktarıyla orantılı olarak mor renkli protein bantları gözlenir.

Tüm bantların görünür hale gelmesi 1-2 saat içinde gerçekleşir. Sonra kolloidal altın çözeltisi birkaç kez yıkanarak uzaklaştırılır. Tüm yıkama ve inkübasyonlar oda sıcaklığında yapılmaktadır. Klorür iyonları gibi kontaminantlar kolloidal altının farklı çökmesine yol açar. Altın çözeltileri Bio-Rad firması tarafından hazır olarak satılmaktadır. Bu işlemde membranın cm²' si başına yaklaşık 0.2 mL kolloidal altın çözeltisi kiti kullanılması önerilmektedir.

Bantların dansitometrik analizinde, aynı nitroselüloza yerleştirilen protein standartlardan yararlanarak miktar tayini yapılır. Klasik protein tayin yöntemlerine göre bu yöntemde çok az miktarda protein örneğine gerek duyulur (2 µL). Böylece nanogram düzeyinde protein tayinleri yapmak mümkün olmaktadır (Hunter ve Hunter, 1987).

-Ninhidrin Yöntemi:

Ninhidrin denemesi amino asit kalıntısı miktarı temelli protein konsantrasyonunu ölçer. Ninhidrinle serbest amino grubu arasında mor renkli bir kompleks oluşur ve 570 nm'de absorbanans verir. 0,5 g ninhidrin reaktifi 30 mL izopropanol ve 20 mL 0,1 M pH 5,5 asetat tamponunda çözülerek hazırlanır. 2 mL reaktif 2 mL BSA karışımı 15 dakika kaynar su banyosunda bekletildikten sonra oda sıcaklığına getirildikten sonra 570 nm'de absorbanansı okunur (Ruhemann, 1910) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ninhidrinle amino grubu arasındaki reaksiyon (Ruhemann, 1910).

Florimetrik Ölçümler:

Florimetrik yöntemlerle diğer yöntemlerde görülen girişim sorunları ortadan kaldıran ve oldukça hassas sonuçlar elde edilir. Floresans tekniklerin en büyük avantajı, duyarlılıkları ve sonuçların nanogram düzeyine kadar belirlenebilmesidir. Bu tür floresans temelli tayinlerden biri Udenfriend ve arkadaşları tarafından 1972 yılında uygulanmıştır. Bu yöntemde floresan olmayan bir bileşik olan floresamin, proteinlerdeki primer aminlerle (peptitlerin terminal amino grupları ve lizinin ϵ amino grubu gibi) oldukça hızlı bir şekilde floresan bir bileşik oluşturarak reaksiyon verir.

1993 yılında Lorenzen ve Kennedy bu yöntemi modifiye etmiştir. Yaygın olarak kullanılan yöntem ise proteinlerin *o*-fitalaldehit (OPA) ile türevlendirilmesine dayanır. OPA proteinlerdeki primer aminlerle (amino asidin NH_2 terminali ve lizinin ϵ -amino grubu gibi) reaksiyon verir. Yöntemin hassasiyeti tayinden önce protein örneğinin hidrolizlenmesiyle daha da artırılabilir. Hidroliz işlemi proteinde yan grup olarak bulunan ϵ -amino gruplarını reaksiyona hazır hale getirir.

Bu yöntemle yapılan tayinlerde çok az miktardaki protein örneği yeterli olmaktadır. Tris (hidroksimetil) aminometan, amino asit tamponları gibi primer aminler *o*-fitalaldehit ile reaksiyon verdiği için ortamdan uzaklaştırılmalıdır. OPA genellikle 2-merkaptolanol varlığında ve pH 9,5' te peptit ve proteinlerin primer amin gruplarıyla oldukça floresans bileşikler olan izoindoller meydana getirir. Bir florimetre kullanılarak standart çözeltilerin ve örneğin 340 nm'deki uyarma dalga boyu ve 440-455 nm' deki emisyon dalga boyunda floresans şiddetleri belirlenir.

2.2. HPLC Sistemi ve Kromatografik Protein Ayrımı

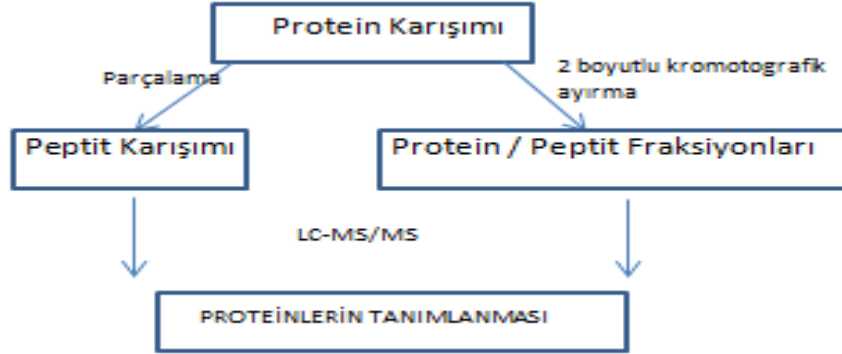
1970'lerden günümüze, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniği, laboratuarlarda organik maddeler için ayırma, analiz ve saflaştırmanın vazgeçilmez seçeneği olmuştur. HPLC kolonu neredeyse tüm karışımları ayırabilir. HPLC günümüzde geniş çaplı molekül analiz ve saflaştırmalarında öncü teknik olarak tam yer edinmiştir. HPLC özellikle de peptit ve proteinlerin karakterizasyonunda merkezi teknik olmuş ve biyolojik ve biyomedikal bilimlerde son on yıldır çok hızlı sağlanan ilerlemede kritik roller üstlenmiştir. Peptit ve proteinler kromatografik yüzeye yöne özgül davranışlar gösterir. Bunların gecikme süresi özgün bağlanma alanlarının yoğunluğuyla belirlenir.

İkincil ve üçüncül yapıyı gösteren büyük proteinler için kromatografik temas alanları toplam molekülün çok küçük bir kısmıdır. Bu nedenle peptit ya da proteinin, özel sabit faz yüzeyinde özgün yönelme yapması, HPLC sayesinde çok seçici hale getirilebilir.

Ters faz HPLC'nin aksine, iyon değişim ve hidrofobik etkileşim kromatografileri peptit ve proteinleri yüzey yük ve hidrofobiklik farkına göre ayırır. Bu teknikler karmaşık karışımlarında ayrılmasını sağlarken affinite kromatografisi bir ya da az sayıdaki birbirine benzer bileşenli karışımları ayırabilir. Sentetik peptitler için RPC (ters faz kromatografisi) genelde analizin ilk aşamalarında ve son olarak büyük çaplı saflaştırmada kullanılır. Biyolojik örneklerden elde edilen proteinler ise daha homojen örnekler kazanmak için başka tekniklerin yardımını gerektirir.

Ters faz kromatografisi (RPC), iyon değiştirici kromatografi (IEC) ve boyut dışlama kromatografisiyle (SEC) beraber peptitlerin ayırımında en fazla kullanılan tekniktir. RPC tekniğinde üç boyutlu protein yapıları sağlanan şartlar altında bozulabilir bu nedenlerde RPC ile işlevi korunmak istenen proteinler saflaştırılmaz. Burada devreye IEC, SEC ve affinite kromatografileri girmektedir. Proteinlerin HPLC ile dedeksiyonunda özellikle protein fragmentlerinin analizinde en çok MS dedektörlerinden yararlanılır. Türevlendirilerek floresans özellik kazandırılıp floresans dedektörle de analiz edilmektedirler (Şekil 2.4). MS kromatografisi, florometrik denemelerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için substrat ya da ürünün doğrudan ölçülmesinde tercih edilir. Eğer birlikte elue olan bileşikler mevcutsa hem enzimatik aktivite denemesi yapılır hem de aktif bileşikler eş zamanlı incelenerek tanımlanabilir. Fosfat ve Tris gibi uçucu olmayan tamponlar iyon kaynağına kontaminasyon yapacağından MS için uygun değilken amonyum bikarbonat gibi uçucu tamponlar uygundur (De Jong vd., 2006).

SEC-HPLC-MS/MS metodu ligandın hedef proteinlerle bağlanan aktif bileşenlerinin taranması uygulamasında geniş olarak kullanılmaktadır (Flarakos vd., 2005).



Şekil 2.4. Kromatografik tabanlı yaklaşımla protein tanımlama (Flarakos vd., 2005).

2.2.1. Ters Faz (Reverse Phase (RP)) HPLC Kromatografisi ile Protein Ayrımı

Ters faz kromatografisi (RPC) en yaygın sıvı kromatografisi haline gelmiştir. Burada sabit faz apolar, hareketli faz polardır. Analitler yüzeye apolar fonksiyon gösteren gruplarıyla bağlanırlar. En polar analit kolondan ilk önce çıkar. Küçük moleküllerin analizinde çoğunlukla ilk tercih edilen peptid analizleri için kısmen kullanılabilen baskın HPLC tekniğidir (Grotefend vd., 2012).

RP-HPLC kromatografisi orta-yüksek polarlığa sahip analitler için gayet kullanışlıdır. Ters faz ayırma tekniği, örnek ile apolar bağlanma fazı ve polar sabit faz arasında basit ayrılma olmasına dayanır. En polar örnek bileşenleri, apolar bileşiklerin apolar kolon paketiyle gecikmesine dayalı olarak en önce gelmelidir. Fakat pratikte bu kadar olmaz.

En ileri “end-capped” kolonlarda bile altta bulunan anyonik silika işe karışır ve ayırmayı etkiler. Polimer temelli kolonlarla karşılaştırıldığında diğer kolonların ulaşamayacağı ayırımları yapan kolona bu özelliğini silika verir. Silika ters faz kolonu yaşlandıkça daha çok silika bölgesinin hidrolizle serbest kalmasından dolayı, koşma karakteristikleri değişir.

Ters faz HPLC’de silika temelli C₁₈ ya da C₈ kolonlar ile 150 ya da 300 Å por boyutu kullanılmaktadır. Protein analizleri için daha az hidrofobiklikte C₄ kolon uygulamaları da vardır (Geng ve Regnier, 1984).

2.2.2. Boyut Dışarılama (Size Exclusion (SEC)) HPLC Kromatografisi ile Protein Ayrımı

Boyut dışlama HPLC genellikle peptit/protein ayırımları ve moleküler ağırlık analizleri için kullanılır. Denaturant varlığı veya yokluğunda, üçüncül veya dördüncül yapılar moleküler ağırlığı analizleriyle gösterilebilir. Bazı uygulamalar ideal SEC davranışlarını gerektirir ve ayırımlar sadece çözelti boyutuna dayanır.

Ama en yeni HP SEC kolonları, uzun ya da kısa boyutlarda ve anyoniktir. İstenmeyen elektrostatik etkileşimler engellenmezse, bazı özellikler, artı yüklü peptit yan zincirleriyle etkileşimlere neden olur. Elüentin iyonik gücünün üstünde, elektrostatik etkiler en aza indirildiği için, 0,1-0,4 M tuz içeren sıvı fosfat tamponları (pH 5,0-7,5) SEC ile peptit ve protein analizinde hareketli faz olarak kullanılır.

Ayrırma mekanizması entropi etkisi temellidir. Bu yüzden ideal olarak analit ile kolon arasında adsorptif etkileşimler yoktur (Kromidas, 2007).

Elektrostatik etkileşimler baskın etken olduğunda tuz konsantrasyonları çok yüksek ise, peptit-protein veya protein-protein etkileşimleri engellenir (Arakawa vd., 2010). Bu ikincil etkileşimleri azaltır ve pik simetrisi, alıkonma zamanı ve miktarını geliştirir (Ricker ve Sandoval, 1996). Ayrıca ikincil etkileşimleri azaltmak için hareketli faza arjinin gibi organik modifiye ediciler sıklıkla katılmaktadır. Bu agregat geri kazanımını arttırmaktadır (Arakawa vd., 2006). Farklı kolon materyalleri istenilmeyen kolon davranışlarının görülmesine neden olabilir.

SEC biyoterapötik peptid ve proteinler için rutin analizlerde çok geniş olarak uygulanmaktadır (Hong vd., 2012). Son yıllarda biyoterapötiklerin sayısı önemli derecede arttı. Bu da boyut dışarılama kromatografisine olan ilgiyi yeniledi. Bunun yanında yaygın kullanılan teknikler asimetrik akış alan akış fraksiyonlama, çok açılı ışık dağıtımı teknikleridir.

Lindqvist ve Storgards 1955'te boyut dışarılamayla nişasta doldurulmuş bir kolonda amino asitlerden peptidlerin ayrılmasında biyomolekül ayırımını ilk kez uyguladı. Yau W.W. ve arkadaşları tarafından 1978'de moleküler ağırlık aralığı ve kalibrasyon eğrisinin eğiminin kolon paketleme matrisine bağlı olduğunu buldu. Por boyutu ya da geometrisi stokes yarıçapı temelli molekülleri sınırlandırır. 2 µm'nin altında partikül çapı olan SEC kolonlar UPLC sistemlerinde koşturma zamanını 2 kat azaltmaktadır.

Büyük proteinler porlardan ilk elue edilirler. Çünkü daha küçük proteinler iç porlara geçerken daha büyükler geçemez. Bu yüzden SEC ayırma yeteneği molekülün boyut,

hidrodinamik çap ve şekline bağlıdır. Proteinlerin şekillerinde farklılıklar olduğu için (globüler vs.) onların stokes yarıçapı moleküler ağırlıkla tam korelasyon vermez. Kütle spektrometresi artan oranda molar kütle belirlemede kullanılmasına rağmen, SEC daha ucuz olduğu için protein agregat belirlemede ilk tercih edilmektedir (Bond vd., 2010).

Boyut dışarılama kromatografisinde akış hızı düşürülerek optimum kolon etkisi sağlanırken analiz zamanı düşer, pik genişlemesi olur ve duyarlılık düşer. 100 µL'den büyük enjeksiyonlar rezolüsyonu düşürür (Ricker ve Sandoval, 1996).

2.2.3. İyon Değişirme (Ion Exchange (IEC)) ve Hidrofobik Etkileşim (HIC) HPLC Kromatografileri ile Protein Ayrımı

İyon değiştiriciler ister anyon ister katyon değiştirici olsun; tamponun pH'sı, kullanılan anyon veya katyon değiştiricinin doğal iyonik gücü ve peptitlerin yükü proteinlerin gecikme zamanlarını etkiler.

En yaygın olarak sodyum veya potasyum iyonları katyon olarak, klor iyonları da anyon olarak kullanılır. HP-IEC kolonları yüksek derecede pik genişlemesi veya elüsyon olmama durumu gösteren, peptitlerin apolar kalıntılarının neden olduğu hidrofobik karakteristikler gösterirler. Bu durum hareketli faza organik düzenleyici konulmasıyla giderilebilir.

HPLC'de iyon değişim; güçlü anyon değişim ya da zayıf katyon değişim kromatografisi şeklinde olabilir. Güçlü anyon değiştiricide alıkonma mekanizması uygun pH seçiminin önemini açıklayan çevrili ortamın yükü kadar protein yüzeyinin yüküne bağlıdır. Monolitik kolon yapısı analiz zamanını önemli derecede azaltır (Eeltink vd., 2009). HPLC ile zayıf katyon değişim kromatografisi ise; bugün özellikle monoklonal antikörlerin analizinde uygulanmaktadır. Ayrım için pH, proteinin net yüzey yükü önemlidir (Rea vd, 2011).

Proteinlerin yüzey hidrofobisitesine göre ayrıldığı büyük örnek hacmi ve protein miktarlarıyla çalışılabildiği matriksin dayanıklı olduğu kromatografi hidrofobik etkileşim kromatografisidir.

İyon değişim (IEC), hidrofobik etkileşim (HIC) ve ters faz (RP) kromatografileri birlikte tekniğe ait bazı karakteristik özellikler (rezolüsyon, kapasite, hız gibi) ve çalışılacak proteindeki başlangıç özellikleri ve çalışıldıktan sonraki özellikleri ile Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Kromotografik yöntemlerin karşılaştırılması (Kromidas, 2007).

Teknik	Karakteristik	Örnek Başlangıç Koşulları	Örnek Son Koşulları
IEC	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek ayırım • Yüksek kapasite • Yüksek hız 	<ul style="list-style-type: none"> • Düşük iyonik şiddet • Örnek hacmi sınırlı değil 	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek iyonik şiddet • pH değişimi konsantre
HIC	<ul style="list-style-type: none"> • İyi ayırım • İyi kapasite • Yüksek hız 	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek iyonik şiddet • Örnek hacmi sınırlı değil 	<ul style="list-style-type: none"> • Düşük iyonik şiddet
RPC	<ul style="list-style-type: none"> • Yüksek ayırım 	<ul style="list-style-type: none"> • Organik çözügen gereksinimi 	<ul style="list-style-type: none"> • Biyolojik aktivite kaybı riski

2.3. HPLC Dedektör Çeşitleri ve Protein Dedeksiyonu

Ultraviyole / Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet / Visible dedector – UV / VIS): Dedeksiyonda Lambert-Beer yasası geçerlidir. Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür.

Pek çok organik molekül ve fonksiyonel grup 190 nm'den 800 nm'ye kadar olan ultraviyole (UV) ve/veya görünür (VIS) alanda elektromagnetik enerji absorplar. Çözeltiden sürekli olarak ışın geçerken analitler tarafından ışının bir kısmı absorbe edilebilir. HPLC UV absorpsiyon dedektörleri 2 ila 5 µL kapasitesi olan kısa silindirik hücreden oluşur. Hücreden geçen UV ışık fotoelektrik hücreden geçer ve sinyal yükselticide dönüştürülür ve sistem tarafından kaydedilir. Dedektör duyarlılığı ekstinksiyon katsayısı ve hücre uzunluğu değeriyle orantılıdır.

UV dedektör sensörlerinin 1 ile 10 mm arası uzunluğu ve 0,5 ile 2 mm arası iç çapı vardır. UV dedektörler dalga boyu aralığında önemli absorpsiyon göstermeyen çözücülerle (su, metanol, asetonitril ve tetrahidrofuran) gradient elüsyonla kullanılabilir. Tek dalga boyunda ışık veren düşük basınç cıva, kadmiyum ve çinko lambalar kullanılan (sırasıyla 254 nm, 225 nm, 214 nm) UV dedektörler de vardır (Scott, 1996).

Işın bir prizmanın içinden geçtiğinde bir spektrum üretilir ve bu absorpsiyon spektrumu olarak adlandırılır. Bir enerji absorpsiyonunun sonucu olarak atomlar ve moleküller düşük enerjili seviyeden (başlangıç ya da temel hal) daha yüksek bir seviyeye (uyarılmış hal) geçer. Kromofor grup içeren maddelerde Vis dedeksiyon tercih edilir.

Absorbe edilen elektromagnetik enerji uyarılmış ve temel haller arasındaki enerji farkına eşittir (Jaff ve Orchin, 1963). Tipik UV-VIS spektrofotometre, bir ışık kaynağı, bir monokromator, bir dedeksiyon hücresi ve bir dedektör içerir.

Fotodiyot Array Dedektörü (Photodiode array dedector: PDA veya DAD): UV-Vis dedektörden farkı, 512 elementten oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga boyundaki absorbanı eş zamanlı olarak ölçülmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.

Işık bütün dalga boylarında döteryum lambada üretilir, hücreden geçer ve yüzlerce diyot arasında dağılır. Işık numune hücresinin içindeki akromatik lenslere odaklıdır.

Holografik çevrimle çevrilir. Her diodtan çıkan ışık bilgisayarla kaydedilir (Scott, 1996).

Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD): Organik maddelerin yaklaşık % 15'i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı ksenon lamba olup, duyarlılığı UV-VIS dedektöre göre yaklaşık 10^3 kat fazladır. Floresans dedeksiyonda küresel ve elipsoid aynalarla ışık kırılır.

Fotoelektrik hücreden geçen ışık şiddeti moniterize edilir (Scott, 1996). Diress ve arkadaşları 2010'da proteinler için duyarlılığı ve seçiciliği arttırmada floresans dedeksiyonunu kullandı.

İletkenlik Dedektörü (Conductivity dedector-CDD): Mobil fazın iletkenliği maddelerin yükseltgenmesi ya da indirgenmesiyle ölçülür. Daha çok anyon ve kation analizlerinde kullanılır. Sıcaklık kontrolü çok önemlidir bu sebeple kolon fırını içerisinde çalışmalıdır. Kullanılan mobil fazın iletkenliği ne denli düşük olursa oluşan gürültü de o denli düşük olur. LC'de iyonik türlerin dedeksiyonunda kullanılır (Scott, 1996).

Refraktif İndeks Dedektörü (Refractive index dedector-RID): Kırılma indisi ölçülür. Sıcaklıktan etkilenir. Örnek bileşenlerinin bulunduğu ortamda yoğunluk artacağından gelen ışık kırılarak hücreyi terkeder. Işığın ölçülen kırılma oranından (kırılma indisi) kantitatif tayin yapılır. Yaygın kullanılan dedektörlerin en az duyarlılığı olanıdır. Amyant sıcaklığı, basınç, akış hızı değişikliklerine çok duyarlıdır. İyonik olmayan bileşiklerin dedeksiyonunda kullanılır (Scott, 1996).

Elektrokimyasal Dedektör (Electrochemical dedector-ECD): Elektroaktif maddeler analizlenebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya

indirgenabilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır (Scott, 1996).

Kütle Dedektörü (Mass dedector-MS): Yüksek-performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometri (HPLC-MS) oldukça çok yönlü bir enstrümantal tekniktir. HPLC-MS'in GC-MS'e nispeten başlıca avantajı çok daha geniş bir yelpazede bileşiklerin analizini gerçekleştirebilme kapasitesine sahip olmasıdır. Yüksek polarite gösteren veya yüksek molekül ağırlıklı termal olarak kararsız bileşikler hatta proteinler bile rutin şekilde HPLC-MS kullanılarak tamamen analiz edilebilirler. Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür.

Temel enstrüman örnek girişi (bir sıvı kromatografisi), iyonlaşma bölümü, kütle analizcisi ve dedektör içerir. MS dedeksiyonu için safsızlık ve bileşik yıkım problemi önemlidir. MS bileşiklerin yapı bilgisini de verir (Shi vd., 2009).

Seçilen reaksiyon takibi ya da çoklu reaksiyon takibi ve miktar hesabı için takdir gören bir tekniktir. Kompleks matrislerde üçlü kuadropol kütle spektrometresi kullanılır ve bu da seçilen proteinin miktar hesabı için hedef proteinin proteolitik sindirimini gerektirir (Hortin vd., 2010).

Boyut dışarılama kromatografisi ile MS dedeksiyonu mobil fazlar açısından çalışmaktadır. Boyut dışarılama kromatografisi mobil fazları fizyolojik pH'da denatüre etmeyen sulu çözeltiler MS'te kontaminasyon ve iyon baskılaması yapmaktadır. MS'te ise denatüre etmeyen ama fizyolojik şart sağlamayan amonyum format/asetat kullanılır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için iyon çifti içeren organik çözücüler kullanılır (Chakraborty vd., 2011; Liu vd., 2009).

Evaporatif Işık Dağıtıcı Dedektör (Evaporative lighth scattering dedector-ELSD) : Proteinlerin şekil ve boyutunu, molekül ağırlığını belirlemede çoklu ışık dağıtım dedektörleri kullanılmaktadır. Yalnızca protein bilgisini değil aynı zamanda onların dimer bilgisini de verirler. UV dedektörden daha duyarlıdır.

Atomize gazla hava ya da inert bir ortamda küçük damlacıklar halinde sprey şeklinde dağılan eluent buharlaştırılır ve üzerine ışık 45° lik açılarla gönderilir ve dağılan ışık optik fiberlerden geçip fotoçoğaltıcıda toplatılır ve elektronik olarak bilgisayarda kaydedilir. Kütle dedektörlerinde kullanılır.

Bu dedektörlerin dışında dedektörlerin çift ya da üç fonksiyonlu olanları da vardır. Örneğin; floresans, UV, elektriksel iletkenlik ölçme özelliği bir arada olan gibi (Scott, 1996).

2.4. Akış Enjeksiyon Sistemi

Akış enjeksiyon analizi kavramıyla ilk kez 1975'te tanışıldı ve 1981 yılında ilk monograf lar yayınlandı. Sekans enjeksiyonu akış programlanması bilgisayar ortamında yapıldı ve 'lab on valve' şeklinde minyatürize edildi. Enjeksiyonun olduğu inert bir reaktifin taşıyıcı bir ortamla reaksiyonu sonucu sinyal kaydedilerek eş zamanlı dedeksiyon sağlanmıştır.

Bu da ilk olarak klorat, fosfat, silikat gibi iyonlarının on-line belirlenmesi ve ardından kompleks matrislerde düşük seviyedeki metallerin belirlenmesinde atomik absorpsiyonda kullanıldı. Amonyum sitrat tamponunun taşıyıcı olarak kullanıldığı şırınga pompalardan metanol eluent olarak gönderilerek atomik absorpsiyon spektrometrisinde dimetilglioksimle çöktürülerek on-line nikel dedeksiyonu yapıldı. Ayrıca katı destek üzerinde protein immobilizasyonu yapıldı (Hansen ve Miró, 2007; Ruzicka ve Hansen, 2008).

Akış enjeksiyon sistemi ile protein denemeleri de yapıldı ve mini immüno afinite kromatografik kolon kullanılarak spesifik proteoglikanların on-line denemesi yapıldı (Hartwell vd., 2007). Buradaki akış enjeksiyon sistemi, bir peristaltik pompa, çok fonksiyonlu valf, reaksiyon sarmalı, akış hücreli UV-Vis spektrofotometre ve bir bilgi kaydedici içeren sistemdir (Liang ve Li, 2013). Kolorimetrik Biüret ve Bradford protein tayin yöntemleri de akış enjeksiyon sistemine bu şekilde adapte edilip uygulanmıştır (Recktenwald vd., 1985). Akış enjeksiyon sistemiyle ilgili son on yılda 300 orijinal makale basıldı (Trojanowicz ve Kołacińska, 2016).

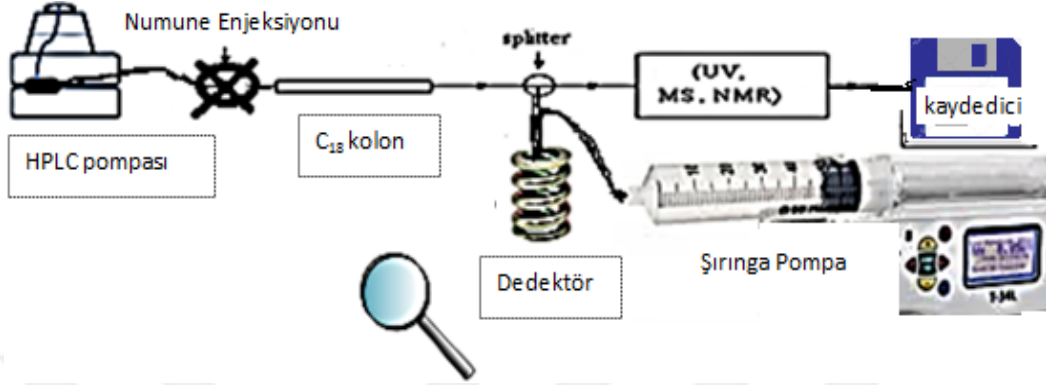
2.5. On-line HPLC Sistemleri

On-line metodun çeşitli avantajları vardır; matris etkileri azaltılır, biyokimyasal denemenin tekrarlanabilirliği geliştirilir, aktivitenin hızlı belirlenmesi ve aktif bileşenlerin yapısal tanımlaması sağlanır.

Genel olarak on-line biyoaktivite (antioksidan aktivite) ve on-line enzim çalışmaları (enzim inhibisyonu) mevcuttur.

HPLC sistemine on-line olarak tübing sistemiyle bağlı şırınga pompa sistemiyle DPPH, ABTS gibi reaktiflerin gönderilmesiyle sırasıyla 515 ve 734 nm lerde HPLC-UV dedeksiyonla eş zamanlı olarak negatif pik şeklinde kromatogram alınarak antioksidan aktiviteler belirlenebilir (Shi vd., 2009) (Şekil 2.5).

Bir çalışmada on-line HPLC sistemiyle 3 farklı antioksidan metodu (on-line DPPH, ABTS ve FRAP) karşılaştırılarak bitki ekstraktlarında eş zamanlı dedeksiyon sağlanmıştır (Arslan Burnaz vd., 2017).



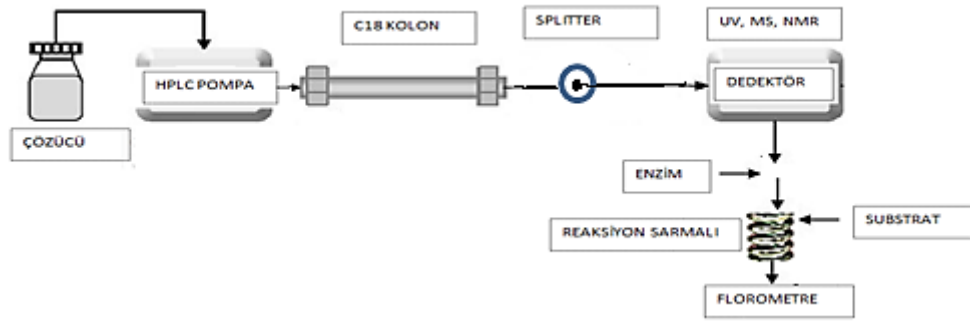
Şekil 2.5. On-line HPLC antioksidan aktivite tayin sistemi (Shi vd., 2009).

On-line deneyler dedektör uygulamalarına göre 3 tip olabilir: kolorimetrik, florometrik dedeksiyonlar ve kütle spektrometresi dedeksiyonları.

On-line asetilkolin estera zenzim inhibisyonu çalışmasında reaktifler aralıksız karıştırıldığında 405 nm’de sarı ürün, 5-tiyo-2-nitrobenzoat saptanır. Eğer sisteme asetilkolin estera z için bir inhibitör ilave edilirse negatif pikler görülür. Burada mobil faz kompozisyonu önemlidir. Florometrik metotlar sadece daha hassas oldukları için değil aynı zamanda birçok durumda enzim-inhibisyon aktivitesini belirlemede daha spesifik olduklarından çokça tercih edilmeye başlanmıştır (Shi vd., 2009) (Şekil 2.6).

Rhee ve arkadaşları tarafından 2003’te asetilkolin estera z inhibitörleri taraması için on-line metod geliştirildi. De Boer ve arkadaşları tarafından 2004’te kolon sonrası metod geliştirilerek elektrosprey iyonlaşması yapılmış ve MS’le kaptensin B inhibitörleri için aktif bileşenler eş zamanlı belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada da on-line HPLC reseptör afinite dedeksiyon sistemiyle östrojen reseptörleri için bitki ekstrakt taraması yapıldı (Schobel vd., 2001).



Şekil 2.6. Florometrik metotla on-line enzim aktivite ölçümü (Shi vd., 2009).

2.6. On-line Teknikler ve LC-MS Uygulamaları

Son yıllarda bir seri numune hazırlama teknikleri biyofarmasötik analizler için on-line olarak LC-MS'le kombine edildiler. Bu teknikler katı faz ekstraksiyon, katı faz mikro ekstraksiyon teknolojisi, kolon açma teknolojisi, sınırlandırılmış aşırı materyal tekniği, türbülans akış kromatografisi, moleküler baskılama teknolojisi ve mikro diyalizdir. On-line katı faz-LC-MS tekniği plazma, serum ve doku homojenatları gibi komplike matrislerin analizinde geniş oranda kullanılmaktadır. İnsan plazmasında izoflavonoid ilaç için LC-MS'le hızlı, otomatik metotla on-line katı faz ekstraksiyonu başarıyla uygulanmıştır (Wang vd., 2008).

1990 yılında Pawliszyn tarafından katı faz mikro ekstraksiyon tekniği bulundu. Son yıllarda yüksek polariteli uçucu olmayan ya da düşük uçuculukta biyofarmasötiklerin analizinde LC-MS'le katı faz mikro ekstraksiyon kombine çalışmaları mevcuttur. Aktif katı yüzey ile analitler arası adsorpsiyon afinitesini kullanır. Bir çalışmada katı faz mikro ekstraksiyon membrane tekniğiyle LC-MS kombine edilerek biyolojik numunelerde kanabinoid konsantrasyonu belirlendi (Yang vd., 2006).

Kolon açma tekniği ise; mobil faz sistemini değiştirmek için bir valf kullanır, elüent ön kolondan analitik kolona on-line bağlantıyla geçer. Kolon açma tekniği gıda, pestisit analizi yanında büyük oranda biyofarmasötik analizlerde kullanılır. HPLC'ye doğrudan enjekte edilemeyen proteince zengin serum numunelerinden on-line protein uzaklaştırma işlemi ve ayrıca on-line türevlendirme ve saflaştırmada kullanılır. Bu teknik LC-MS/MS'le kombine edilip insan serumunda testesteron miktarının belirlenmesinde kullanıldı (Borrey vd., 2007).

Sınırlandırılmış aşırı materyal tekniği Desilets ve arkadaşları tarafından 1991’de ortaya atıldı. Küçük moleküllerin biyo temelli analizi için uygundur ve boyut dışarılama prensip temellidir. Adsorbentlerin yapı ve özelliklerine göre 5 tipi vardır: iç yüzeyi ters faz paketleme materyali, yan yüzeyi yarı geçirgen, tabaka hidrofobik faz, protein kaplı silica C₁₈ ve karışık fonksiyonlu şeklindedir. Kompleks biyolojik matrislerde ilaç moleküllerinin analizinde büyük oranda uygulanmıştır. Kütle spektrofotometrenin atmosferik basınç iyonlaşma teknikleri ile kombine uygulaması vardır. Zhang ve arkadaşları 2013’te HPLC ile bu tekniği on-line zenginleştirmede kullandı.

Türbülans akış kromatografisi tekniği 1997’de Quinn ve Takarewski tarafından geliştirildi. Yüksek akış hızı analizine izin veren büyük partikül boyutlu adsorpsiyon materyali kullanıldı. Ynddal ve Hansen 2003’te metanol ve formik asit gradient elüsyonu ve TOF-MS kullanarak dekstrometofan ve onun metabolitlerini bu yöntemle belirledi.

Moleküler baskılama tekniği temel prensibinde ilk adım fonksiyonel monomerlerin kovalent ya da kovalent olmayan tersinir etkileşimle çözücüde sabit karışım oluşturmalarıdır. 2. adım ise; çapraz bağlayıcıyı çözücüye ekleyip polimerizasyon reaksiyonunu UV ışıkla başlatmaktır. 3. adım elüsyonla kopolimerde 3 boyutlu çukur oluşturmaktır.

Mikro diyaliz tekniği *in vivo* numune tekniğidir ve hayvan ve insan dokularındaki aktif maddelerin seviyeleri fizyolojik seviyelerde izlenir. Wang ve arkadaşları 2012’de sıçanda tetra hidropalmitin belirlenmesi için mikro diyaliz LC-MS’i kullandı.

2.7. On-line HPLC Protein Sisteminin Avantajları ve Dezavantajları

- Eş zamanlı ayırım ve dedeksiyon avantajı,
- Dedeksiyonun basınç farkı değişimleri ve elektriksel sinyallerden etkilenmesi dezavantajı,
- Tubing gecikmesinin reaksiyon süresi açısından uyumlu olması dezavantajı,
- MS dedeksiyonuna göre ucuz olması avantajı,
- Spektrofotometrik uygulanabilen her çeşit reaktifin kullanılabilmesi avantajı vardır.
- On-line SEC-HPLC analizinde yüksek tuz konsantrasyonunu mobil fazda kullanmak kolon performansını etkileyen partikül oluşum potansiyelini arttırır.
- Yüksek oranda sulu hareketli faz saatler içerisinde bakteriyel bulaşmaya sebep olabilir. Sodium azid kısmen bakteriyosittir.

- Boyut dışarılama HPLC’de pik genişlemesi diğer kromatografik modlardan önemli derecede daha azdır.
- Düşük iç çaplı ve uzunluklu tübing kullanılarak ayırımın negatif etkilenmesi minimize edilir (Grznarora vd., 2004).

2.8. Protein Bileşiminin Amino Asit İçeriğinin Dedeksiyona Etkisi

Mevcut spektrofotometrik protein yöntemlerinden amino asit bileşimine bağlı (sistein, triptofan, tirozin) 280 nm’deki yöntemin yanında bazik amino asitlerce (lizin, histidin, arjinin) zengin proteinlerde yüksek dedeksiyon veren Bradford yönteminde dedeksiyon duyarlılığının yüksek çıkmasında da amino asit kompozisyonu etkilidir (Keun Ku vd., 2013).

Tablo 2.2. Bazı proteinlerin amino asit içeriği

Protein	İzolasyon Kaynağı	Amino asit içeriği							Toplam amino asit	Ma (kD)
		W	Y	F	C	R	H	K		
BSA	Bovine	3	20	28	35	26	17	59	607	66,4
BCA	Bovine	6	7	11	1	8	11	17	261	28,8
Protrombin	Homo sapiens	14	20	19	19	43	13	29	622	70
Keratin	Homo sapiens	3	9	6	33	20	4	13	431	48,1
Taq DNA Polimeraz	Thermus aquaticus	14	24	25	0	74	16	41	832	93,9
DNA Primaz	Escherichia coli	3	16	24	6	42	11	21	581	65,5
İmmunoglobulin G	Homo sapiens	10	10	11	6	18	11	18	374	42,6
Transferrin	Homo sapiens	10	23	44	7	30	12	48	760	84,8
Protamin	Homo sapiens	0	2	0	5	29	14	1	102	13
Arjinino süksinat liyaz	Homo sapiens	10	8	15	5	28	11	17	464	51,6
Jelatin	Bos taurus (Bovine)	0	1	9	0	29	3	17	608	45
İnsülin	Homo sapiens	0	4	3	3	5	2	2	110	5,734

W:Triptofan, Y: Tirozin, F: Fenilalanin, C: Sistein, R: Arginin, H: Histidin, K: Lizin

3. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Mevcut spektrofotometrik protein tayin yöntemlerinden en çok kullanılanlarının pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, tayin limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ), ölçüm dalga boyu, gibi özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 3.1.' de özetlenerek on-line HPLC sisteminde protein deteksiyonuna en hızlı cevap veren ve en duyarlı olan yöntemlerin hangileri olabileceği araştırılmıştır (Chutipongtanate vd., 2012; Ratanawimarnwong vd., 2012; Wei vd., 2005; Zaia vd., 1999; Sözgen vd., 2006; Okutucu vd., 2007; Qin vd., 2006).

Ardından bu yöntemlerden on-line uygulama açısından uygun olanlar (HPLC-Biüret, HPLC-Ninhidrin, HPLC-Bradford) HPLC'ye adapte edilmiştir. Bunlardan da en uygun olanı (HPLC-Bradford) seçilip önce optimizasyonu ardından da tayin ve tespit sınırları belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Mevcut spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması

Yöntem	LODx10 ⁻² (mg / mL)	LOQx10 ⁻² (mg / mL)	Karışım Oranı (Numune:R eaktif)	Dalga Boyu (nm)	pH	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Mekanizma	Referans
Doğrudan 205 nm	1.2	19.5	-	205	-	-	-	Peptit bağı	Chutipon gtanate vd., 2012
Doğrudan 280 nm	4.9	1250	-	280	-	-	-	Aromatik amino asitlerle	Chutipon gtanate vd., 2012
BCA	2.4	312.5	1:20	562	alkali	30	37	Disülfür bağı	Chutipon gtanate vd., 2012
Biüret	39.1	10000	1:50	540	14	10	-	Peptit bağı	Chutipon gtanate vd., 2012
Bradford	0.6	10000	4:1	595	1,1-1,2	2-5	-	Hidrofobik ve iyonik etkileşim	Chutipon gtanate vd., 2012
Lowry	1.2	312.5	1:11	550	alkali	40	-	Tirosin ve triptofana spesifik	Chutipon gtanate vd., 2012
Ninhidrin	0.6	78.1	1:1	570	5.5	15	Yüksek	Serbest amino grunuyla reaksiyon	Chutipon gtanate vd., 2012
Tetrabromofenol	0.053	0.175	1:3	625	3.2	1.5	-	Boya bağlama	Ratanawi mamwon g vd., 2012
Dibromometilkarbo ksi azo Pb(II)	1.5	-	1:1	530	1.8	2	25	Peptit bağı	Qin vd., 2015
p-kloranil	0.125	-	1:200	360	8	5	37	Toplam protein	Zaia vd., 1999
Cu(II) Neokuproin	0.1	0.3	0.5:5	450	alkali	30	40	Peptit bağı, sistein, triptofan, tirosin	Sözgen vd., 2006
Amido Black	3	-	1:1	615	hafif alkali	-	25	Proteinlerin çöktürülmesi	Okutucu vd., 2007

3.1. Malzeme ve Yöntem

Bütün kullanılan malzemeler HPLC cihaz sistemine uygun saflıktadırlar. Proteinler, gerek gıda endüstrisi, gerek ilaç endüstrisi ve gerekse biyoteknolojik üretim amaçlı olsun dozajın dikkate alınmasını gerektiren ve bunun için de kalitatif dedeksiyonun yanında kantitatif dedeksiyonu zorunlu kılan hassas tayin ölçekli cihazları gerektiren önemli moleküllerdir. Protein tayinlerinde büyük oranda spektrofotometreler kullanılır.

280 nm'deki spesifik dalga boyundaki absorbanstan yaygın olarak yararlanır. Fakat bu yöntem sadece sistein, tirozin ve triptofan amino asitlerini içeren proteinlere uygulanabilmektedir. Bu sorunun çözümü için proteinlerdeki peptid bağına dayalı yöntemler geliştirilmiş, tayin için kullanılan farklı reaktiflerin proteinle olan reaksiyonları sonucu oluşturdukları farklı ürünlerin spesifik dalga boylarından da yararlanılmıştır. Bu yöntemler numunedeki proteinlerin tamamını ölçmektedir.

Spektrofotometrik yöntemler gelişmiş ayırım ve tayini bir arada yapabilen HPLC cihazları ile kombine edilmiştir. Hatta TOF-MS gibi gelişmiş MS dedeksiyon sistemine sahip kütle fragmentasyonu ile protein miktarı ve yapısı bilgisi veren sistemler de mevcuttur (Caira vd., 2013).

MS sistemi hem daha pahalı hem de protein miktarıyla ilgili net, tam bir bilgi verememektedir. Hatta son gelişmelerde indüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi tekniği olan ICP-MS'in HPLC ile kombine uygulamalarında protein ve peptidlere organik civa, iyot, ferrosen ve makrosiklik metal şelat kompleks etiketleri takılarak HPLC-ICP-MS dedeksiyonu çalışmaları yapılmıştır ve femto ve atto seviyelerinde duyarlılık derecelerine inilmesine rağmen birçok açıdan dezavantajları da vardır. Örneğin; civa atomları toksiktir, iyodun yalnızca % 29'u argon plazmada iyonlaşabilir, ferrosen izobarik oluşuma neden olur ve ⁵⁶Fe izotopunun rezolüsyonu düşüktür (He vd., 2014). Bu açıdan peptid bağı üzerinden sinyal ölçümünün önemli olduğu daha kantitatif dedeksiyon yöntemlerinin HPLC sisteminde kullanılması gereklidir. On-line HPLC-DAD-UV protein analizi, eş zamanlı olarak proteinlerin ayrılması ve miktarı tayin metodolojisi 280 nm'deki yarı kantitatif yöntemle göre daha duyarlı ve peptid bağı üzerinden ölçen ve farklı matrislerin HPLC ile protein ayırımının yapılmasına ve ardından hızlı ve kesin bir metodolojik ölçüme imkan veren teşhis, tanı ve üretim açısından önem arz edebilecek bir sistemdir.

Mevcut spektrofotometrik uygulamaların on-line HPLC sistemine adaptasyonu ile ilgili literatürde çalışma olmamasına rağmen on-line protein uygulamaları mevcuttur. Örneğin on-line sistemle OPA (o-phtaldialdehyde) türevi oluşturularak floresans dedektörle protein dedeksiyonu çalışmaları mevcuttur (Bartolome vd., 1997; Yang vd., 1999). Ayrıca HPLC protein ayırımında farklı kolonlardan (boyut dışarılama, C₁₈, iyon değişimi, afinite gibi) yararlanılmaktadır (Grotefenda vd., 2012).

Örneğin Nordqvist P. ve arkadaşlarının 2013'te yaptıkları bir çalışmada boyut dışarılama kolonuyla HPLC'de un ısıl işlem görmüş ya da hidroliz edilmiş un gluten proteininin karakterizasyonu SDS'li fosfat tamponu ile ekstraksiyon sonrası % 0.1 trifloroasetik asit: % 50 asetronitril izokratik elüsyonuyla yapılmıştır (Nordqvista vd. 2013).

Ayrıca Wang S. ve Raghani A. tarafından 2014'te yapılan başka bir çalışmada monoklonal antikor agregatlarının kromatografik analizinde de boyut dışarılama kolonu ve elüsyonda pH 7,0 fosfat tamponu kullanılmıştır (Wang ve Raghani, 2014). On-line protein tayini denemelerine öncelikli olarak boyut dışarılama kolonuyla başlandı ve protein tayini olarak biüret, ninhidrin ve bradford yöntemlerinin HPLC adaptasyonunu denendi.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada boyut dışarılama (Zorbax GF-450, 6 µm, 9.4 x 250 mm) kolonu, UV ve diode array dedektör (DAD), şırınga pompa (Goldman) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarından temin edildi. Kullanılan cihazlar ve satın alındıkları firmaları gösteren bilgiler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Markası
Mikro pipetler	Gilson
UV spektrofotometre	Unicam UV2
Isıticılı magnetik karıştırıcı	Heidolph MR 3001 K
Derin dondurucu	Vestel
Vorteks karıştırıcı	IKA Genius 3 vortex
HPLC	Agilent 1100-DAD 1200
pH metre	Hanna instruments pH 211 microprocessor
Şırınga pompa	Goldman
Boyut dışarılama kolonu	Zorbax GF-450, 6 µm, 9.4 x 250 mm
Tartım cihazı	Mettler toledo

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları Tablo 3.3 'de verilmiştir. HPLC yürütmelerinde kullanılan standart çözeltiler, kullanılan reaktifler ve hazırlanışları Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.3. Kimyasallar ve üretici firmalar

Madde Adı	Satın alınan firma
Sodyum asetat	Merck
Asetik asit	Merck
İzopropanol	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
NaOH	Merck
Coomassie Brilliant Blue G250 ultra pure	VWR Life Science International LLC
KH ₂ PO ₄	Sigma
KCl	Sigma
o-fosforik asit	Fluka
BCA	Sigma
İnsülin	Novomix, insulin flexpen
İmmunoglobulin G	Grifols Therapeutics Inc, Gamunex-c
Jelatin	Halavet Gıda San. A.Ş.
Etanol % 95	Sigma
BSA	Sigma
Ninhidrin	Sigma
HCl % 37	Merck

Tablo 3.4. Standart çözeltilerin ve kullanılan reaktiflerin hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
BSA ve BCA karışımı	Her biri ayrı tüplerde 0,1-0,2-0,3-0,5-0,6-1-1,5-2-3-5 mg/mL olacak şekilde ultra saf suyla çözeltileri hazırlandı ve 2 mL'lik ependorflarda 4 °C'de saklandı.
1,0 M HCl	8,3 mL % 37 derişik HCl alındı ve saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.
1,0 M NaOH	4 g NaOH alındı, 100 mL saf suda çözüldü.
Bradford Reaktifi	0,1 g Coomassie brilliant blue G250 50 mL % 95'lik etanolde çözüldü, 100 mL % 85 fosforik asit ilave edildi, hacim 1 L'ye ultra saf suyla tamamlandı. Reaktifin farklı konsantrasyonları etanol, fosforik asit, saf su çözücü karışımıyla seyreltilerek hazırlandı.
pH:7,0 50 mM Fosfat Tamponu, 0,2 M KCl karışımı	6,8 g KH ₂ PO ₄ 900 mL ultra saf suda çözüldü, pH 1 M NaOH ile 7,0 'a ayarlandı, 1 L'ye hacim ultra saf suyla tamamlandı, 14,9 g KCl bu karışımında çözüldü.

3.2. Hareketli Faz Çözücülerinin Hazırlanması ve Elüsyon Programı

HPLC-UV-DAD analizleri Agilent (Waldbronn, Almanya)'den bir diyot serili dedektör ile donanımlı 1100 seri ve DAD 1200 seridir. Enstrüman Chemstation programı (Agilent) ile kontrol edildi. HPLC sisteminde hareketli faz olarak boyut dışarılama kolonunda kullanıma uygun olarak izokratik tek bir çözücü kullanılmıştır ve izokratik programla uygulanmıştır (Tablo 3.5). Çözücü sistemi aşağıdaki gibidir:

A: 50 mM pH 7,0 Fosfat tamponu, 0,2 M KCl (iyonik şiddeti artırmak için)

Standart numune ve çözücü hazırlanırken iki kez destillenmiş ve deiyonize ultra saf su kullanılmıştır.

HPLC pompa akış hızı $0,5 \text{ mL.dk}^{-1}$ idi, reaktifin gönderildiği şırınga pompa akış hızı $0,3 \text{ mL.dk}^{-1}$ idi ve DAD dedektör 216, 240, 253, 260, 280, 308, 324, 595 nm'lerde ve bunlara ek olarak UV dedektör 540, 570 ve 595 nm'de (protein tayin yöntemine göre değişen) kromotogramlar kaydedildi.

Enjeksiyon hacmi $20 \mu\text{L}$ ve kolon sıcaklığı $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir (klima ile oda sıcaklığı ayarlanarak). Ayrıca reaksiyon sıcaklığı için tübing ısıtıcı altında su banyosuna daldırılmıştır.

Tablo 3.5. Bütün HPLC denemelerinde uygulanan HPLC elüsyon izokratik program

Zaman (dk)	Hareketli fazı oluşturan çözeltiler				Akış (mL/dk)	Basınç (Pa)
	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)		
0,00	0,0	0,0	100,0	0,0	0,500	275
35,00	0,0	0,0	100,0	0,0	0,500	275

1/10 oranında seyreltilmiş fosfat tamponu tübinglerdeki tampon kristallenmesini engellemek ve boyut dışarılama kolonunun dengelenmesi için yıkama çözücüsü olarak kullanılmıştır. Ayrıca UV dedektör ve reaksiyon tübinginde SDS (sodyum dodesil sülfat)'li fosforik asit, saf su, etil alkol karışımıyla tutunan Bradford boyası temizlendi.

3.3. On-line HPLC'ye Adaptasyon Öncesi Spektrofotometrik Denemeler

HPLC'ye adapte edilmeden önce spektrofotometrik olarak Biüret, Bradford ve Ninhidrin yöntemlerinin farklı numune: reaktif karışımı oranları, farklı reaktif konsantrasyonlarında ve farklı sıcaklıklarda BSA ve BCA standart proteinleriyle sabit konsantrasyonda süreye karşı absorbans değişimleri incelendi. Buradan elde edilen sonuçlara göre spektrofotometrik yöntemlerin on-line HPLC uygulamasındaki tübingteki gerçekleşecek reaksiyon sıcaklığı, süresi açısından uygunluğu tespit edildi.

3.4. Spektrofotometrik Denemelerin HPLC'ye Uyarlanması ve Optimizasyonu

Spektrofotometrik Ninhidrin, Biüret, Bradford denemeleri farklı süre, reaksiyon karışım oranları ve sıcaklıklarda incelemelerin ardından HPLC'ye uyarlandılar. Biüret denemesinde 540 nm'nin HPLC-online biüret duyarlılığının 280 nm'ye göre çok düşük olduğu görüldü ve reaktifin aşırı bazik oluşu tübing sistemini ve cihazı etkilemesi (pompa vs.) yüzünden kullanışlı bulunmadı ve diğer protein tayin yöntemlerinin denemesine geçildi.

Ninhidrin denemesinde HPLC'de on-line 570 nm'deki UV dedeksiyonu beklenenden çok düşük çıktığı için ve 280 nm'deki dedeksiyondan daha az duyarlı olduğu için tercih edilmeyerek başka bir spektrofotometrik protein tayin yöntemi arama yoluna gidildi.

Bradford yöntemi HPLC'ye uyarlandı, duyarlılığı iyi olduğu için method optimize edildi. Şırınga pompa sistemi ile Bradford reaktifinin gönderildiği on-line deneme yüksek verimlilikte optimum şartların eldesinde ön plana çıkmıştır. Farklı enjeksiyon akış hızları ve farklı HPLC akışları denenerek optimum tubing boyu, reaktif sıcaklığı, reaktif konsantrasyonu, reaktif akış hızı ayarlanarak en iyi kromatogram eldesi gerçekleştirilmiştir ve her tip kolona ve protein türüne uygulanabilir hale getirildi. Daha sonra tespit ve tayin sınırlarının belirlenmesine geçildi.

3.4.1. On-line HPLC- Ninhidrin

BSA'nın farklı konsantrasyonlarda ninhidrinle muamelesi sonrası spektrofotometrik absorbans değerleri okunarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve tayin edebildiği minimum ve maksimum sınırlar belirlenmeye çalışıldı.

Wimalasena R. ve arkadaşları tarafından 2003'te kolon sonrası ninhidrin reaktifiyle muamele sonrası türevlendirme ve florojenik dedeksiyonla bradikinin proteininin düşük pikomol seviyelerinde dedeksiyonu yapılabilmektedir (Wimalasena vd., 2003).

Yapılan çalışmada bu florometrik uygulamadan farklı olarak 570 nm'deki UV spektrofotometrik deneme temel alınarak reaktif ve numune (BSA) (1:1) oranda olacak şekilde HPLC ve on-line pompa akışı 0,5 mL/dakika olarak adapte edildi ve reaktifle numunenin karıştığı tübing kaynar su banyosunda tutuldu. 280 nm'deki DAD kromotogramının yanında on-line 570 nm UV kromotogramı tübingteki 1,5 dk gecikmeyle eş zamanlı olarak kaydedildi. İzokratik elüsyonla (pH 7,0 Fosfat tamponu, 0,2 M KCl) ve boyut dışarılama kolonunda BSA (66,2 kDa) ayrımı yapıldı.

Spektrofotometrik tayin sınırlarının çok çok üzerine çıktığı halde (20 mg/mL) HPLC'de on-line 570 nm'deki UV dedeksiyonu beklenenden çok düşük çıktığı için ve 280 nm'deki dedeksiyondan daha az duyarlı olduğu için tercih edilmeyerek başka bir spektrofotometrik protein tayin yöntemi arama yoluna gidildi.

3.4.2. On-line HPLC- Biüret

Biüret reaktifi 300 mL % 10' luk NaOH ile 500 mL % 0,3 bakır sülfat pentahidrat ve % 1,2 sodyum potasyum tartaratın karıştırılarak son hacmin 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlandı. Reaktifin kararlılığı birkaç aydır, litresi başına 1 g KI eklenerek karanlıkta süresiz olarak saklandı.

Buradan yola çıkarak 50 dk boyunca 37 °C ve oda sıcaklığında ve Numune (BSA): reaktif oranı (1:5), (5:1), reaktifteki bakır sülfat ve sodyum potasyum tartaratın 4 kat derişigi kullanılması gibi parametreler değiştirilerek UV-Vis spektrofotometrede ölçümler alınarak en iyi ölçümün oda sıcaklığında (5:1) ve seyreltik reaktifle olduğu kanaatine varılmıştır.

Bu çerçevede HPLC sistemi akışı 0.5 mL/dakika reaktifin on-line olarak gittiği pompa akışı 0.1 mL/dakika' ya ayarlandı ve HPLC' de bu sayede (5:1) oranı sağlandı, seyreltik biüret reaktifi (yani reaktifin orijinal hali) on-line olarak gönderildi. 280 nm yanında 540 nm kromotogramı tübingteki 1,5 dk gecikmeyle eş zamanlı olarak kaydedildi. Adaptasyon için 20 mg/mL BSA kullanıldı.

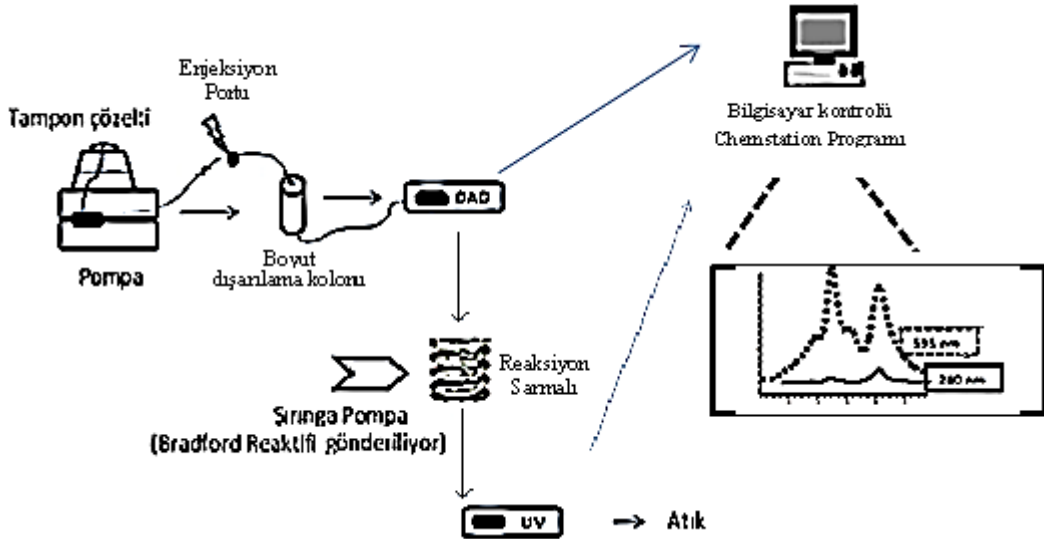
İzokratik elüsyonla (pH 7,0 50 mM Fosfat tamponu, 0,2 M KCl) ve boyut dışarılama kolonunda BSA (66.2 kDa) ayrımı yapıldı.

540 nm'nin HPLC-online biüret duyarlılığının 280 nm'ye göre çok düşük olduğu görüldü ve reaktifin aşırı bazik oluşu tübing sistemini ve cihazı etkilemesi (pompa vs.) yüzünden kullanışlı bulunmadı ve diğer protein tayin yöntemlerinin denemesine geçildi.

3.4.3. On-line HPLC- Bradford

0,1 g Coomassie Brilliant Blue 50 mL % 95 etanol ve 100 mL % 85'lik H₃PO₄ karışımında çözülür ve hacim saf suyla 1 litreye tamamlanır ve proteinle karıştırıldıktan sonra 595 nm'de mavi rengin absorbansı okundu (Şekil 2.2). HPLC sisteminde kullanılmadan önce reaktif 0,45 mikronluk filtrelerden geçirilerek kullanıldı.

Spektrofotometrik optimizasyonu BSA ve BCA ile yapıldıktan sonra HPLC sistemine adapte edilen metotta reaktif ve numune (5:3) oranda karışacak şekilde 0.5 mL/dakika HPLC pompa akışı ve on-line sistemdeki pompa akışı da 0.3 mL/dakika olarak sisteme uyarlanmıştır. İzokratik elüsyonla (pH 7,0 50 mM Fosfat tamponu, 0,2 M KCl) boyut dışarlama kolonunda protein ayrımı gerçekleştirilmiştir. Tübingteki 1,5 dk'lık gecikmeyle 595 nm kromotogramı eş zamanlı elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Geliştirilen On-line HPLC-DAD-Bradford protein tayin sistemi (SE-HPLC-Bradford) işleyiş diyagramı

3.4.3.1. Akış Hızı Optimizasyonu

On-line HPLC sisteminde sabit protein (BSA-BCA karışımı) konsantrasyonu enjeksiyonu yapılarak, sabit HPLC akışında, sabit reaktif konsantrasyonunda ve sabit tübing boyunda şırınga pompa ile farklı akış hızlarında reaktif gönderilerek pik alanları değerlendirildi ve en yüksek pik alanlarının olduğu akış hızı optimum olarak belirlendi.

3.4.3.2. Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu

On-line HPLC sisteminde sabit protein konsantrasyonu enjeksiyonu yapılarak, sabit HPLC akışında, sabit tübing boyunda ve belirlenen optimum sabit şırınga pompa akışında (0,3 mL/dk) farklı reaktif konsantrasyonları denenerek pik alanları değerlendirildi ve en yüksek pik alanlarının olduğu reaktif konsantrasyonu optimum olarak belirlendi.

3.4.3.3. Reaksiyon Sarmalında Gerçekleşen Reaksiyonun Sıcaklık Optimizasyonu

On-line HPLC sisteminde sabit protein konsantrasyonu enjeksiyonu yapılarak, sabit HPLC akışında, sabit tübing uzunluğunda ve belirlenen optimum sabit şırınga pompa akışında (0,3 mL/dk) ve belirlenen sabit optimum reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) pik alanları değerlendirildi ve en yüksek pik alanlarının elde edildiği sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlendi.

3.4.3.4. Tübing Boyu Optimizasyonu

On-line HPLC sisteminde sabit protein konsantrasyonu enjeksiyonu yapılarak, sabit HPLC Akışında ve belirlenen optimum sabit şırınga pompa akışında (0,3 mL/dakika) ve belirlenen sabit optimum reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) ve belirlenen sabit optimum reaksiyon sıcaklığında (30 °C) reaksiyon sarmalında gerçekleştirilen reaksiyon sonucu pik alanları değerlendirildi ve en yüksek pik alanlarının elde edildiği değer optimum tübing uzunluğu olarak belirlendi.

3.5. Geliştirilen On-line HPLC-Protein Yönteminin Gıda ve İlaç Numunelerine Uygulanarak Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Bu çalışmada, literatürde geçen yöntemlerde olduğu gibi kolon sonrası enjeksiyon yapılarak hedeflenen reaksiyonun takibi yolu izlenmiştir. Bu amaçla öncelikle HPLC boyut dışarılama kolon sisteminde tekli ve ardından çoklu protein karışımların verimli bir şekilde

ayrılması için uygun kromatografik şartlar optimize edilmiştir. Daha sonra bu şartlar kullanılarak DAD dedektörüyle elüsyon takip edilmiştir.

Bir sonraki safhada aynı işlem tekrarlanırken bu defa kolon sonrası ayırımdan sonra protein tayini yapabilmek için gerekli reaktif karışımı (Comassie Brilliant Blue G250) şırınga pompa sisteminden gönderilerek karışımın UV dedektörde absorbands takibi yapılmıştır. Bu şekilde protein karışımlarının absorbandsa bağlı dedeksiyonla ayrımı sağlanmıştır. Geliştirilen ve optimize edilen (0,3 mL/dakika reaktif akışı, 0,5 mL/dakika HPLC pompa akışı, 70 mg/L reaktif konsantrasyonu, 30 °C reaksiyon sıcaklığı ve 2,5 m reaksiyon tübingi optimum şartlar olarak kullanıldı) On-line HPLC-Bradford yöntemi kullanılarak bir gıda proteini olan jelatin, ilaç proteinleri immunoglobulin G ve insülin kalitatif ve kantitatif olarak başarılı bir şekilde analiz edildi.

On-line HPLC protein sistemlerinin hepsinde bilinen standart olarak BSA ve BCA karışımı kullanıldı. Bilinmeyen arı zehiri, amilaz, insülin, immünglobulin G, jelatin gibi proteinlerin miktarı BSA veya BCA' ya göre kıyaslandı. 280 nm'deki DAD dedeksiyonuna karşı daha duyarlı on-line protein temelli UV dedeksiyonu eş zamanlı ve daha etkin pik konsantrasyonu ile kalitatif ve kantitatif analize imkan tanımıştır.

Proteinlerin amino asit bileşiminden bağımsız dedeksiyonlarının on-line UV-DAD sistemiyle MS dedeksiyonuna gerek duyulmadan yapılması mümkündür. Ayrıca on-line UV-DAD sistemiyle amino asit bileşimine bağlı Bradford yöntemi gibi protein tayin yöntemlerinde ise eş zamanlı dedeksiyonun etkilenmesine bağlı olarak proteinin amino asit kompozisyonu hakkında bilgi edinilmesi mümkündür ve bu da moleküler biyoloji çalışmaları açısından önemli bir katma değerdir.

3.6. Seçilen Dalga Boyunun ve Kolonun Dedeksiyona Etkisi

HPLC DAD 216 nm peptid bağının bu dalga boyunda maksimum absorbands vermesi nedeniyle özellikle seçildi, ardından 240, 253 nm seçildi ve 260 nm DNA fragmentlerinin dedeksiyonu açısından seçildi.

280 nm proteinlerin aromatik amino asitler kaynaklı ölçümü için seçildi, ardından 308, 324 nm'ler de seçildi ve 595 nm Bradford yönteminde proteinle boya reaktifinin bağlandıktan sonraki maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu olduğu için boya ile bağlanmadan önceki absorbandsı görmek için seçildi.

595 nm UV ise dedektörde reaksiyon gerçekleştikten sonra eş zamanlı ölçüm için seçildi.

Boyut dışarılama kolonunda molekül büyüklüğüne göre ayrılan proteinlerden büyük moleküllüler önce dedekte oldu. Kolon (9,4 × 250 mm, partikül çapı 6 µm) pH'sı 3,5-8,5 arası ve 25-900 kDa arası proteinleri etkin ayırmaktaydı. Bu yüzden pH 7,0 fosfat tamponu hareketli faz olarak seçildi, reaktifin pH'sı fosforik asitten dolayı aşırı asidik olduğundan reaksiyona seçilen tamponun etkisi çok azdır ve dedeksiyonu etkilememektedir. Tamponun tubing içinde kristalize olmasını azaltmak için tampon konsantrasyonu 50 mM seçildi. Bu değer kolonun dolgu materyalinin cut off değeri için sınırdır.

3.7. Tespit (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırı

Tespit sınırı (LOD); istatistiksel kesinlik içinde ölçülebilen kabul edilebilir en düşük miktardır. LOD, örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. Madde sinyalinin, cihazdaki arka plan gürültüden ayrılabilmesi için gereken en düşük konsantrasyondur.

Örnek köründen (içerisinde aranan madde bulunmayan matriks) 10 bağımsız ölçüm yapıldı. En yüksek hassasiyet seviyesindeki gürültü değerlerinin standart sapması hesaplandı. Gürültünün standart sapması 3 ile çarpılarak tespit limitinin sayısal değeri belirlendi (EURACHEM, 1998).

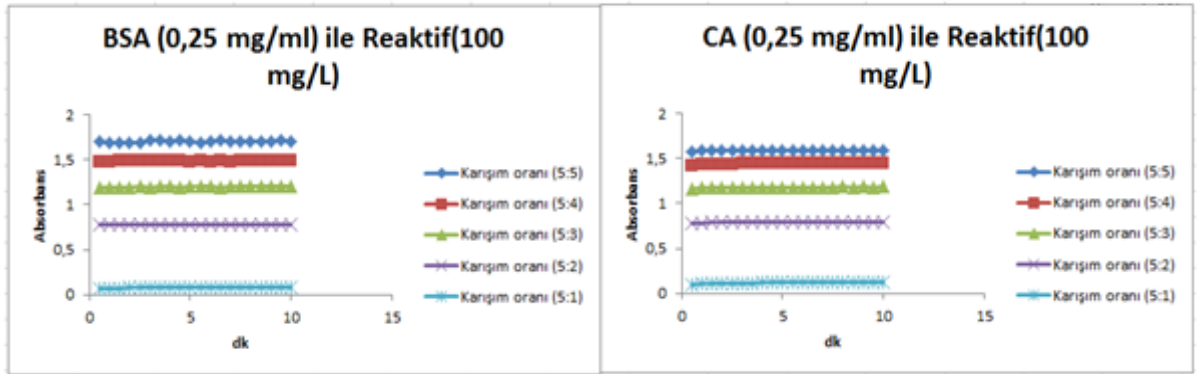
Tayin (ölçüm) sınırı (LOQ) ise kabul edilebilir doğrulukta, kesinlikte ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük konsantrasyondur. Analitin güvenilir bir şekilde doğru ölçüm yapabilmesi için gerekli en düşük miktardır. Örnek köründen (içerisinde analit bulunmayan matriks) 10 bağımsız ölçüm yapıldı. Ölçümlerin standart sapması hesaplandı. Standart sapma 10 ile çarpılarak LOQ' nun sayısal değeri belirlendi (EURACHEM, 1998).

4.BULGULAR VE SONUÇLAR

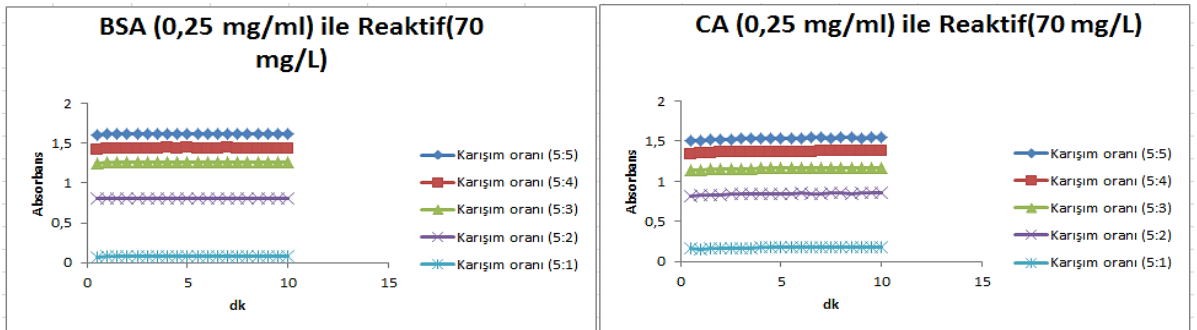
4.1. Spektrofotometrik Protein Tayinlerinin Süre ve Sıcaklık Parametreleri Açısından İncelenmesi

0,25 mg/mL BSA ve CA proteinleri 100 mg/L ve 70 mg/L Bradford reaktifiyle karıştıktan sonra 10 dk boyunca (5:1, 5:2, 5:3, 5:4, 5:5) karışım oranlarıyla on-line HPLC'ye adapte edilmeden önce 595 nm' de spektrofotometrik olarak değişen sürelerde absorbans karşılaştırılması yapılmıştır (Şekil 4.1-2).

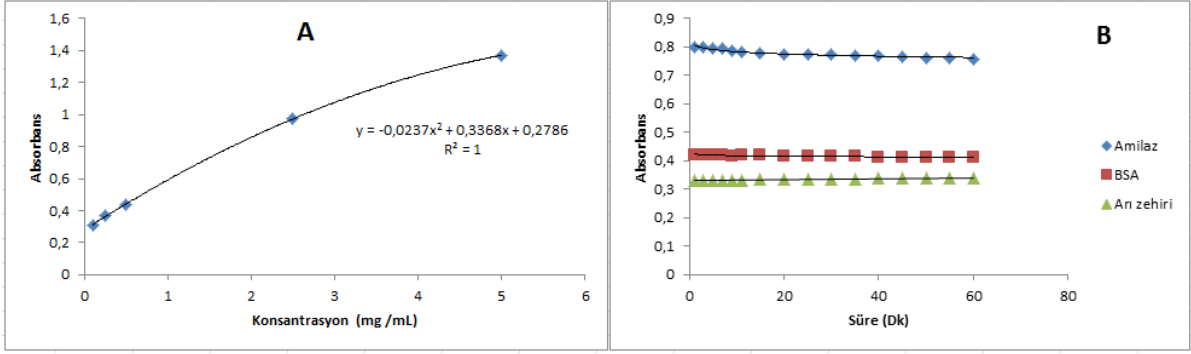
Sonuçlar birbiriyle örtüşmektedir. Ayrıca Bradford reaktifi proteinin bazik amino asit kompozisyonundan etkilendiği için aynı konsantrasyonda farklı proteinlere verdiği cevap değişmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1. BSA ve CA proteinlerinin sabit protein konsantrasyonunda (0,25 mg/mL) Bradford reaktifiyle (100 mg/L) reaksiyonu sonucu spektrofotometrik olarak değişen sürelerde 595 nm absorbanslarının karşılaştırılması

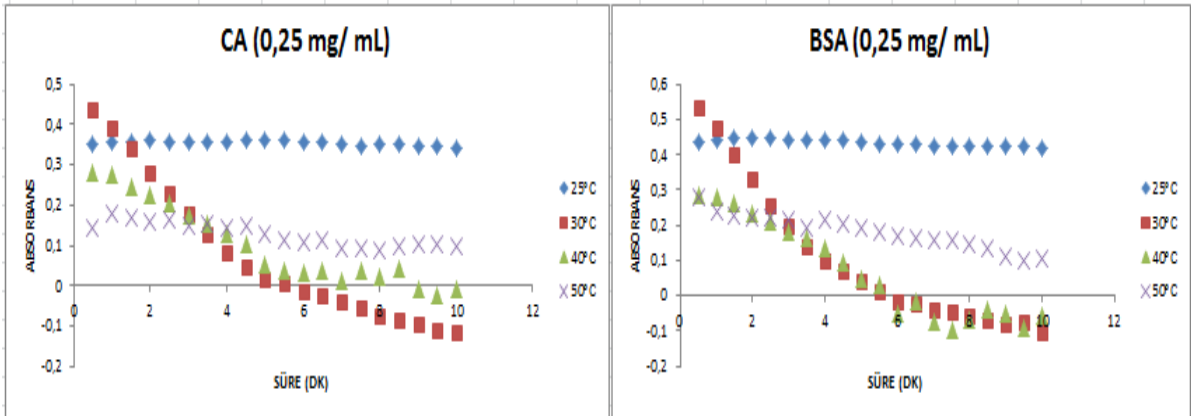


Şekil 4.2. BSA ve CA proteinlerinin sabit protein konsantrasyonunda (0,25 mg/mL) Bradford reaktifiyle (70 mg/L) reaksiyonu sonucu spektrofotometrik olarak değişen sürelerde 595 nm absorbanslarının karşılaştırılması



Şekil 4.3. A: BSA proteiniyle Bradford reaktifinin spektrofotometrik kalibrasyon eğrisi, B: 1 mg/mL Amilaz, BSA, Arı zehiri proteinlerinin Bradford reaktifıyla (70 mg/L) 60 dk boyunca değişen sürelerde absorbans değişimi

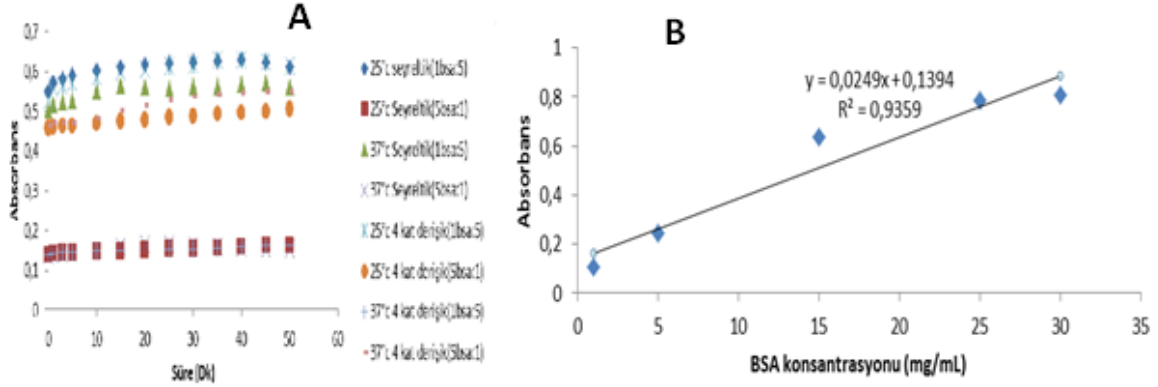
3 ile 15 dk arası % absorbans farkı amilaz için % 2,99, BSA için % 0,24, arı zehiri için ise % 0,90'dır (Şekil 4.3).



Şekil 4.4. BSA ve CA (0,25 mg/mL)'nin 25, 30, 40 ve 50 °C'lerde Bradford reaktifıyla spektrofotometrik olarak 10 dk'lık absorbans değişimleri

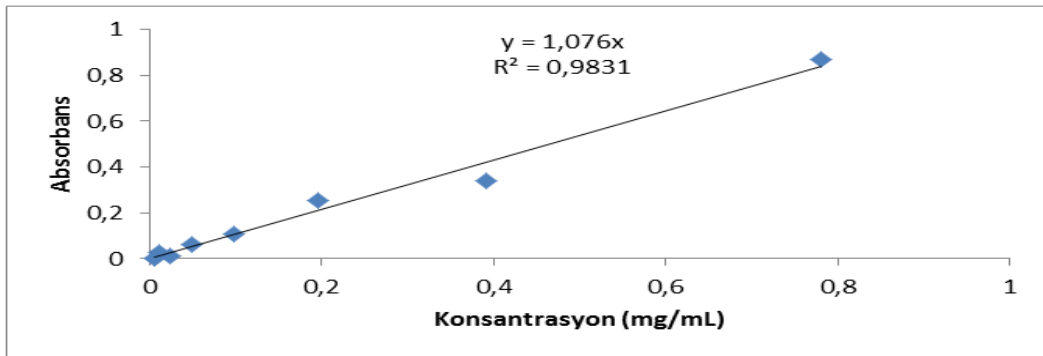
Değişen sıcaklıklarda (25°C-30°C-40°C-50°C) Bradford reaktifinin (70 mg/L) sabit konsantrasyondaki (0,25 mg/mL) proteinlerle (CA ve BSA) olan reaksiyonu sonucu absorbans incelemesinde en yüksek absorbansın ilk 1,5 dk'lık reaksiyonla 30 °C olduğu Şekil 4.4.'te görülmektedir.

Büret yönteminin değişen süreye karşı absorbans incelemesinde en iyi ölçüm oda sıcaklığında seyreltik reaktifle (yani reaktifin orijinal hali) ve numune : reaktif (1:5) karışım oranıyla gerçekleşmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. A: 50 dk boyunca 37 °C ve oda sıcaklığında ve numune (BSA, bovine serum albumin): reaktif oranı (1:5), (5:1), reaktifteki bakır sülfat ve sodyum potasyum tartaratin 4 kat derişigi kullanılması gibi parametreler değiştirilerek UV-Vis spektrofotometredeki absorbans ölçümleri, B: En iyi ölçüm için (oda sıcaklığında (1bsa:5) ve seyreltik reaktifle) oluşturulan kalibrasyon eğrisi

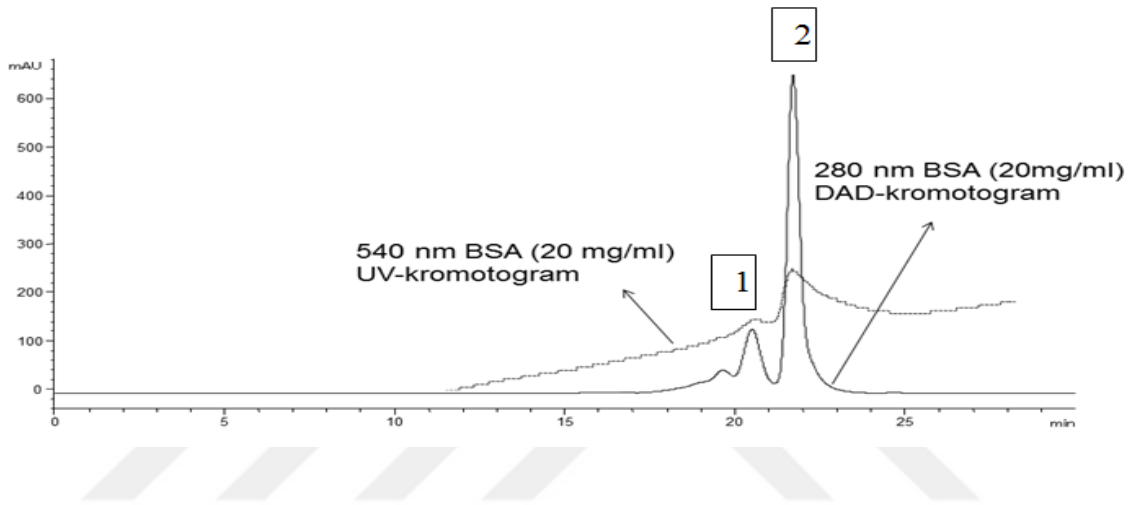
Ninhidrin yöntemi 15 dk'da tamamlandığı için ve yüksek sıcaklıkta reaksiyon gerçekleştiği için değişen sıcaklıklarda, değişen sürelerde ve farklı numune: reaktif karışım oranlarıyla absorbans incelenmesi çalışması yapılmadı, yalnızca yöntemin spektrofotometrik olarak BSA standart proteiniyle değişen konsantrasyonlarda kalibrasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Ninhidrin yöntemi için kalibrasyon eğrisi

4.2. Spektrofotometrik Biüret Yönteminin HPLC' ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini

20 mg/mL BSA proteini ile boyut dışarılama kolonunda On-line HPLC-Biüret denemesinde Şekil 4.7' de görüldüğü üzere 280 nm dedeksiyonu 540 nm' dekinden daha iyidir Bu da on-line HPLC-Biüret yönteminin kullanışlılığının ve duyarlılığının düşük olduğunu göstermektedir ve ayrıca 540 nm'deki dedeksiyonda BSA dimer halde dedekte olmuştur.



Şekil 4.7. Spektrofotometrik Biüret metodunun HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Biüret) ile BSA'nın (20 mg/mL) 280 ve 540 nm kromotogramlarının karşılaştırılması (540 nm kromatogramı büyütülmüştür.)

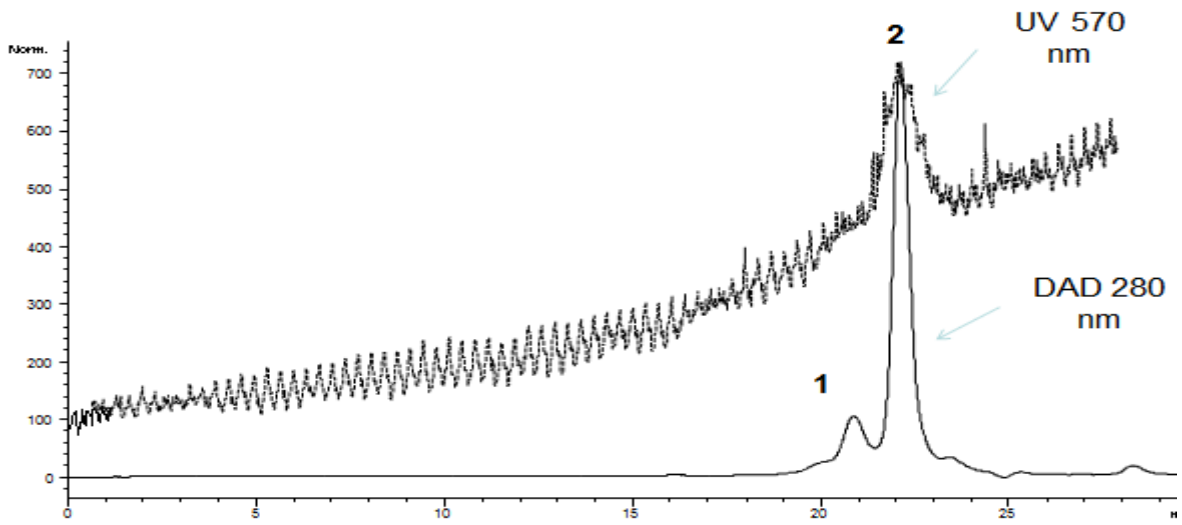
Ayrıca Biüret yönteminde prolin amino asidince zengin proteinlerde çok düşük cevap alınmaktadır (Metsamuuronen vd., 2011). BSA proteinindeki 27 tane prolin amino asidi dedeksiyonu % 88 oranında düşürmüştür (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. BSA (20 mg/mL) proteininin piklerinin 280 nm ve 540 nm'deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri

BSA Proteini Pik Numaraları	280 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	280 nm Pik Alanı (mAUxdk)	280 nm Pik Yüksekliği (mAU)	540 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	540 nm Pik Alanı (mAUxdk)	540 nm Pik Yüksekliği (mAU)
1	20,5	7515,7	129,6	22,349	306,5	6,5
2	21,708	18767,6	654,9	23,44	2790,6	35,8

4.3. Spektrofotometrik Ninhidrin Yönteminin HPLC'ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini

20 mg/mL BSA proteini ile boyut dışarılama kolonunda On-line HPLC-Ninhidrin denemesinde Şekil 4.8'de görüldüğü üzere 570 nm'deki baseline dalgalanması çok fazladır ve 280 nm'ye göre dedeksiyonu çok daha düşüktür ve 280 nm'deki dimerik yapı 570 nm'de monomerik olarak dedekte olmuştur. Metod bu yüzden kullanışlı değildir.



Şekil 4.8. Spektrofotometrik olarak denenen metodun HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Ninhidrin) ve BSA'nın (20 mg/mL) bu yöntemle DAD 280 nm ve UV 570 nm kromatogramlarının karşılaştırılması (570 nm kromatogramı büyütülmüştür.)

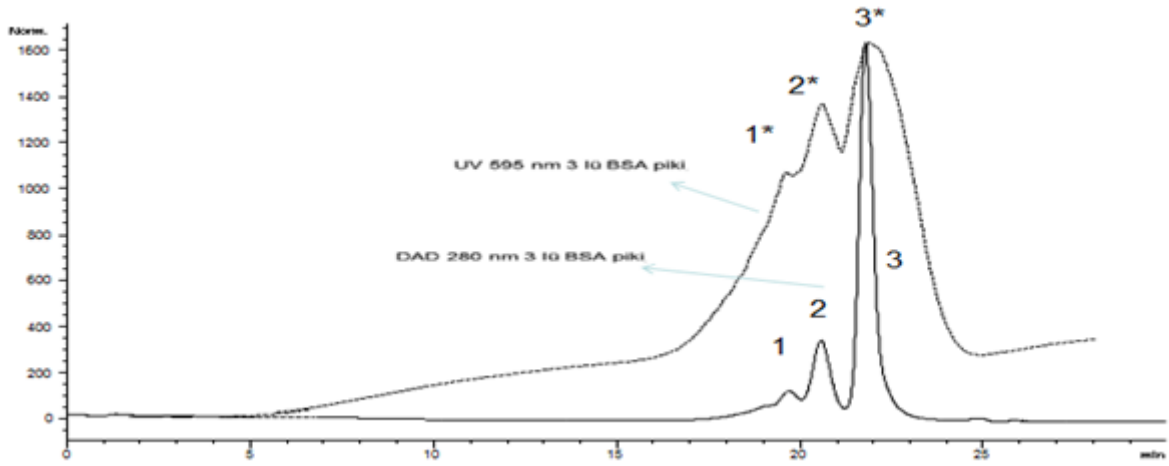
BSA'nın 1 numaralı fragmentinin 570 nm'deki karşılığı yoktur dolayısıyla pik alanı ve yükseklikleri verilememiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. BSA proteininin (20 mg/mL) piklerinin 280 nm ve 570 nm deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri

BSA Proteini Pik Numaraları	280 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	280 nm Pik Alanı (mAUxdk)	280 nm Pik Yüksekliği (mAU)	570 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	570 nm Pik Alanı (mAUxdk)	570 nm Pik Yüksekliği (mAU)
1	20,881	6179	107,5	-	-	-
2	22,12	25111,8	719,7	23,923	94	1,5

4.4. Spektrofotometrik Bradford Yönteminin HPLC'ye Adaptasyonu ile On-line Protein Tayini

15 mg/mL BSA proteini ile boyut dışarılama kolonunda on-line HPLC-Bradford denemesinde yöntemin duyarlılığı yüksektir ve 280 nm'ye göre 595 nm'deki dedeksiyon oldukça yüksektir. Bu konsantrasyonda 280 ve 595 nm'lerde trimer BSA piki mevcuttur (Şekil 4.9) (Tablo 4.3).

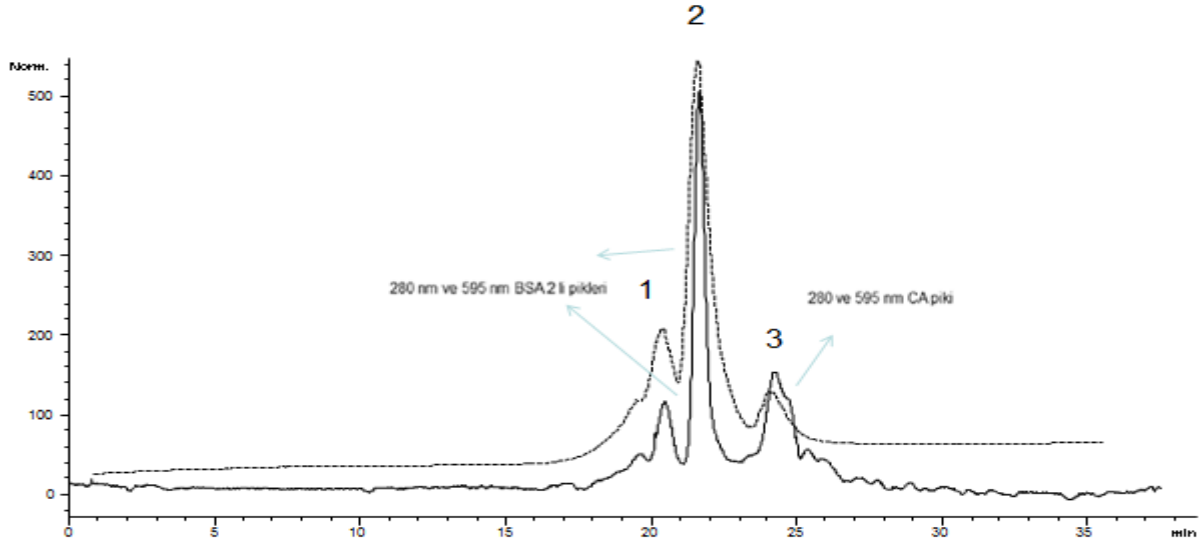


Şekil 4.9. BSA proteininin (15 mg/mL) HPLC'ye adaptasyonu (on-line HPLC-Bradford) ile DAD 280 nm ve UV 595 nm kromotogramlarının karşılaştırılması

Tablo 4.3. BSA proteininin (15 mg/mL) piklerinin 280 nm ve 595 nm deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri

BSA Proteini Pik Numaraları	280 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	280 nm Pik Alanı (mAUxdk)	280 nm Pik Yüksekliği (mAU)	595 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	595 nm Pik Alanı (mAUxdk)	595 nm Pik Yüksekliği (mAU)
1	19,704	2150,6	35,3	21,301	66312,2	795,9
2	20,571	4113,3	109,6	22,324	77676	1095,9
3	21,782	15224,7	517,7	23,589	156950,5	1359,4

BSA ve CA protein karışımı (1 mg/mL) da boyut dışarılama kolonunda ayrılıp geliştirilen on-line HPLC-Bradford yöntemiyle 280 ve 595 nm’lerde eş zamanlı olarak dedekte edildi. 2’li dimer halde BSA piki, tekli CA piki gözlemlendi (Şekil 4.10) (Tablo 4.4). Pik alanlarına bakıldığında 595 nm dedeksiyonunun duyarlılığı 280 nm dedeksiyonuna göre 10 kattan fazladır (Tablo 4.4).



Şekil 4.10. BSA ve CA (karbonik anhidraz) (1 mg/mL) protein karışımının on-line HPLC-Bradford ile DAD 280 nm ve UV 595 nm kromotogramlarının karşılaştırılması

Tablo 4.4. BSA ve CA (karbonik anhidraz) (1 mg/mL) proteinlerinin piklerinin 280 nm ve 595 nm’ deki tutunma zamanları, pik alanları ve pik yükseklikleri

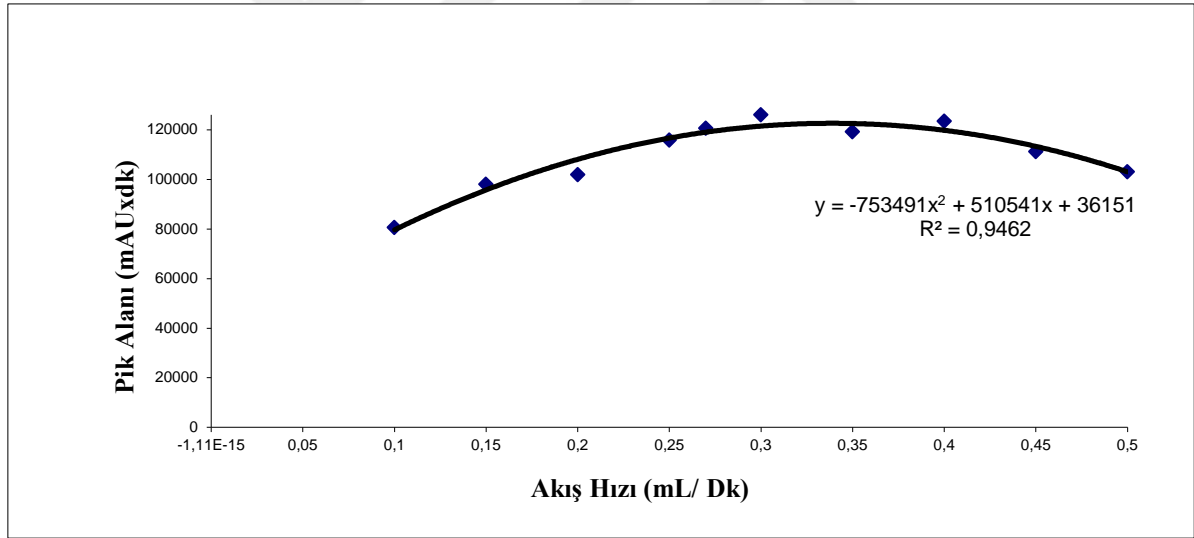
BSA ve CA Proteinleri, Pik Numaraları	280 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	280 nm Pik Alanı (mAUxdk)	280 nm Pik Yüksekliği (mAU)	595 nm RT (dk) Tutunma Zamanı	595 nm Pik Alanı (mAUxdk)	595 nm Pik Yüksekliği (mAU)
BSA (1)	20,484	235,4	5,4	22,141	8067,6	165,8
BSA (2)	21,648	757,4	23,7	23,307	29857,7	499
CA (3)	24,240	408,8	6,8	25,902	6828,9	99,6

4.5. On-line HPLC-Bradford Yönteminin Optimizasyonu

Spektroskopik denemelerde ve HPLC'ye adaptasyon çalışmalarında dedeksiyon ve uygulama açısından üstünlük gösteren Bradford yönteminin HPLC'de on-line uygulamalar açısından geliştirilmesi için yöntem reaktif akış hızı, reaktif konsantrasyonu, tübing uzunluğu ve reaksiyon sıcaklığı açılarından optimize edildi.

4.5.1. Reaktif Akış Hızı Optimizasyonu

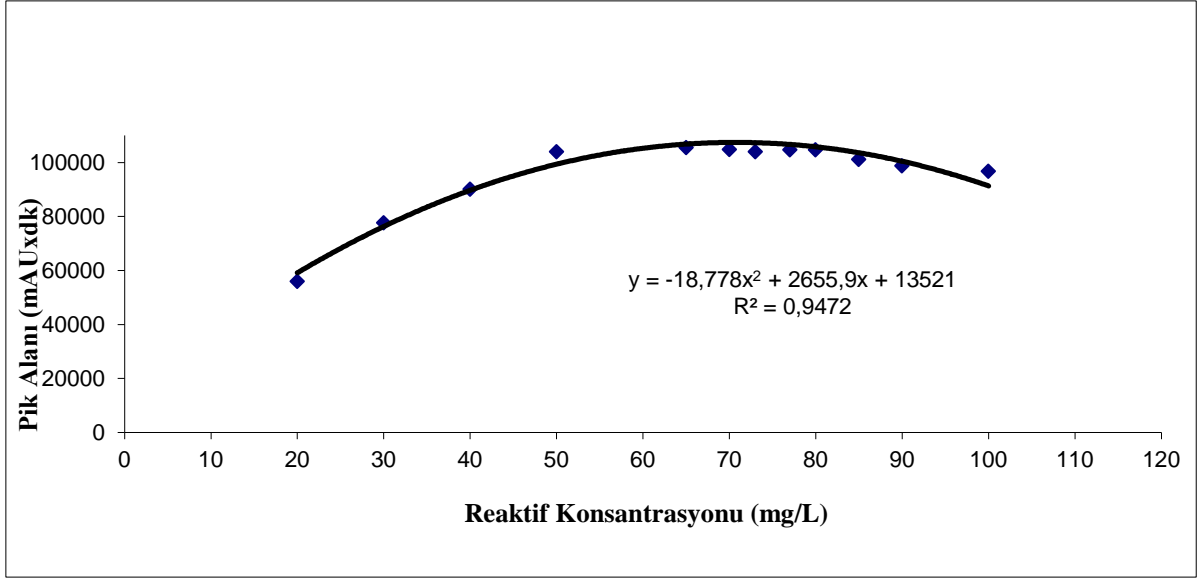
Sabit protein konsantrasyonu (BSA-CA karışımı) (1 mg/mL), sabit HPLC akışı (0,5 mL/dk), sabit reaktif konsantrasyonu (70 mg/L), sabit tübing boyu (2,5 m) ve sıcaklıkta (30 °C) reaktif akış hızı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum değer 0,3 mL/dk olarak belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sabit protein (1 mg/mL) ve reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) şırınga pompanın akış hızı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum akış hızı belirlenmesi grafiği

4.5.2. Reaktif Konsantrasyonu Optimizasyonu

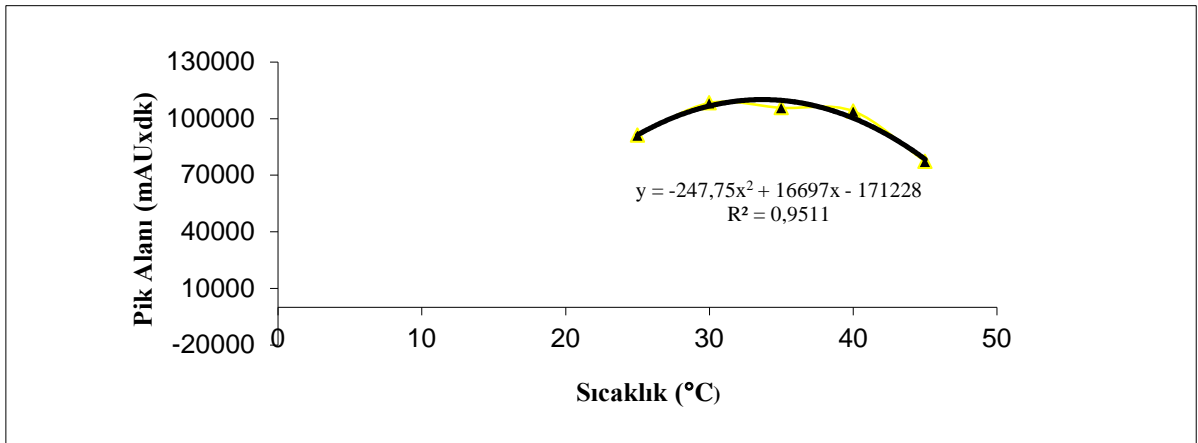
Sabit protein konsantrasyonu (BSA-CA karışımı) (1 mg/mL), sabit HPLC akışı (0,5 mL/dk), sabit reaktif akışı (0,3 mL/dk), sabit tübing boyu (2,5 m) ve sıcaklıkta (30 °C) reaktif konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum değer 70 mg/L olarak belirlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Sabit protein konsantrasyonu (1 mg/mL) ve optimum reaktif akış hızında (0,3 mL/dk) reaktif konsantrasyonu değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum reaktif konsantrasyonu belirlenmesi grafiği

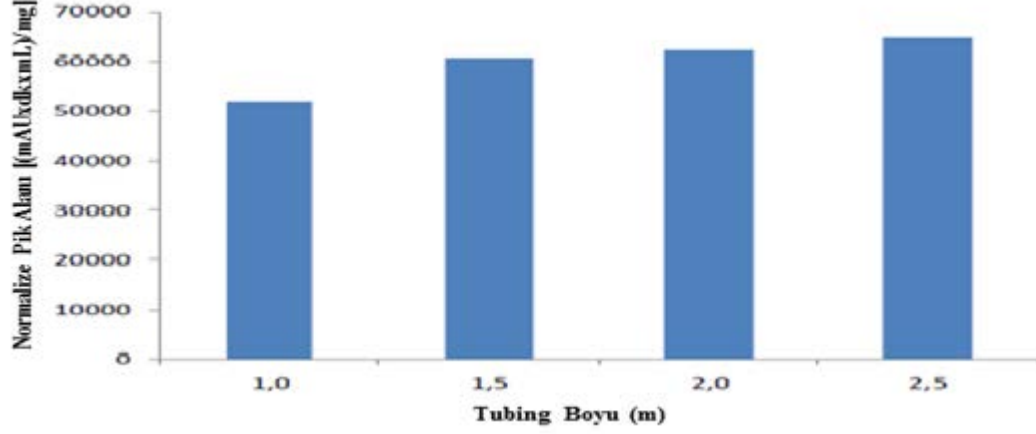
4.5.3. Tübingteki Reaksiyon Sıcaklığı Optimizasyonu

Sabit protein konsantrasyonu (BSA-CA karışımı) (1 mg/mL), sabit HPLC akışı (0,5 mL/dk), sabit reaktif akışı (0,3 mL/dk), sabit tübing boyu (2,5 m) ve sabit reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) tübingteki reaksiyon sıcaklığı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum sıcaklık 30 °C olarak belirlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Sabit Protein konsantrasyonu (1 mg/mL), optimum reaktif akış hızında (0,3 mL/dk) ve optimum reaktif konsantrasyonunda (70 mg/L) tübingteki reaksiyon sıcaklığı değiştirilerek elde edilen pik alanlarından optimum reaksiyon sıcaklığı belirlenmesi grafiği

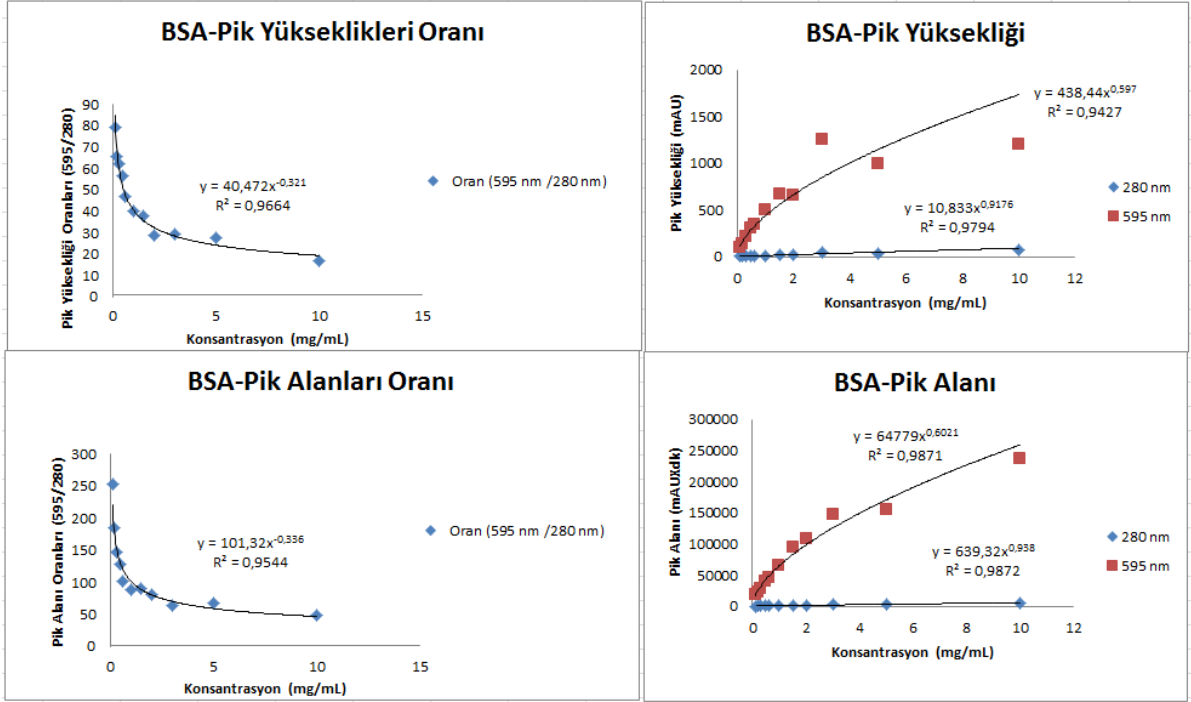
4.5.4. Tübing Boyu Optimizasyonu



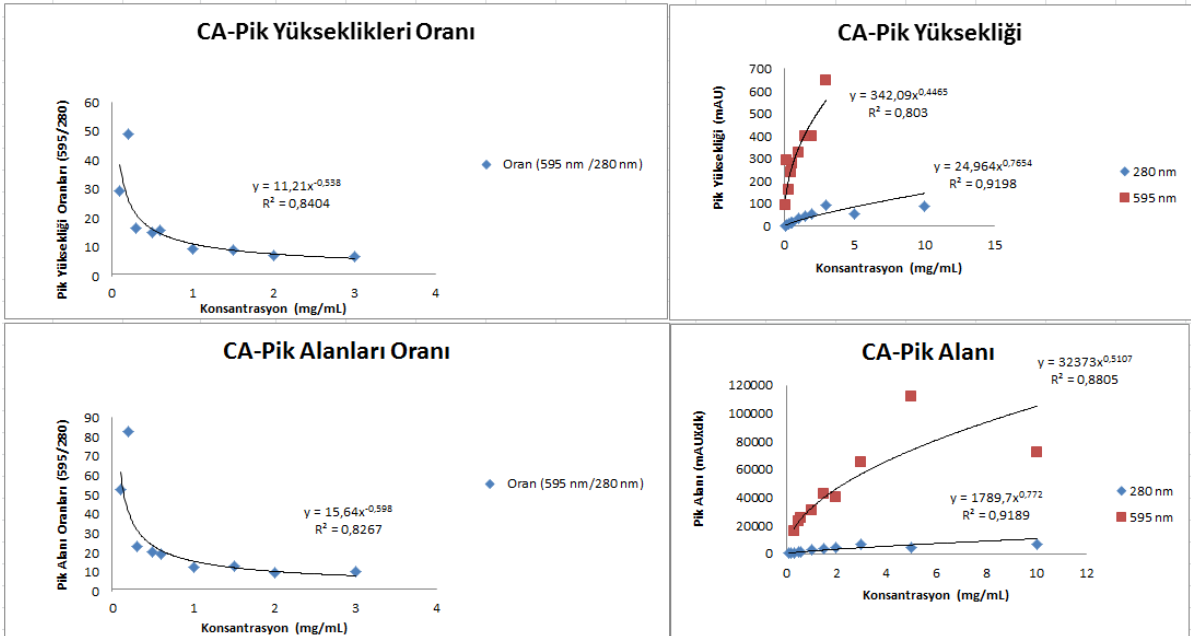
Şekil 4.14. Sabit Protein (BSA) konsantrasyonu (1 mg/mL), optimum reaktif akış hızı (0,3 mL/dk), optimum reaktif konsantrasyonu (70 mg/L), optimum reaksiyon sıcaklığında (30 °C) farklı tubing boylarından elde edilen normalize pik alanlarından optimum tübing boyunun belirlenmesi grafiği

Optimizasyon sonucu 0,5 mL/dk HPLC sabit pompa akışı ve 1 mg/mL sabit konsantrasyonda BSA ve CA protein karışımı kullanılarak 0,3 mL/dk reaktif akışı, 70 mg/L reaktif konsantrasyonu, 30 °C reaksiyon sıcaklığı ve 2,5 m reaksiyon tübing uzunluğu optimum şartlar olarak belirlendi (Şekil 4.11-14.). BSA ve CA proteinleri ayrı ayrı farklı konsantrasyonlarda (5-3-2-1,5-1-0,6-0,5-0,3-0,2-0,1 mg/mL) optimum şartlarda on-line HPLC-Bradford yöntemiyle farklı tübing uzunluklarında yürütüldüler.

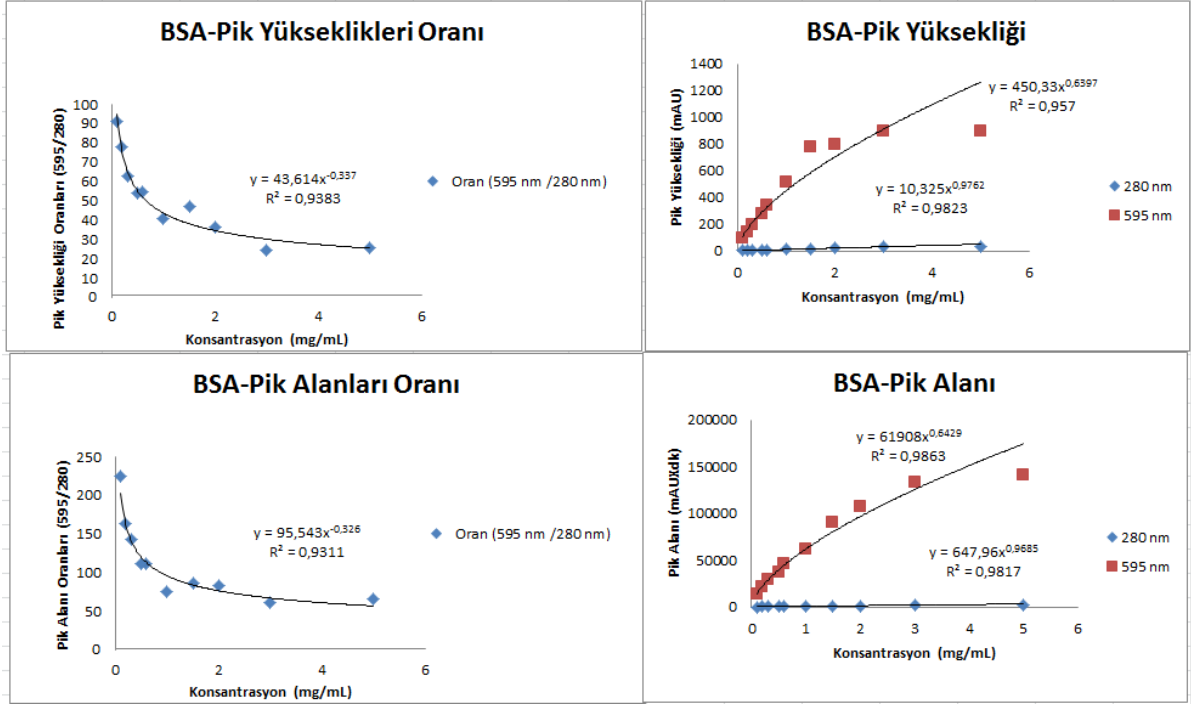
Farklı tübing uzunlukları için konsantrasyona karşı 280 ve 595 nm’lerde pik alanı ve pik yükseklikleri grafikleri oluşturuldu (Şekil 4.15-22). En iyi pik alan ve yükseklik sonuçları 2,5 m’lik tübingle elde edildi.



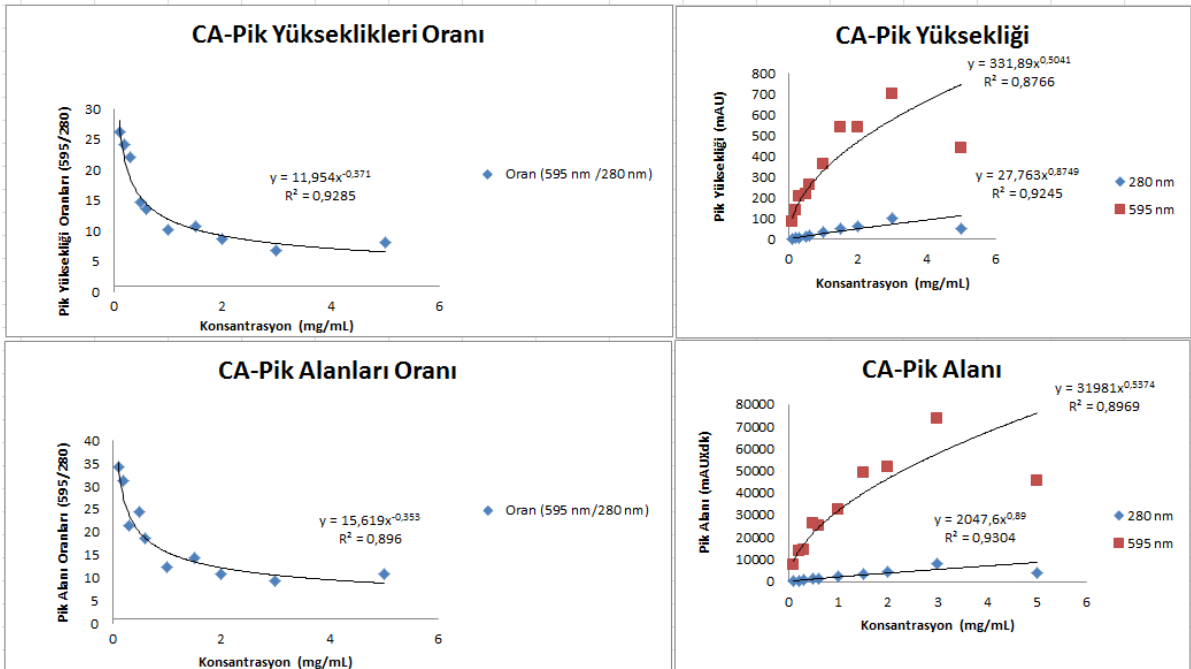
Şekil 4.15. BSA proteinin optimize edilen şartlarda 2,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



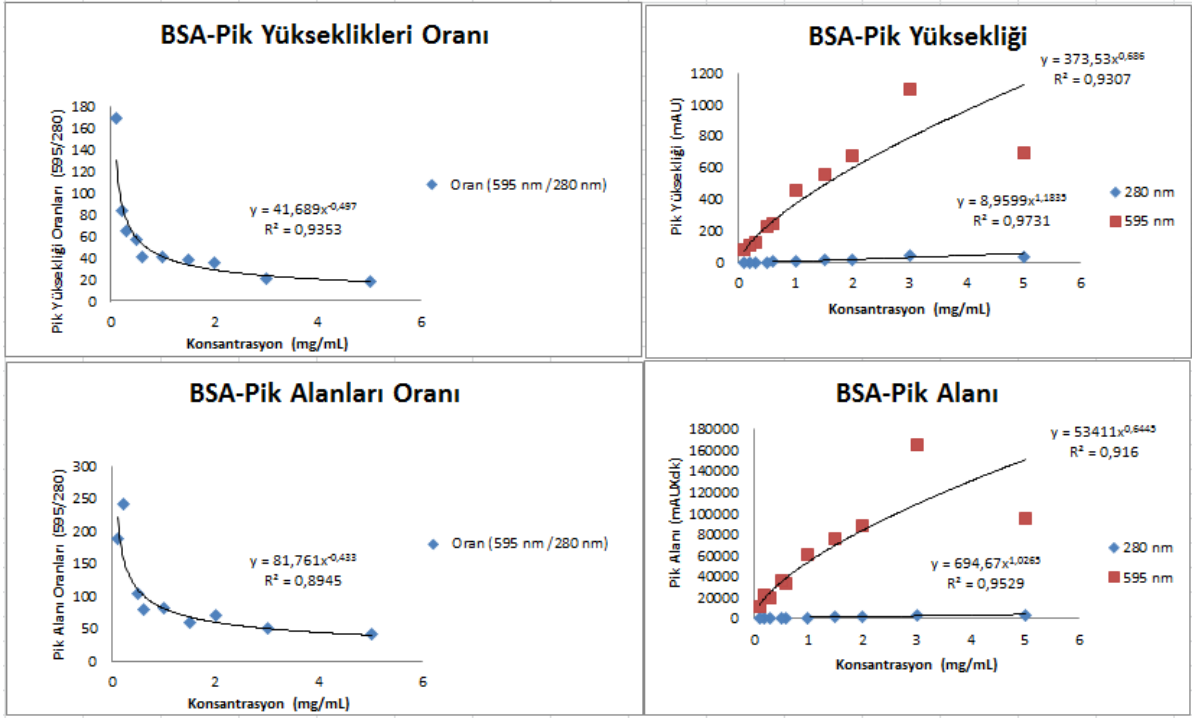
Şekil 4.16. CA proteinin optimize edilen şartlarda 2,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



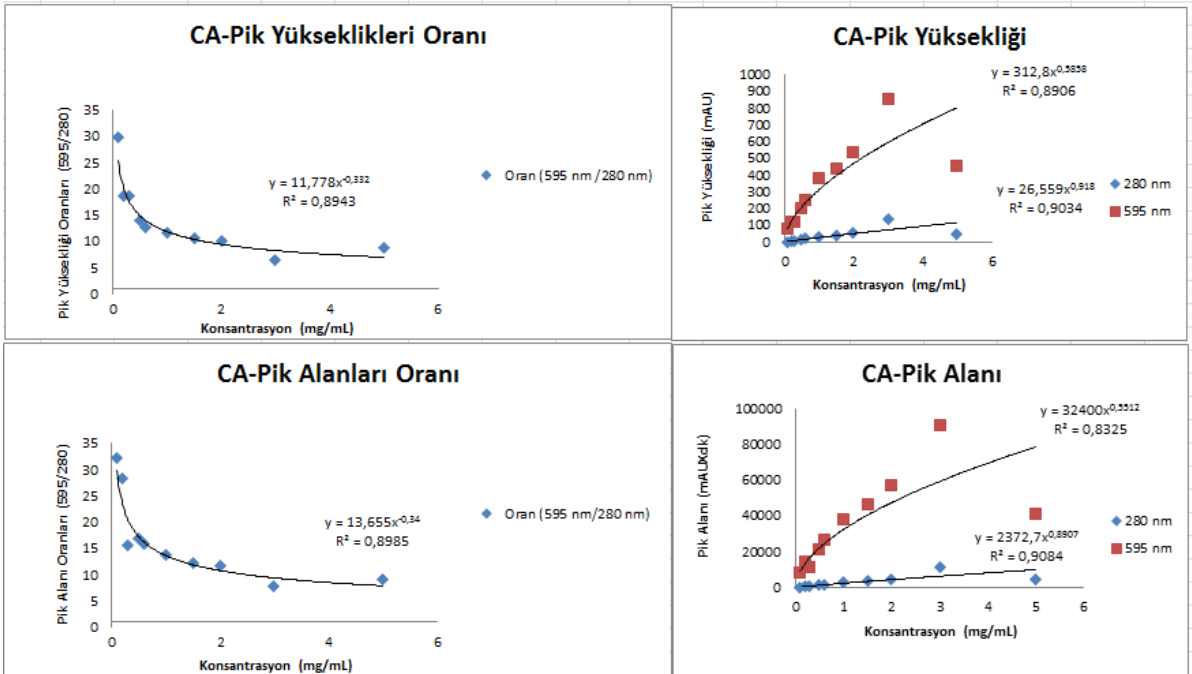
Şekil 4.17. BSA proteinin optimize edilen şartlarda 2,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



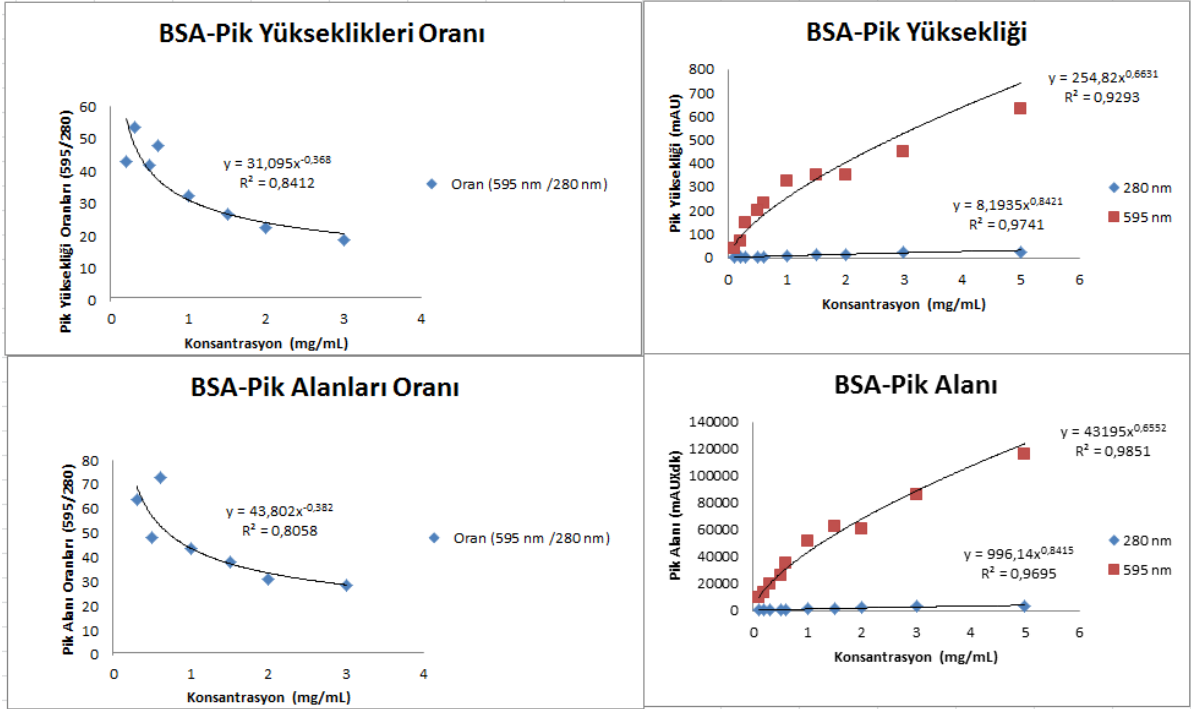
Şekil 4.18. CA proteinin optimize edilen şartlarda 2,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm'de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



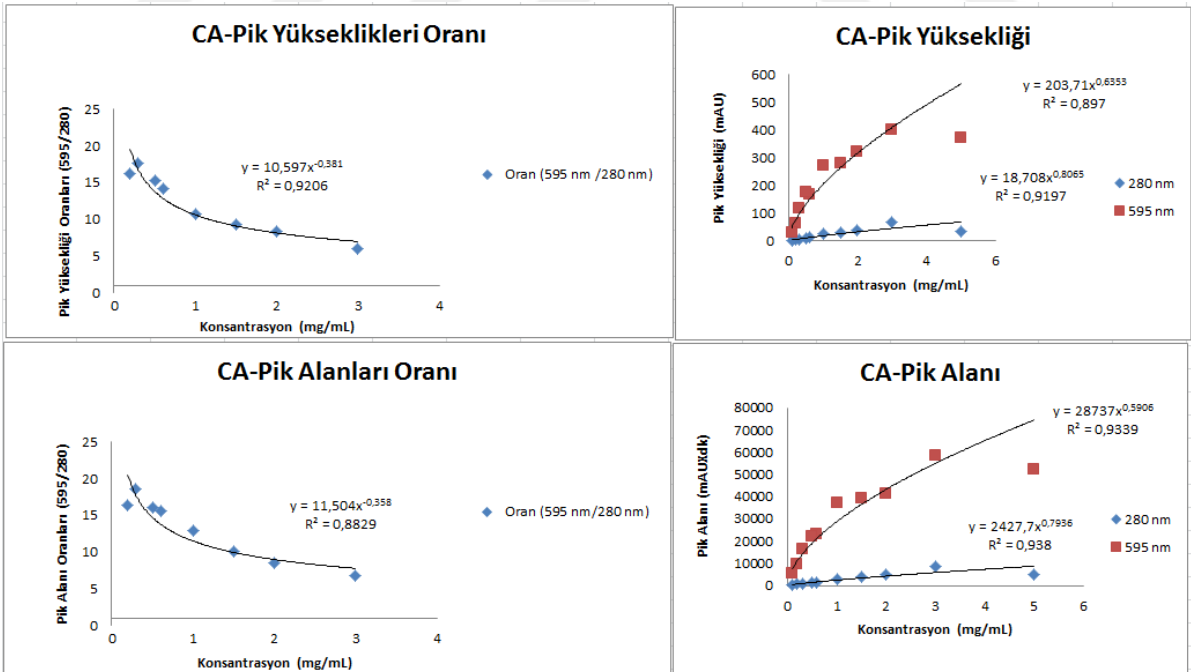
Şekil 4.19. BSA proteinin optimize edilen şartlarda 1,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



Şekil 4.20. CA proteinin optimize edilen şartlarda 1,5 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler



Şekil 4.21. BSA proteininin optimize edilen şartlarda 1,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler

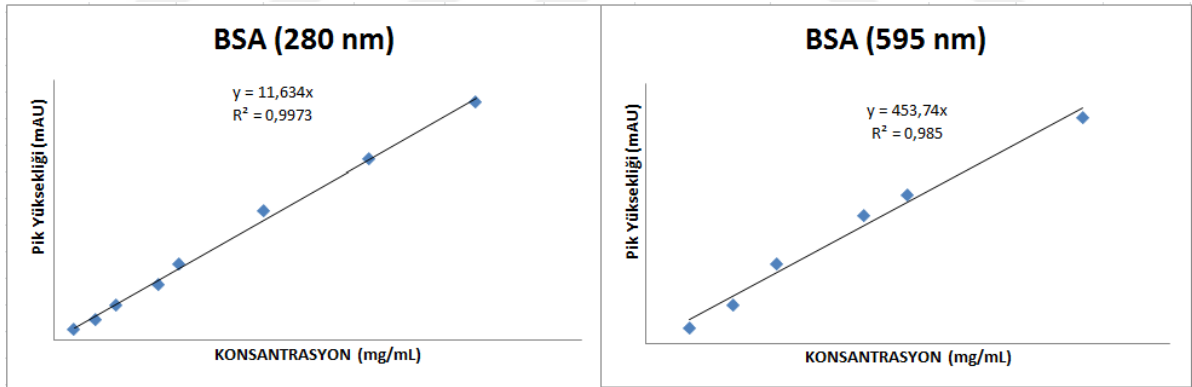


Şekil 4.22. CA proteininin optimize edilen şartlarda 1,0 m tübing için pik alanı ve pik yüksekliklerinin 280 nm ve 595 nm’de konsantrasyonla ilişkisini gösteren grafikler

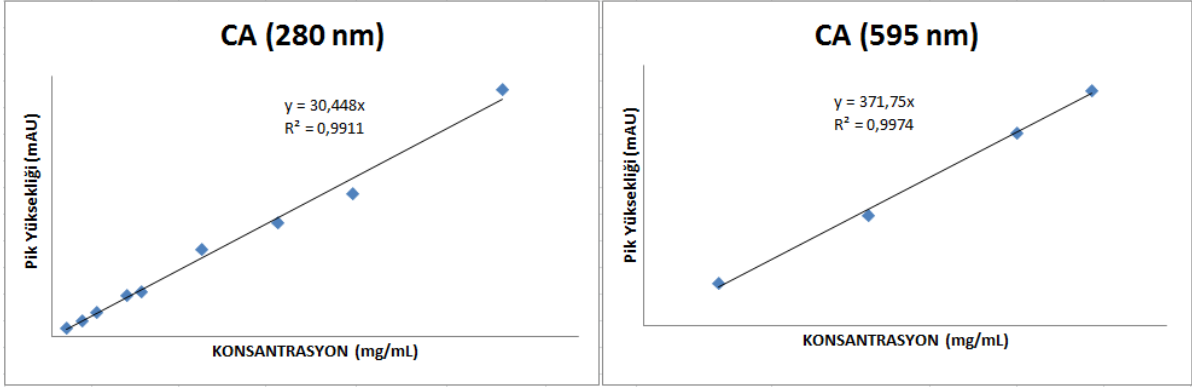
4.6. Geliştirilen HPLC-Bradford Yönteminin Tespit (LOD) ve Tayin (LOQ) Sınırının Belirlenmesi

Tespit sınırı (LOD); Örnek köründen (içerisinde aranan madde bulunmayan matriks) 10 bağımsız ölçüm yapıldı. Bu gürültü değerlerinin hem 280 nm hem de 595 nm'de yüksekliklerinin ortalaması alındı. Bu ortalamaların 3 katı alındı. Daha sonra bu ortalamaların 3 katı, çalışılan protein numunelerinin her biri için (BSA, CA, immünglobulin G, insülin) konsantrasyona karşı pik yüksekliklerinden oluşturulan 280 nm ve 595 nm kalibrasyon grafiklerinin (Şekil 4.23-26) eğimlerine bölünerek her bir protein için konsantrasyon hesaplandı. Bunlar her protein için ayrı ayrı tespit sınırı olarak belirlendi.

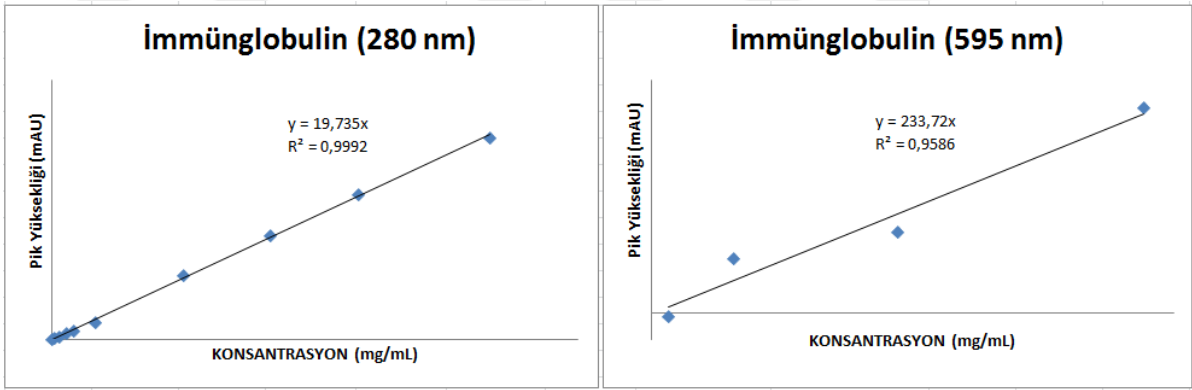
Tayin (ölçüm) sınırı (LOQ) ise; örnek köründen (içerisinde aranan madde bulunmayan matriks) 10 bağımsız ölçüm yapıldı. Bu gürültü değerlerinin hem 280 nm hem de 595 nm'de yüksekliklerinin ortalaması alındı. Bu ortalamaların 10 katı alındı. Daha sonra bu ortalamaların 10 katı, çalışılan protein numunelerinin her biri için (BSA, CA, immünglobulin G, insülin) konsantrasyona karşı pik yüksekliklerinden oluşturulan 280 nm ve 595 nm kalibrasyon grafiklerinin (Şekil 4.23-26) eğimlerine bölünerek her bir protein için konsantrasyon hesaplandı. Bunlar her protein için ayrı ayrı tayin sınırı olarak belirlendi.



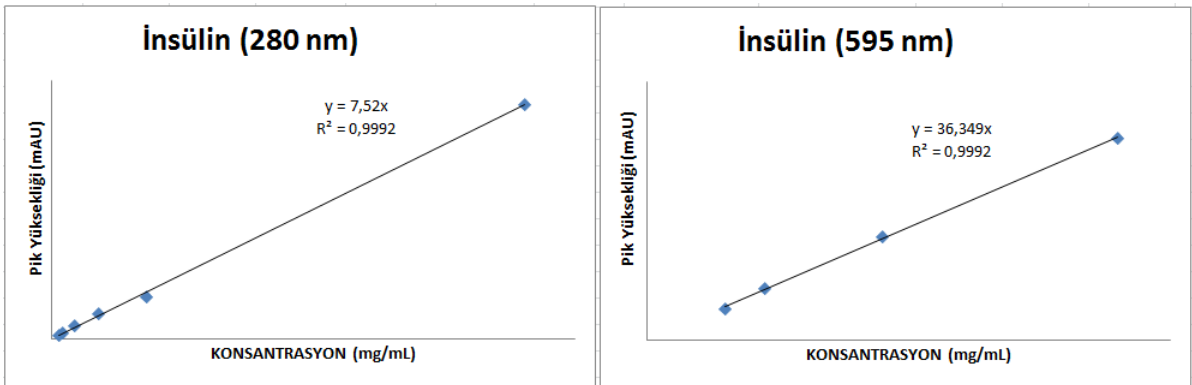
Şekil 4.23. BSA'nın 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması



Şekil 4.24. CA'nın 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması



Şekil 4.25. İmmünglobulin G'nin 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması



Şekil 4.26. İnsülin'in 280 nm DAD ve 595 nm UV on-line HPLC-Bradford protein uygulamasında konsantrasyona karşı pik yüksekliği grafikleri karşılaştırması

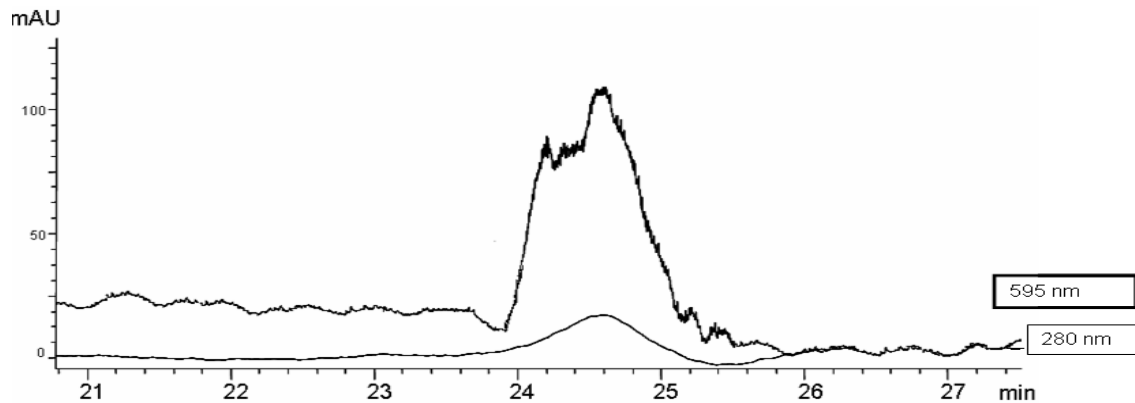
Tablo 4.5. BSA, immüoglobulin G, CA (karbonik anhidraz), insülin proteinlerinin 280 ve 595 nm tespit ve tayin limitleri

Dalga Boyu	BSA (mg/mL) (LOD)	BSA (mg/mL) (LOQ)	CA (mg/mL) (LOQ)	CA (mg/mL) (LOQ)	İmmüoglobulin G (mg/mL) (LOD)	İmmüoglobulin G (mg/mL) (LOQ)	İnsülin (mg/mL) (LOD)	İnsülin (mg/mL) (LOQ)
280 nm	0.0077	0.0258	0.0030	0.0099	0.0046	0.0152	0.0120	0.0399
595 nm	0.0264	0.0882	0.0323	0.1076	0.0513	0.1711	0.3301	1.1004

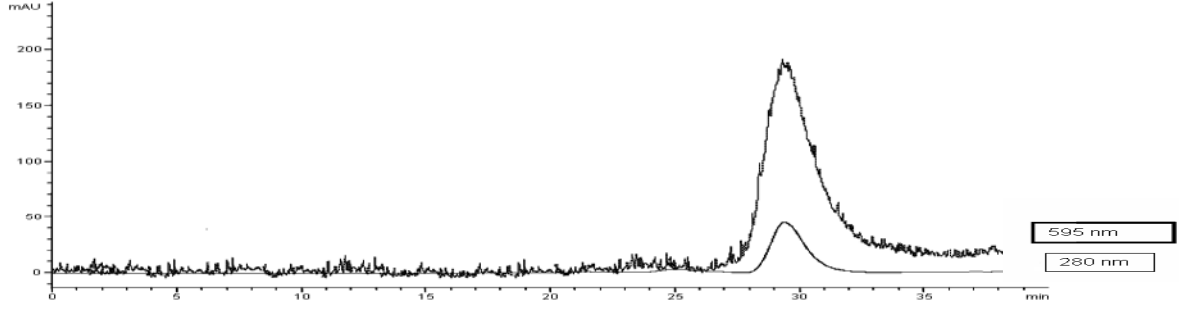
Tablo 4.5 ve Şekil 4.23-26'da görüldüğü üzere 280 nm'de tespit ve tayin sınırları karşılaştırmasında en iyi dedeksiyona sahip CA proteini ardından İmmüoglobulin G ve ardından BSA ve İnsülin gelmektedir. 595 nm'de ise; en iyi BSA, ardından CA, ve sonra İmmüoglobulin G ve İnsülin gelmektedir.

4.7. On-line HPLC- Bradford Yöntemiyle Farklı Gıda ve İlaç Numunelerinde Kalitatif ve Kantitatif Protein Analizi

1 mg/mL konsantrasyonda bir gıda proteini olan jelatinin geliştirilen on-line HPLC-Bradford Protein Yöntemi ile dedeksiyonu sonucu 595 nm'deki pik kromotogramı 280 nm'ye göre oldukça yüksektir (Şekil 4.27). Tablo 2.2'de de görüldüğü üzere 595 nm dedeksiyonu arttıran bazik amino asitlerce (Arginin, Histidin, Lisin amino asitlerince) zengin 280 nm'ye özgü amino asitlerce (triptofan, tirozin ve sisteince) fakir olan jelatin proteini kromotogramdaki bu yüksek dedeksiyonu desteklemektedir.



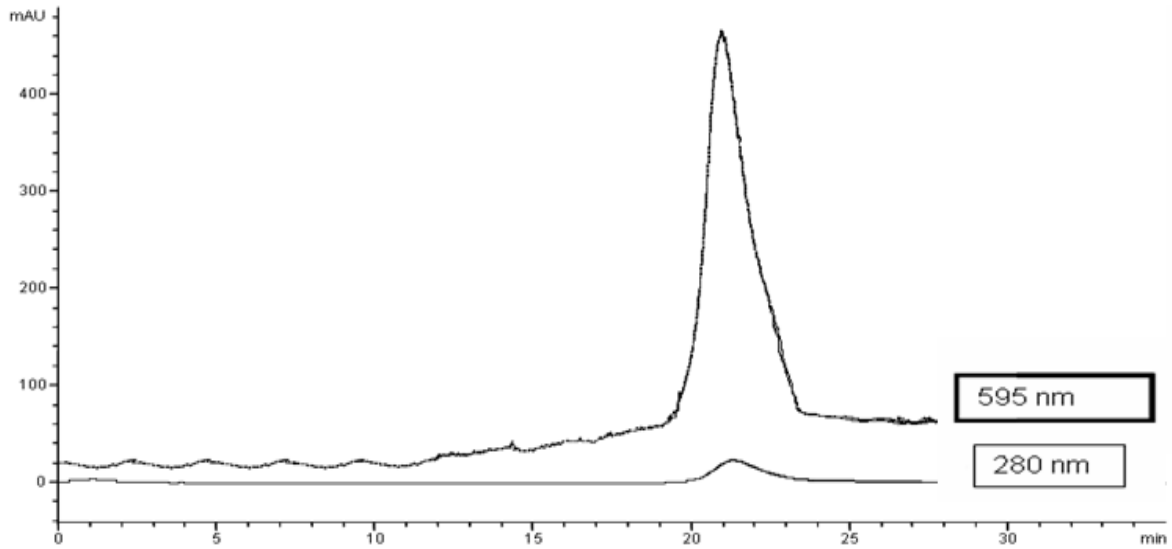
Şekil 4.27. Jelatinin (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm (on-line Bradford)'de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması (595 nm kromatogramı 80 kat küçültülmüştür.)



Şekil 4.28. İnsülinin (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm (on-line Bradford)'de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması

1 mg/mL konsantrasyonda bir ilaç proteini olan insülinin geliştirilen on-line HPLC-Bradford Protein Yöntemi ile dedeksiyonu sonucu 595 nm'deki pik kromotogramı 280 nm'ye göre oldukça yüksektir (Şekil 4.28).

Tablo 2.2'de de görüldüğü üzere 595 nm dedeksiyonu arttıran bazik amino asitlerce (Arginin, Histidin, Lizin amino asitlerince) zengin 280 nm'ye özgü amino asitlerce (triptofan, tirozin ve sisteince) fakir olan jelatin proteini kromotogramdaki bu yüksek dedeksiyonu desteklemektedir. İmmünglobulin G proteininde de benzer durum söz konusudur (Şekil 4.29). İnsülindeki 595 nm ve 280 nm arasındaki fark amino asit kompozisyonundan dolayı jelatin ve İmmünglobulin G proteinine göre daha azdır.



Şekil 4.29. İmmünglobulinin (1 mg/mL) 280 nm ve 595 nm'de alıkonma zamanına göre pik kromotogramı karşılaştırması

Tablo 4.6. Jelatin (1 mg/mL), immünglobulin G (1 mg/mL), insülin (1 mg/mL)'nin 280 ve 595 nm'deki pik alanları

Dalga Boyu	Pik Alanı (mAUxDk)		
	Jelatin(1 mg/mL)	İmmünglobulin G (1 mg/mL)	İnsülin (1 mg/mL)
280 nm	37	1587	813
595 nm	16464	37224	4553

1 mg/mL Jelatin Proteininde 595 nm On-line Bradford dedeksiyonu 280 nm'ye göre 445 kat, aynı konsantrasyonda İmmünglobulin G'ninki 23,5 kat, İnsülinin ki ise 5,6 kat daha iyidir (Tablo 4.6).

4.8. Geliştirilen On-line HPLC-Bradford Yönteminin 280 nm ve 595 nm'de Spektrofotometrik Ölçüme Göre Deneysel Karşılaştırılması

HPLC ile on-line protein deteksiyonunda spektrofotometrik yöntemle göre triptofan, tirozin ve sistein amino asitlerinin molar absorptivite katsayıları (sırasıyla $5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ve Tablo 2.2'deki 280 nm'ye özgü (triptofan, tirozin ve sistein) amino asit sayıları dikkate alındığında eşit konsantrasyonda proteinler için (1 mg/mL) hesaplanan teorik absorbanslara göre BSA proteininde 66 katlık ($=0,7632/0,0116$), CA proteininde 50 katlık ($=1,5123/0,0304$), İmmünglobulin G proteininde 84 katlık ($=1,6584/0,0197$), insülin proteininde 147 katlık ($=1,1048/0,0075$) jelatin proteininde 41 katlık ($=0,0331/0,0008$) bir azalma söz konusuken 280 nm'deki spektrofotometrik deneysel verilerle HPLC 280 nm deneysel verileri karşılaştırıldığında ise BSA için 2 ($=0,0240/0,0116$) kat, CA için 1,5 ($=0,0460/0,0304$) kat, immünglobulin G için 2,7 ($=0,0540/0,0197$) kat, insülin için 1,5 ($=0,0110/0,0075$) kat, jelatin için 94 ($=0,0750/0,0008$) kat on-line yöntemde 280 nm'de bir azalma söz konusudur.

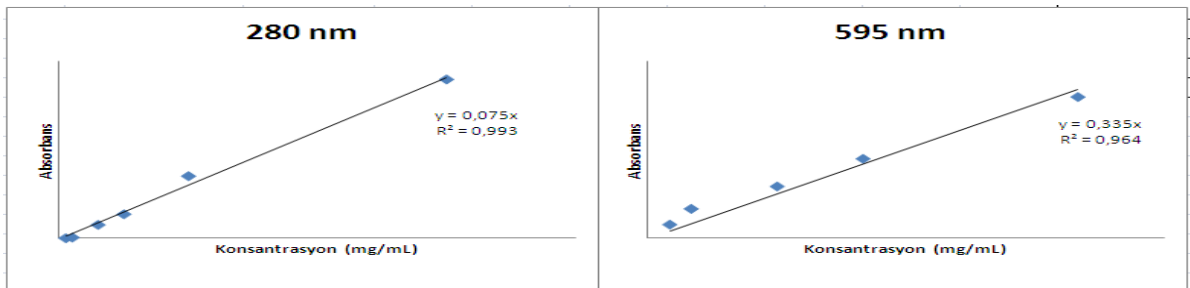
Bu HPLC sistemindeki tübing içinde hareketli akış ortamından dolayı proteinlerin yeterince dedektör sinyaliyle etkileşememesinden dolayıdır. On-line yöntem 595 nm ile spektrofotometrik 595 nm karşılaştırıldığında ise BSA ve CA için sırasıyla 1,42 ($=0,4537/0,3190$) kat ve 1,38 ($=0,3718/0,2680$) kat on-line yöntem daha iyidir. Bu proteinler saf olduğu için metodla oluşan sınırlı protein elüsyonu etkili değildir.

İmmünglobulin G için 1,8 ($=0,4180/0,2337$) kat, insülin için 1,6 ($=0,0580/0,0363$) kat, jelatin için 8,4 ($=0,3350/0,0400$) kat on-line yöntemde off-line spektrofotometrik 595 nm'ye göre bir azalma söz konusudur. (Tablo 4.7).

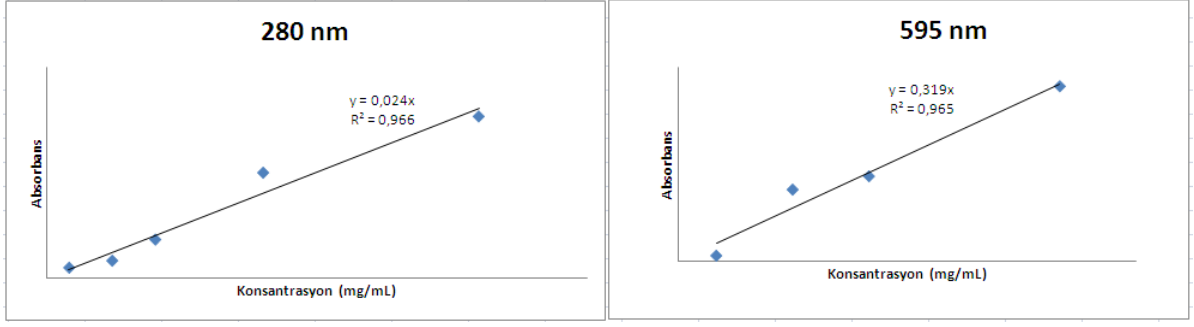
Bu on-line uygulamadaki protein ile reaktifin tubing içindeki kısıtlı reaksiyon süresi ve bu proteinler saf olmadıkları için on-line uygulamadaki metodla belirlenen sınırlı protein elüsyon süreside etkilidir. Dolayısıyla kolonda geç ayrılan dedeksiyon limitlerinin altında dedekte edilemeyen küçük protein fragmentleri de vardır. 595 nm dedeksiyonunda protein safsızlığı 280 nm'ye göre daha az etkilidir.

Tablo 4.7. 280 nm ve 595 nm için pH 7,0 fosfat tamponu çözücü matrisinde HPLC'de on-line ve spektrofotometrede off-line uygulamalardaki proteinlerin absorbans karşılaştırılması

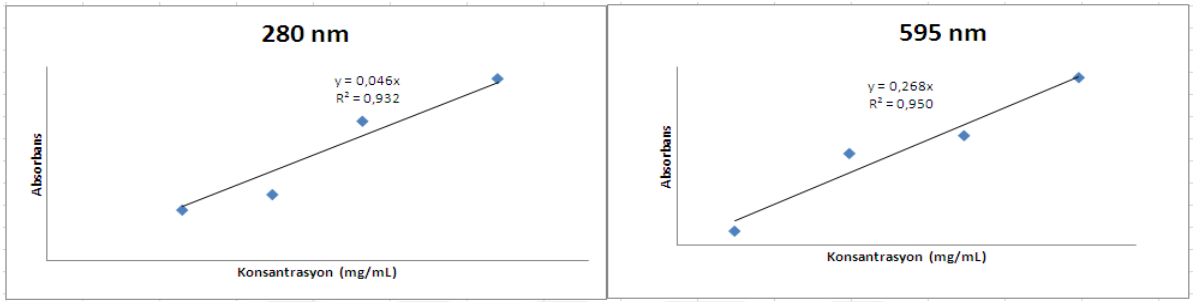
Proteinler (1 mg / mL)	Absorbanslar				
	Deneysel (HPLC'de) DAD 280 nm	Teorik Hesaplanan 280 nm (tirozin, triptofan, sistein amino asitleri ve molar absorptivite katsayıları baz alınarak)	Deneysel 280 nm (spektrofotometrede)	Deneysel (HPLC'de on-line) UV595 nm	Deneysel 595 nm (spektrofotometre'de off-line)
BSA	0,0116	0,7632	0,0240	0,4537	0,3190
CA	0,0304	1,5123	0,0460	0,3718	0,2680
İmmünglobulin G	0,0197	1,6584	0,0540	0,2337	0,4180
İnsülin	0,0075	1,1048	0,0110	0,0363	0,0580
Jelatin	0,0008	0,0331	0,0750	0,0400	0,3350



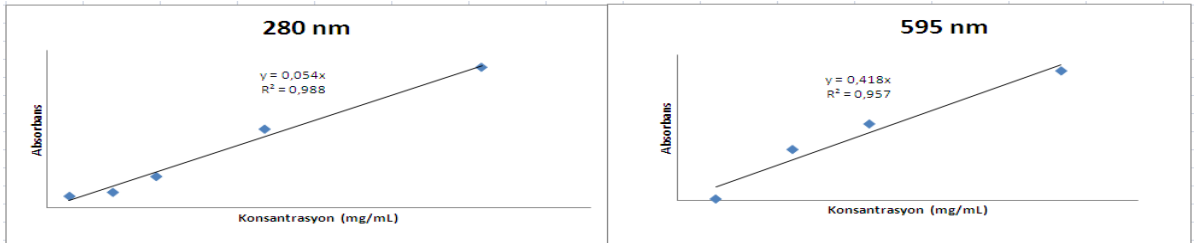
Şekil 4.30. Jelatinin pH 7 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbans karşılaştırması



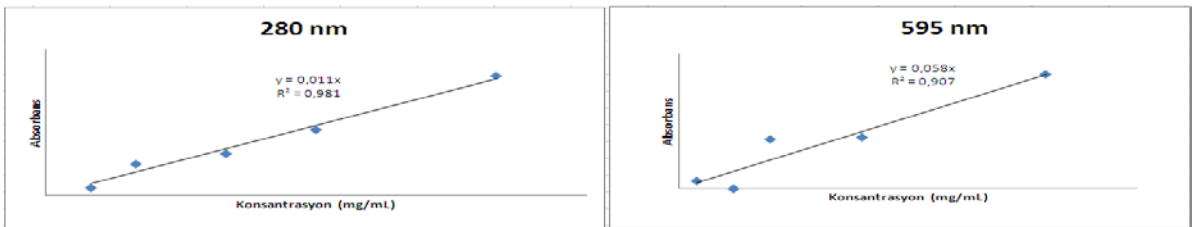
Şekil 4.31. BSA'nın pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbanans karşılaştırması



Şekil 4.32. CA'nın pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbanans karşılaştırması



Şekil 4.33. İmmünglobulin G'nin pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbanans karşılaştırması



Şekil 4.34. İnsülin'in pH 7,0 fosfat tampon ortamında spektrofotometrik olarak 280 ve 595 nm'de konsantrasyona karşı absorbanans karşılaştırması

Şekil 4.23-34'deki spektrofotometrik grafiksel eğimler ve Tablo 4.7 dikkate alınmak üzere jelatin için spektrofotometrik 595 nm'deki eğimle 280 nm'deki eğim oranı $0,335/0,075=4,5$ kat olduğu için Tablo 4.7' deki on-line yöntemde $595 \text{ nm}/280 \text{ nm} =0,0400/0,0008=50$ kat olduğu için, BSA için spektrofotometrik 595nm'deki eğimle 280 nm'deki eğim oranı $0,319/0,024=13,3$ kat olduğu için, Şekil 4.23'teki on-line yöntemde ise eğimler oranı $595 \text{ nm}/280 \text{ nm} =453,74/11,634=39$ kat olduğu için, CA için spektrofotometrik 595 nm'deki eğimle 280 nm'deki eğim oranı $0,268/0,046=5,8$ kat olduğu için, Şekil 4.24'teki on-line yöntemde ise eğimler oranı $595 \text{ nm} / 280 \text{ nm} =371,75/30,448=12,2$ kat olduğu için, immünglobulin G için spektrofotometrik 595 nm'deki eğimle 280 nm'deki eğim oranı $0,418/0,054=7,7$ kat olduğu için, Şekil 4.25'teki on-line yöntemde ise eğimler oranı $595 \text{ nm}/280 \text{ nm} =233,72/19,735=11,8$ kat olduğu için, insülin için spektrofotometrik 595 nm'deki eğimle 280 nm'deki eğim oranı $0,058/0,011=5,3$ kat olduğu için, Şekil 4.26'daki on-line yöntemde ise eğimler oranı $595 \text{ nm}/280 \text{ nm} =36,349/7,52=4,8$ kat olduğu için, tüm proteinlerle spektrofotometrik ve geliştirilen on-line HPLC 595 nm dedeksiyonu 280 nm'ye göre çok daha iyidir.

Ayrıca geliştirilen on-line HPLC 595 nm'deki Bradford protein tayin yöntemi spektrofotometrik 595 nm Bradford yöntemine göre çok daha iyi, kullanışlı ve avantajlıdır, aynı anda 595 nm ve 280 nm dedeksiyonu yapılabilir.

Geliştirilen on-line HPLC Bradford yöntemi jelatin için 11,1 ($=50/4,5$) kat, BSA için 2,9 ($=39/13,3$) kat, CA için 2,1 ($=12,2/5,8$) kat, immünglobulin G için 1,5 ($=11,8/7,7$) kat spektrofotometrik Bradford yönteminden daha iyidir.

Coomassie Brilliant Blue G250 boyasının bazik amino asitlere bağlanma kararlılığından yola çıkılarak geliştirilen Ku ve arkadaşları tarafından 2013'te yapılan hesaplama modeli modifiye edilerek boyanın bağlanma kararlılığı incelendi.

Tablo 4.8'de görüldüğü üzere proteinlerin molekül ağırlığı küçüldükçe birim hacme düşen boya miktarı sitokiyometrik olarak arttığı için Comassie Brilliant Blue G250 boyasına olan bağlanma artıyor. Spektrofotometrede protein numunesiyle birleşen boyayla çarpışan moleküller daha fazla bir yüzeyi kaplamaktadır ve daha çok çarpışmaktadır fakat on-line HPLC-Bradford yönteminde ise etkileşim çok küçük bir yüzeyle (tübing) ve kısa süreyle (akış ve metod) sınırlandırılmıştır, bu yüzden boyayla bağlanan arjinin, lizin ve histidin amino asidi miktarı spektrofotometrik yöntemde daha fazladır.

Tablo 4.8. İki farklı Yöntemin (Spektrofotometrik (off-line) ve On-line HPLC) matematiksel normalizasyonla % sitokiyometrik protein-Comassie Brilliant Blue G250 bağlanma oranı karşılaştırılması (Ku ve arkadaşları tarafından 2013'te yapılan hesaplama modeli modifiye edildi).

Proteinler (10 mg / mL)	n: amino asit sayısı, ($\epsilon_{280}/\epsilon_{595}$) _{on-line} : on-line yöntemdeki 280 nm ve 595 nm'deki eğimler oranı, ($\epsilon_{280}/\epsilon_{595}$) _{off-line} : off-line yöntemdeki 280 nm ve 595 nm'deki eğimler oranı, C: protein konsantrasyonu, M _a : protein molekül ağırlığı	
	$\frac{\{n(\text{Arg})+n(\text{Lys})+n(\text{His})\}}{\{n(\text{Trp})+n(\text{Tyr})+n(\text{Cys})\}} \times (\epsilon_{280}/\epsilon_{595})_{\text{on-line}} \times (C/M_a) \times 100$	$\frac{\{n(\text{Arg})+n(\text{Lys})+n(\text{His})\}}{\{n(\text{Trp})+n(\text{Tyr})+n(\text{Cys})\}} \times (\epsilon_{280}/\epsilon_{595})_{\text{off-line}} \times (C/M_a) \times 100$
BSA (66,4 kDa)	$6,8 \times 10^{-4}$	$19,9 \times 10^{-4}$
CA (28,8 kDa)	$73,1 \times 10^{-4}$	153×10^{-4}
İmmünglobulin G (42,6 kDa)	$35,8 \times 10^{-4}$	$54,8 \times 10^{-4}$
İnsülin (5,73 kDa)	463×10^{-4}	425×10^{-4}

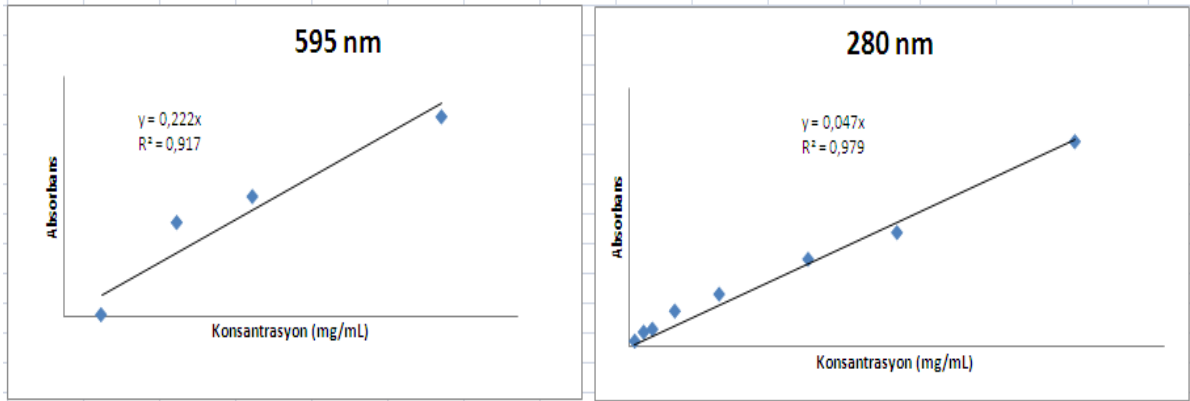
4.9. Spektrofotometrik Bradford Yönteminin Organik Çözücülerle On-line HPLC Protein Uygulamalarına Model Olarak Denenmesi

C₁₈ ve boyut dışarılama kolonda izokratik veya gradient uygulamalarla protein dedeksiyonuna ışık tutması amacıyla C₁₈ ve boyut dışarılama HPLC uygulamalarında en çok tercih edilen çözücü karışımları (metanol ve % 0,1 formik asit, etanol ve % 0,1 formik asit, ACN (asetonitril) ve % 0,1 formik asit, pH 7,0 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl karışımları (Maes vd., 2014) ve BSA, CA, immünglobulin G, insülin proteinleri spektrofotometrik olarak Bradford protein tayin yöntemiyle on-line HPLC-protein tayin yöntemine model olması amacıyla (0,5 mL/dk çözücü akışı, 0,3 mL/dk reaktif akışı ve 20 µL protein enjeksiyonu oranları baz alınarak) çözücü % kompozisyonu ya da tampon konsantrasyonu veya pH değiştirilerek denenmiştir.

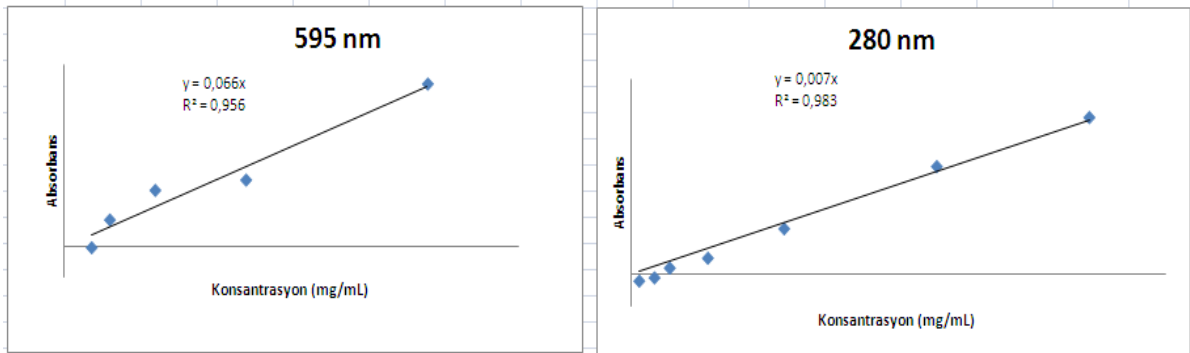
Organik çözücülerle birlikte kullanılan formik asit asidik şartlar sağlayıp peptid stabilizasyonunu sağlar ve arjinin ve lizin kalıntılarının amino gruplarının protonlanmasını sağlayarak dimer oluşumunu engelleyen nükleofilik etki gösterir (Maes vd., 2014).

Her proteinin 8 farklı konsantrasyonda (10, 6, 4, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,1 mg/mL) 280 nm ve Bradford reaktifiyle birleştikten sonra 595 nm’de spektrofotometrik olarak absorpsanları okundu ve ayrıca 280 nm’de de absorpsanlar spektrofotometrik olarak okundu, ardından kalibrasyon grafikleri farklı etanol, metanol ve asetonitril yüzdeleri için oluşturuldu (Şekil 35-74’te farklı asetonitril yüzdeleri ve % 0,1 formik asit karışımı kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri örnek olarak verilmiştir).

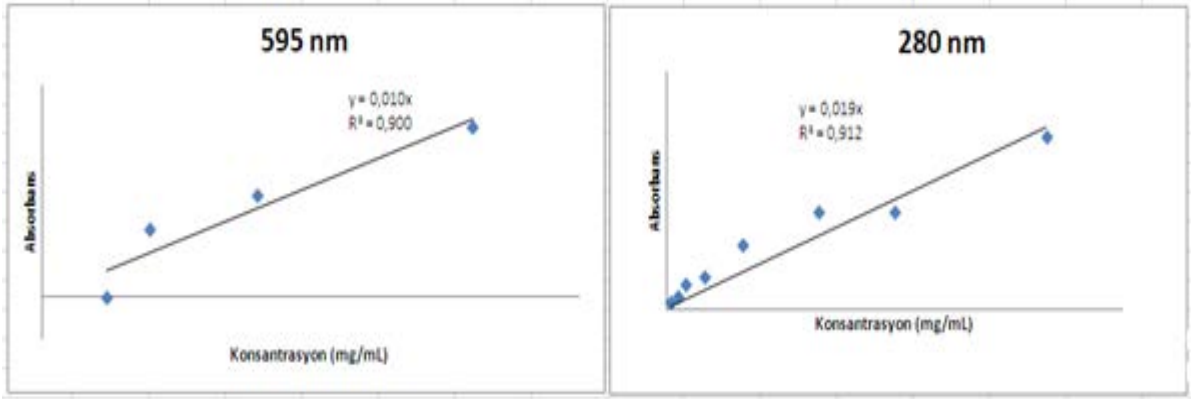
Kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimler kullanılarak eğimlere karşı % organik çözücü veya tampon konsantrasyonu, pH grafikleri oluşturuldu, böylece en etkin 595 nm absorpsanına karşın organik çözücü yüzdesi veya tampon konsantrasyonu ve pH hem gradient hem de izokratik uygulamalar için model teşkil edecek şekilde belirlenmiştir (Şekil 75-90).



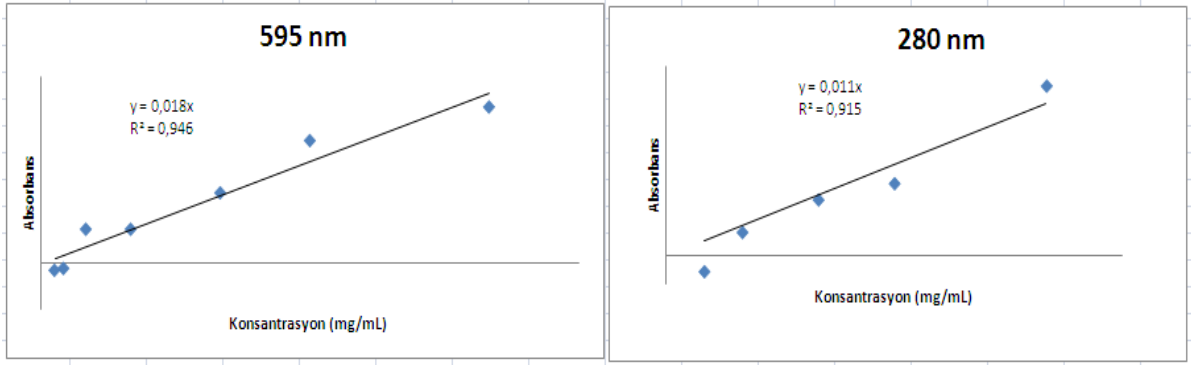
Şekil 4.35. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorpsan grafiği karşılaştırması



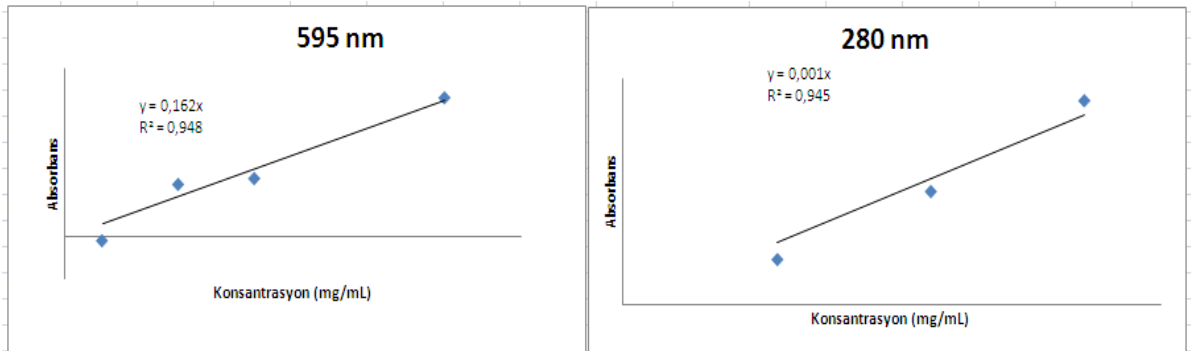
Şekil 4.36. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorpsan grafiği karşılaştırması



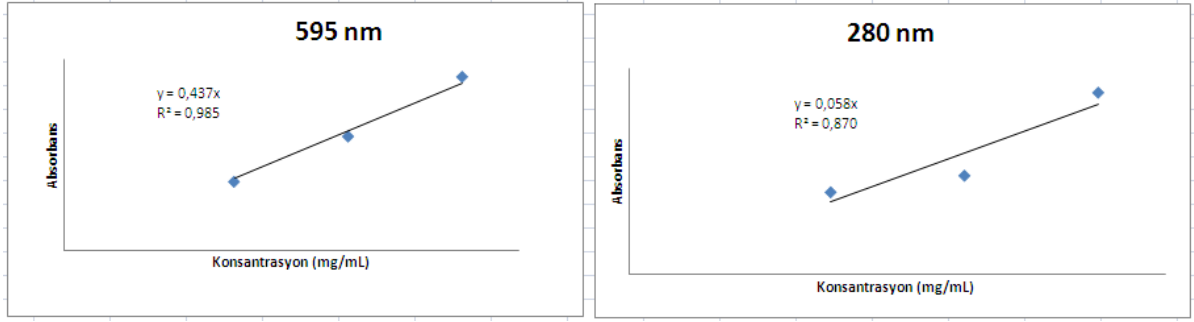
Şekil 4.37. % 0 ACN % 0,1 formik asit, % 99,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



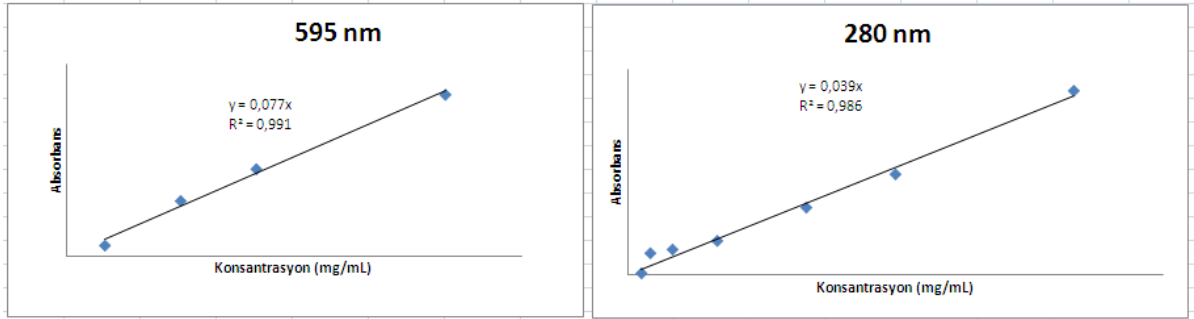
Şekil 4.38. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



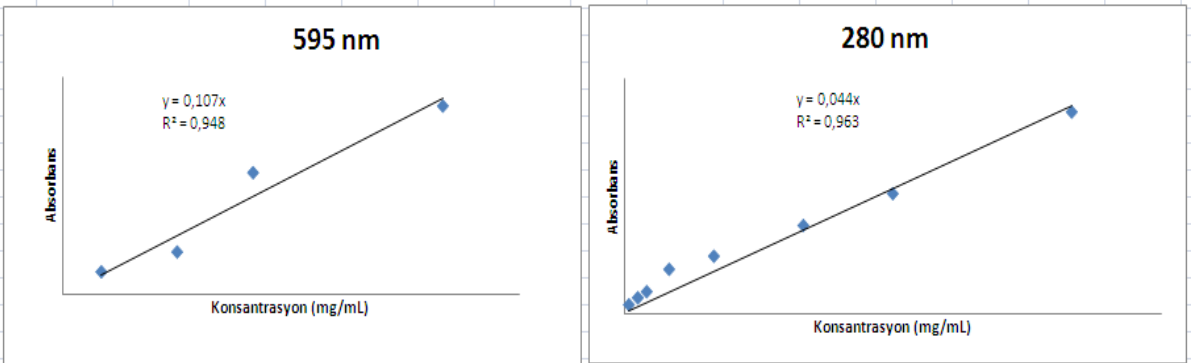
Şekil 4.39. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



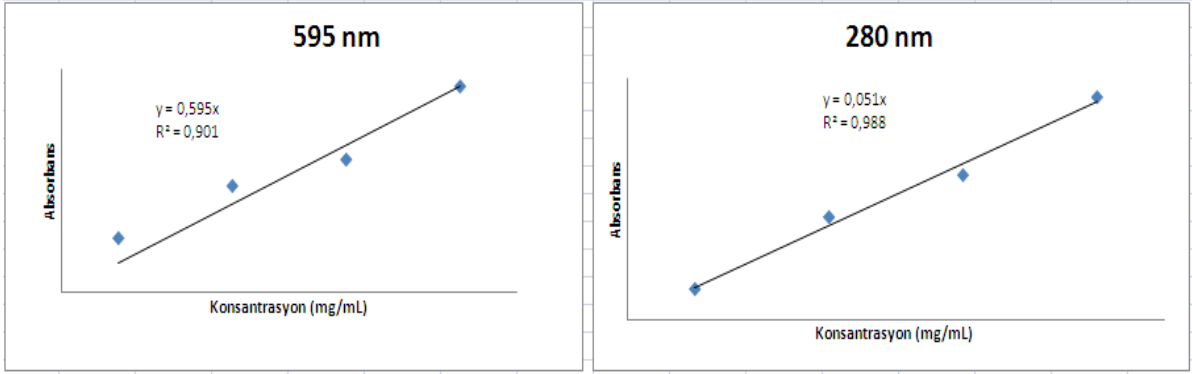
Şekil 4.40. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



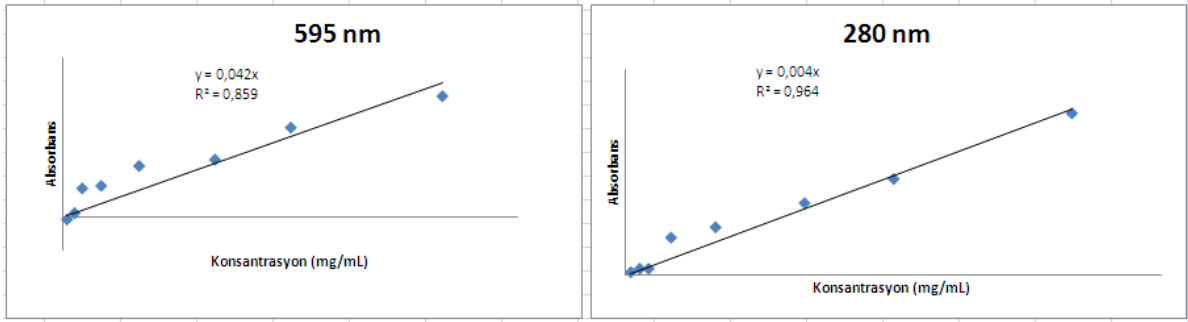
Şekil 4.41. % 1 ACN % 0,1 formik asit, % 98,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



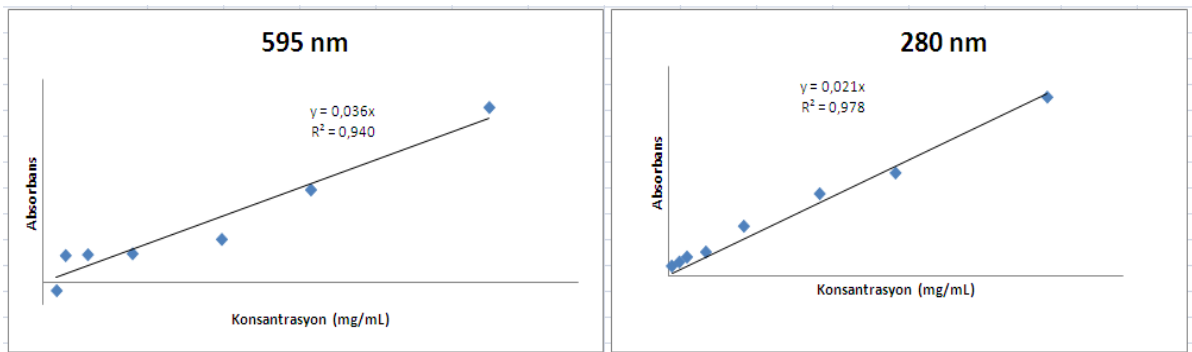
Şekil 4.42. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



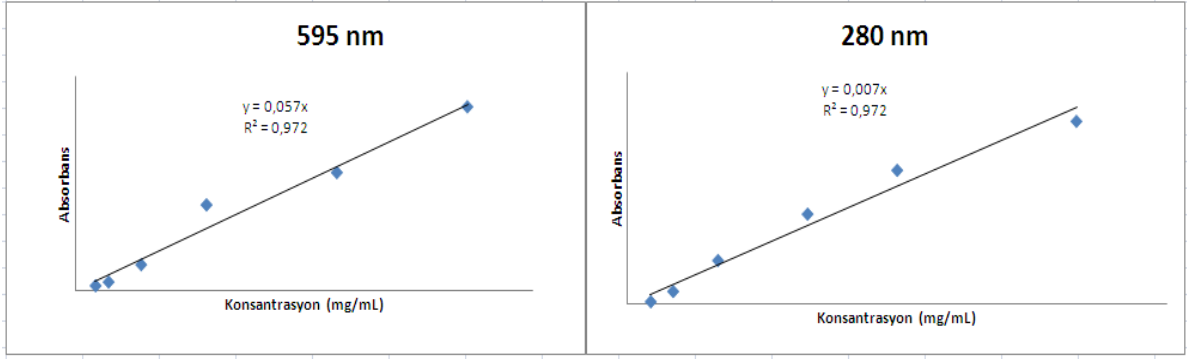
Şekil 4.43. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbans grafiği karşılaştırması



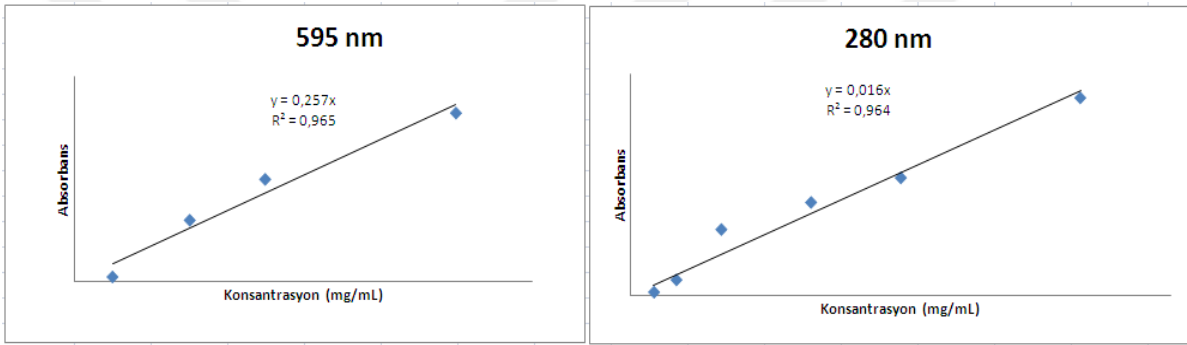
Şekil 4.44. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbans grafiği karşılaştırması



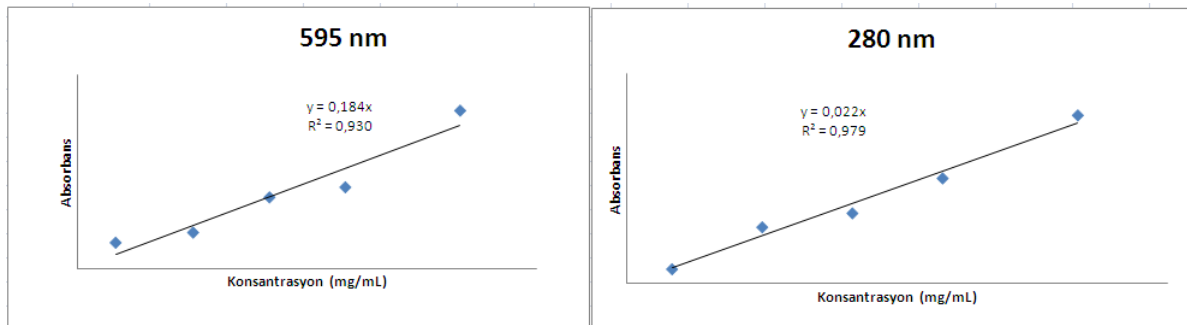
Şekil 4.45. % 3 ACN % 0,1 formik asit, % 96,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbans grafiği karşılaştırması



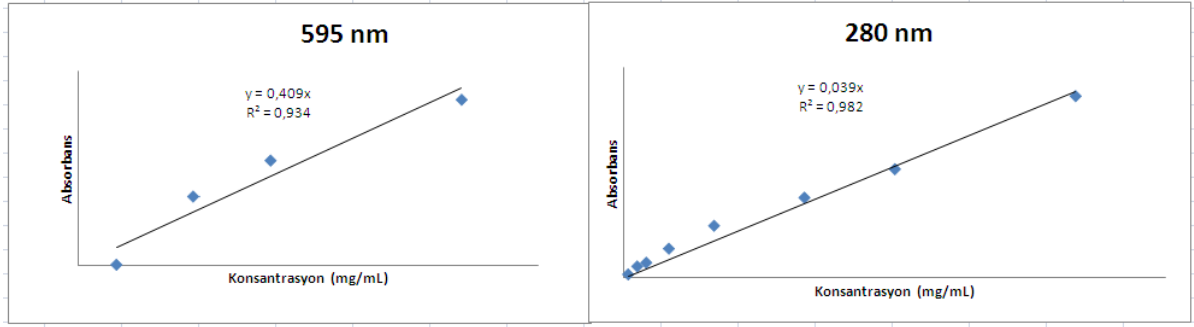
Şekil 4.46. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



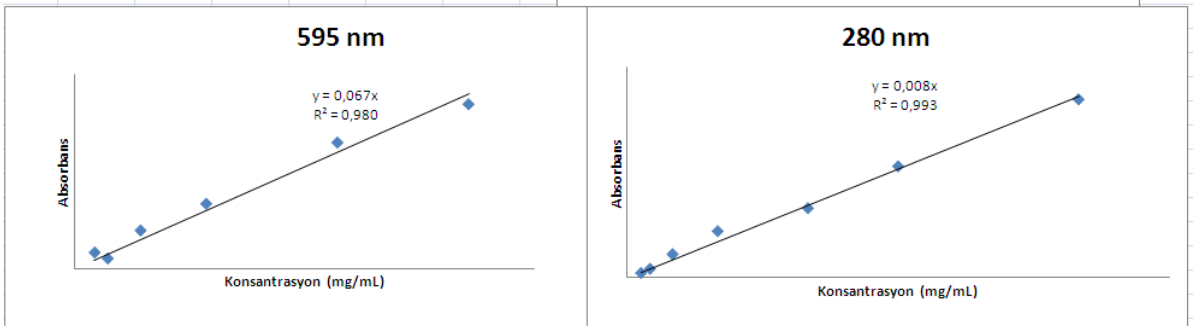
Şekil 4.47. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



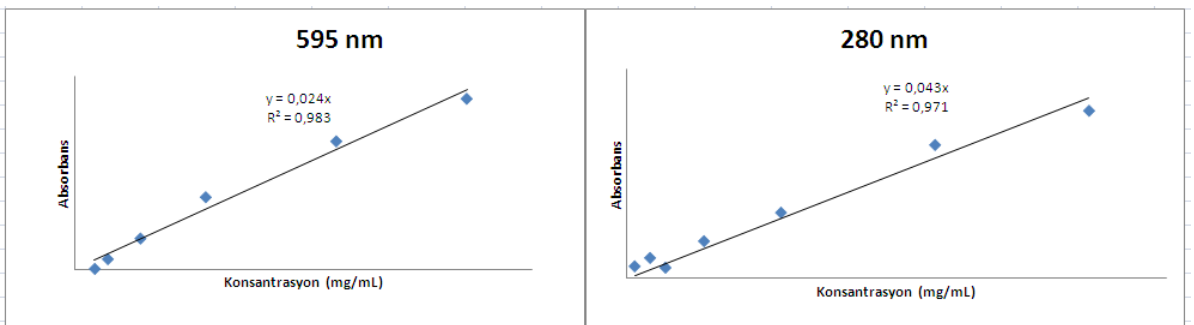
Şekil 4.48. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



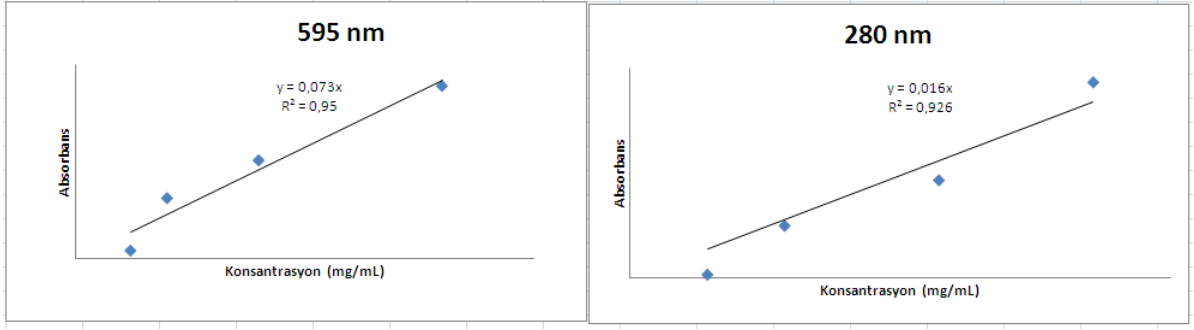
Şekil 4.49. % 5 ACN % 0,1 formik asit, % 94,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



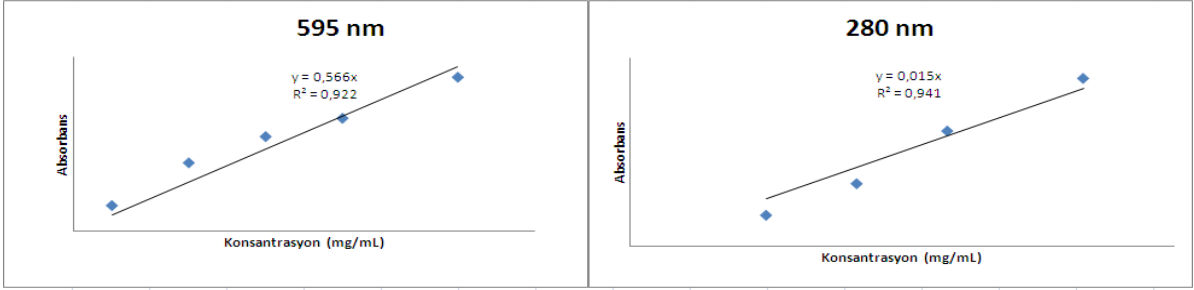
Şekil 4.50. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



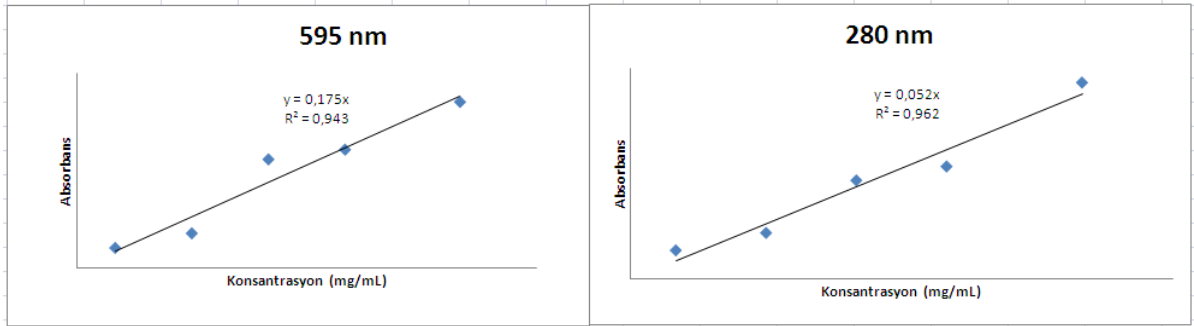
Şekil 4.51. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



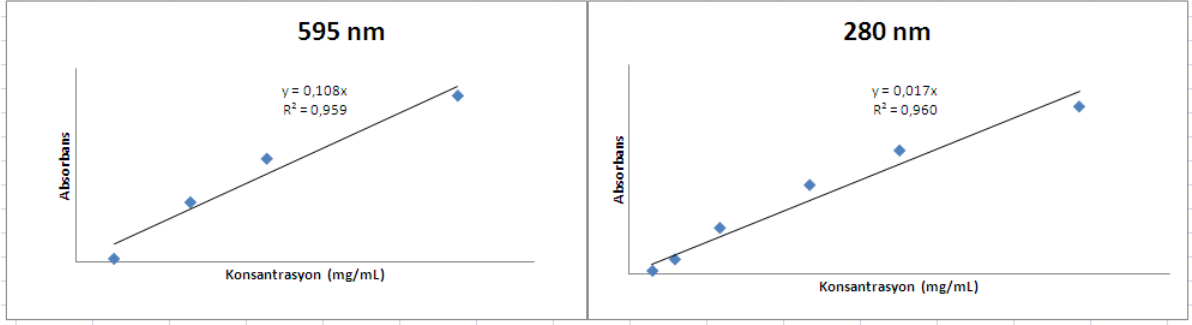
Şekil 4.52. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



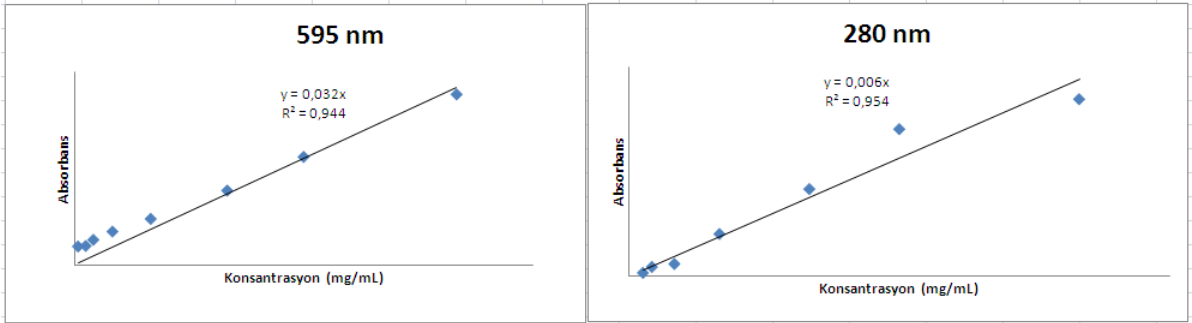
Şekil 4.53. % 10 ACN % 0,1 formik asit, % 89,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



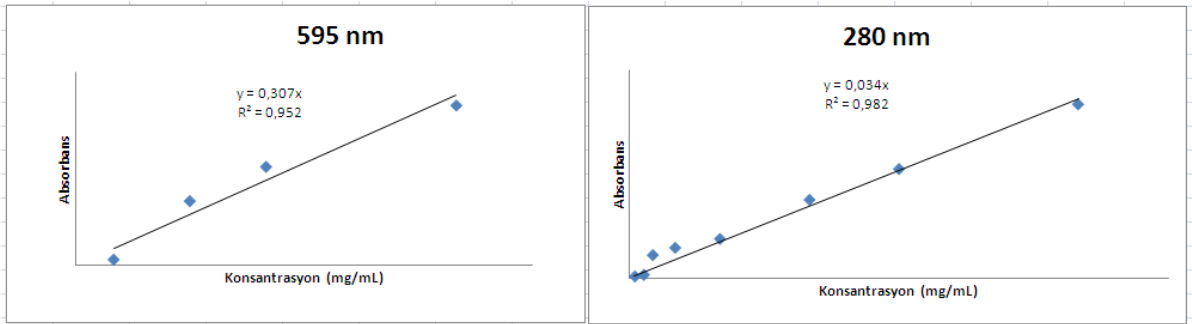
Şekil 4.54. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



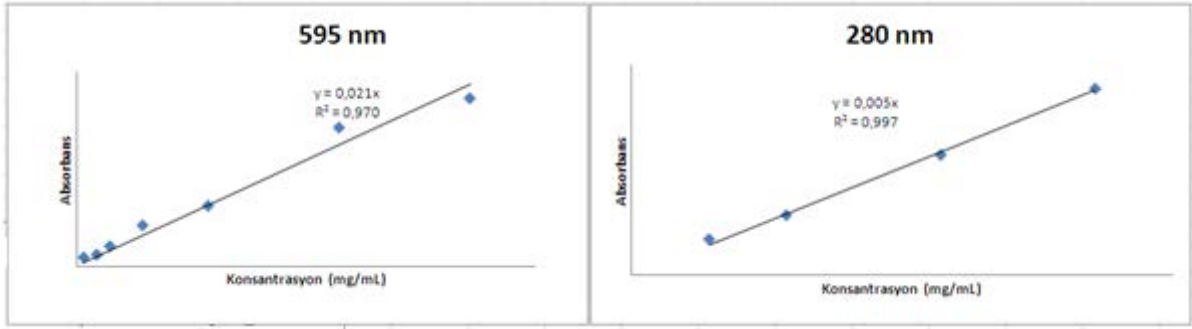
Şekil 4.55. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



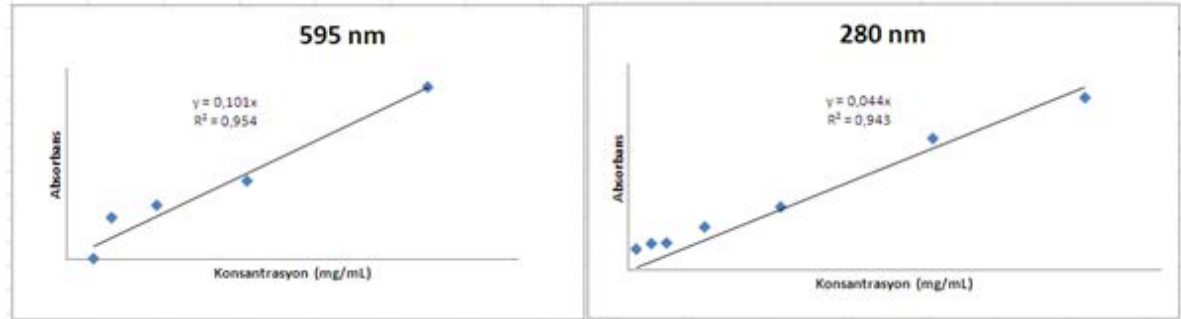
Şekil 4.56. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



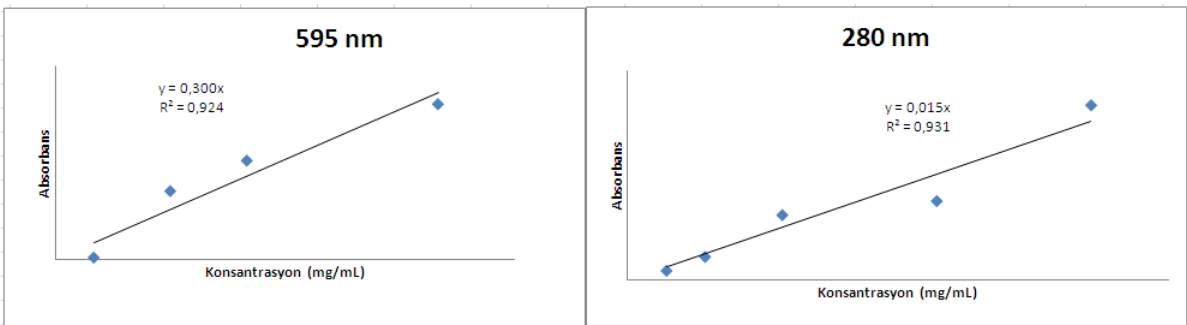
Şekil 4.57. % 15 ACN % 0,1 formik asit, % 84,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



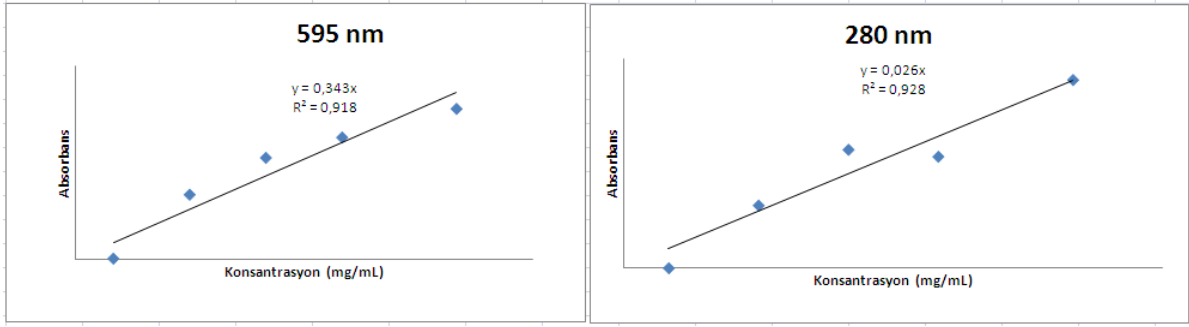
Şekil 4.58. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması



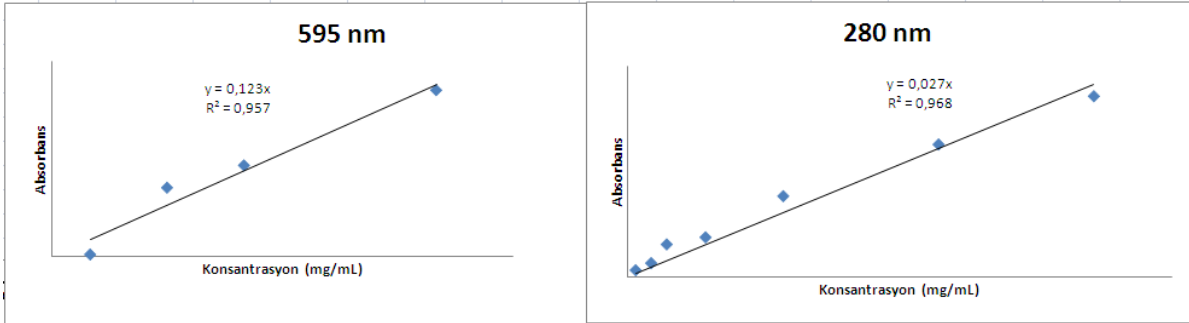
Şekil 4.59. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması



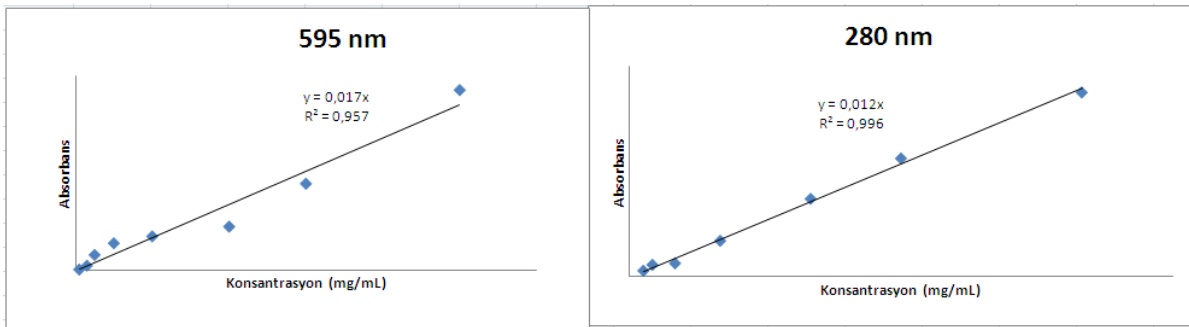
Şekil 4.60. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbens grafiği karşılaştırması



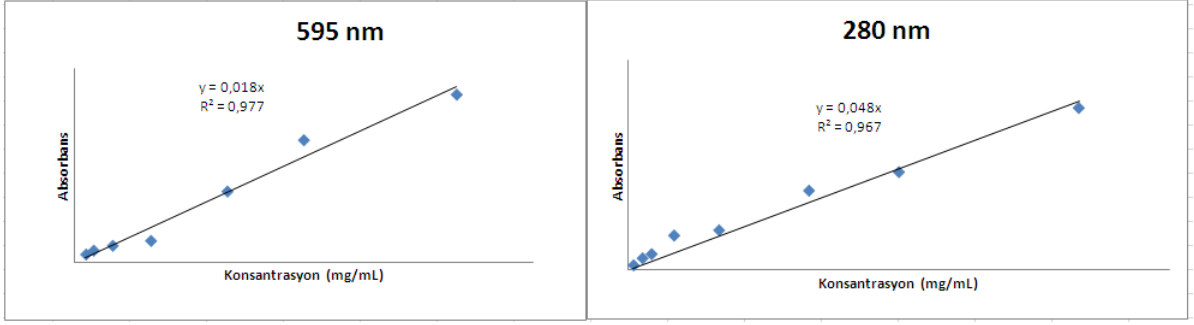
Şekil 4.61. % 20 ACN % 0,1 formik asit, % 79,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



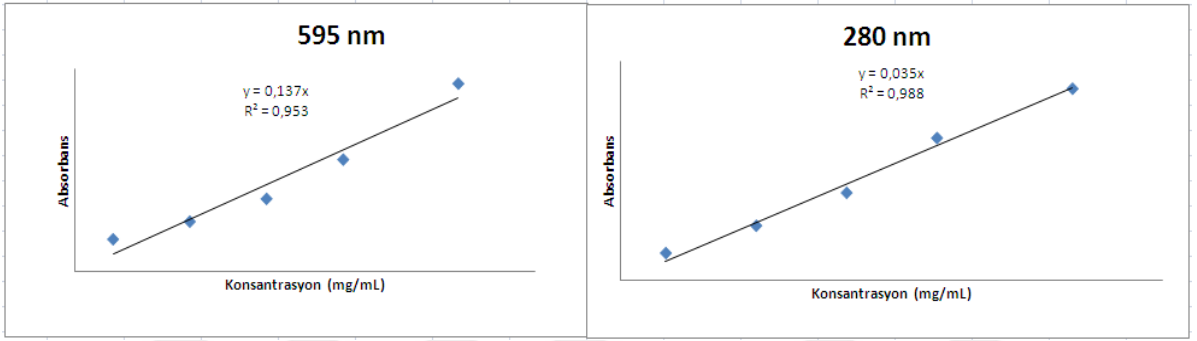
Şekil 4.62. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



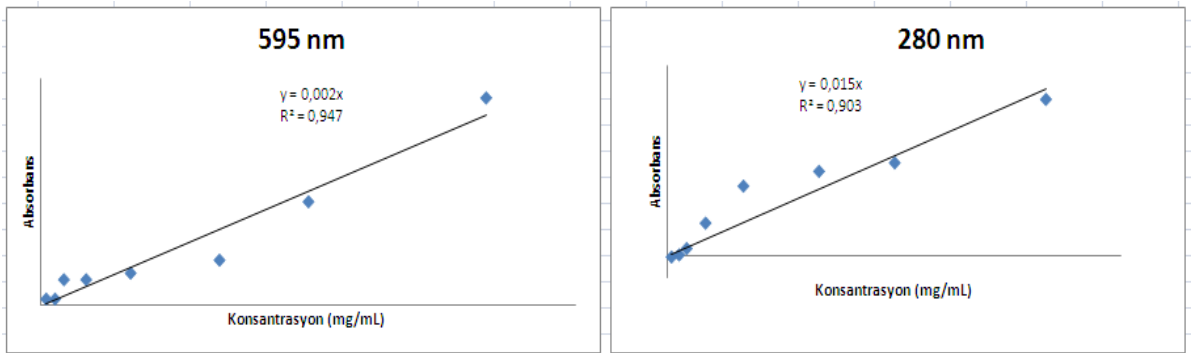
Şekil 4.63. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanst grafiği karşılaştırması



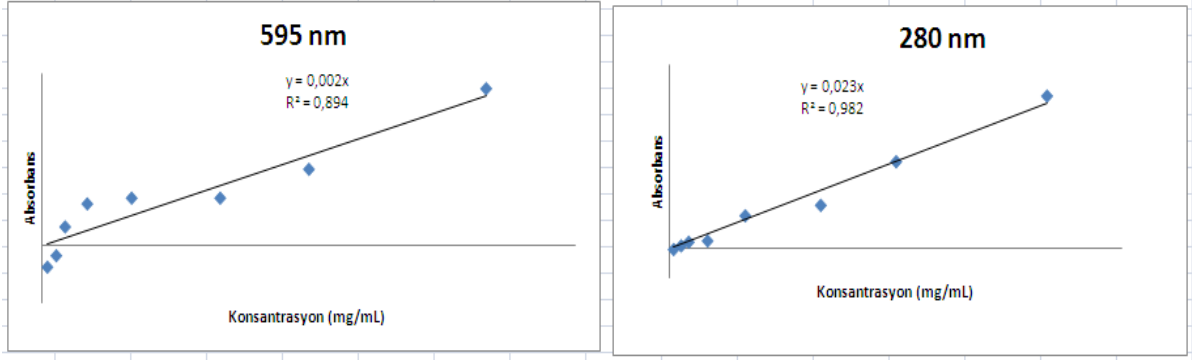
Şekil 4.64. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



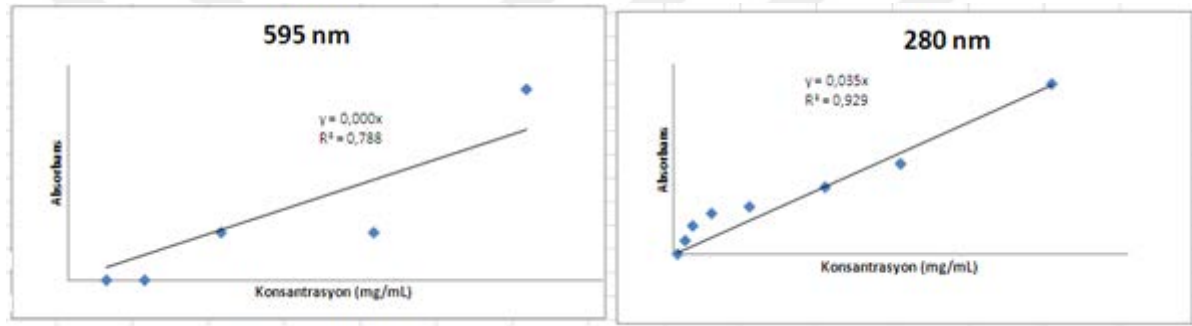
Şekil 4.65. % 30 ACN % 0,1 formik asit, % 69,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda CA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



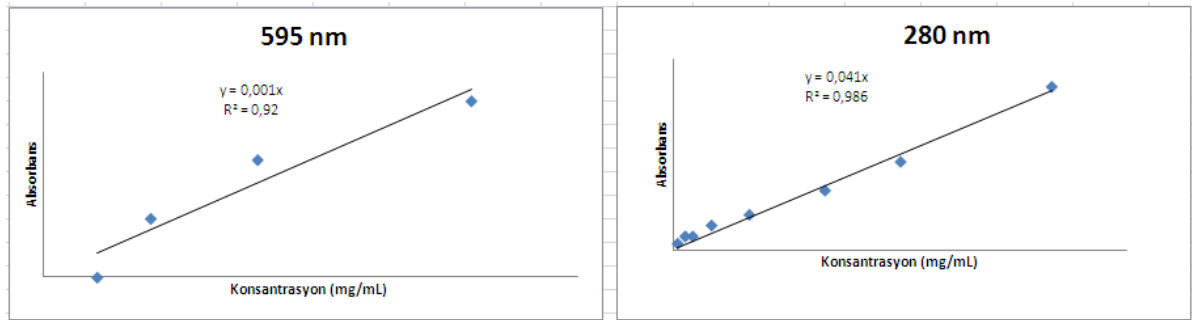
Şekil 4.66. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbands grafiği karşılaştırması



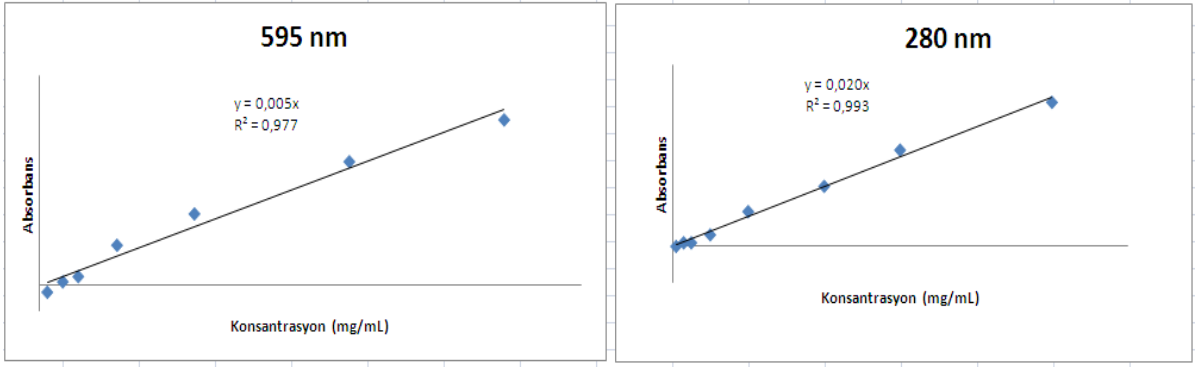
Şekil 4.67. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



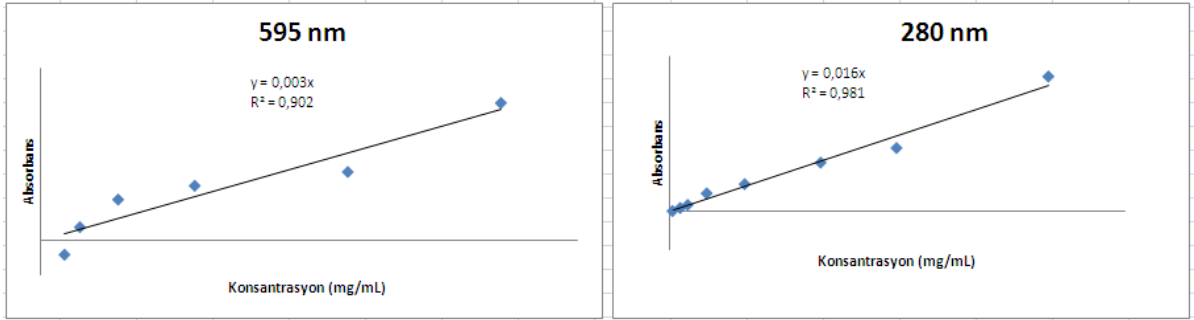
Şekil 4.68. % 50 ACN % 0,1 formik asit, % 49,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



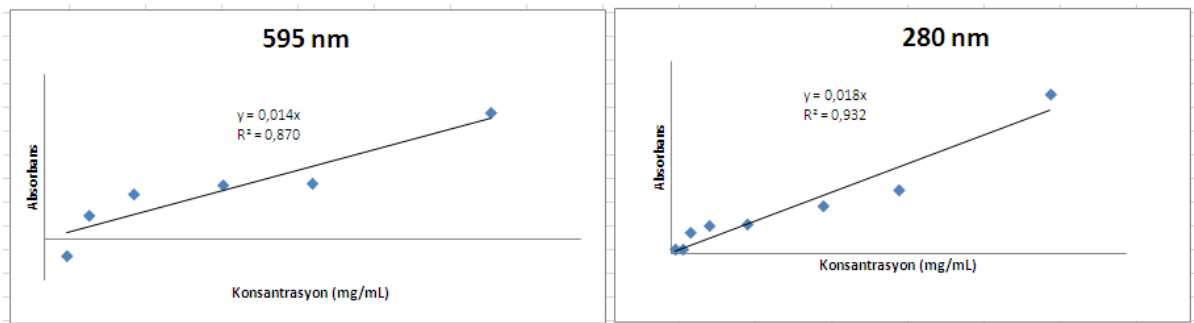
Şekil 4.69. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda immünglobulin G proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorban grafiği karşılaştırması



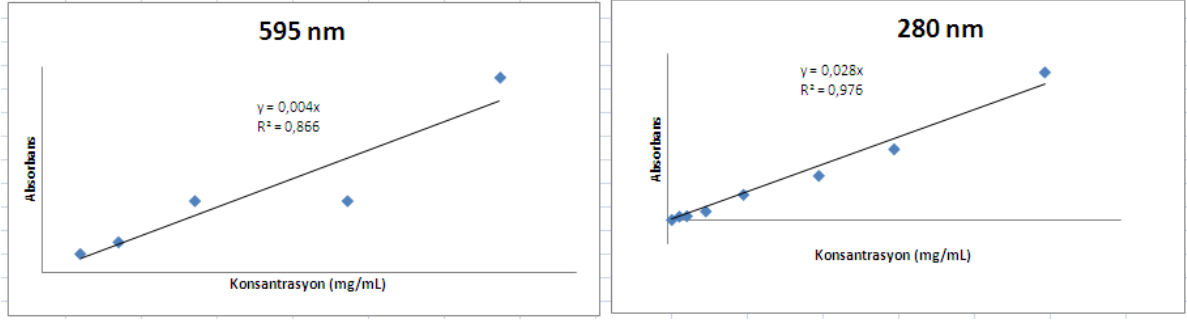
Şekil 4.70. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



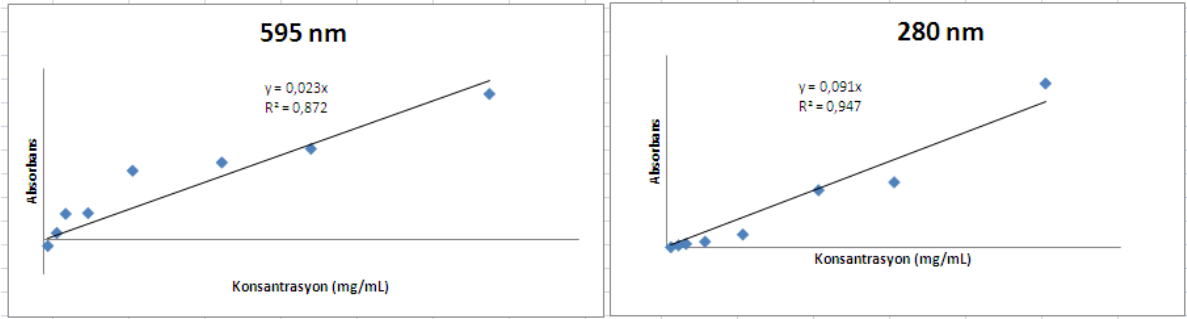
Şekil 4.71. % 70 ACN % 0,1 formik asit, % 29,9 su çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



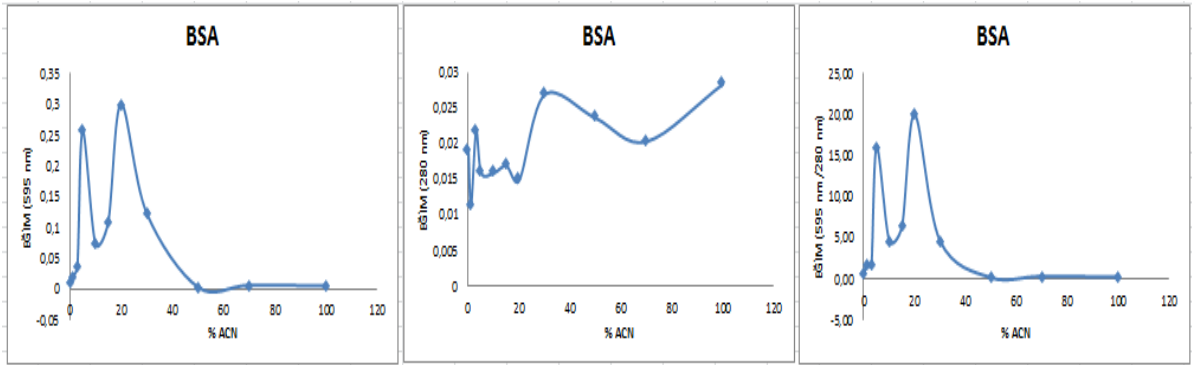
Şekil 4.72. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda insülin proteini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbanans grafiği karşılaştırması



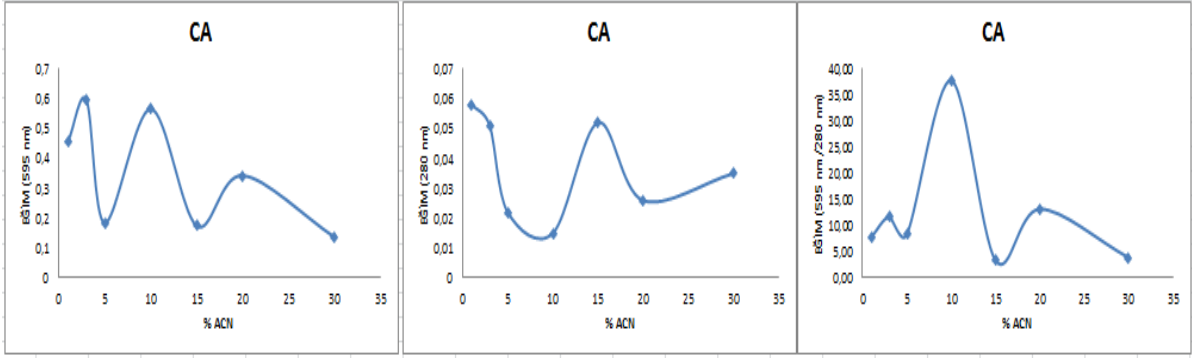
Şekil 4.73. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda BSA proteinini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbans grafiği karşılaştırması



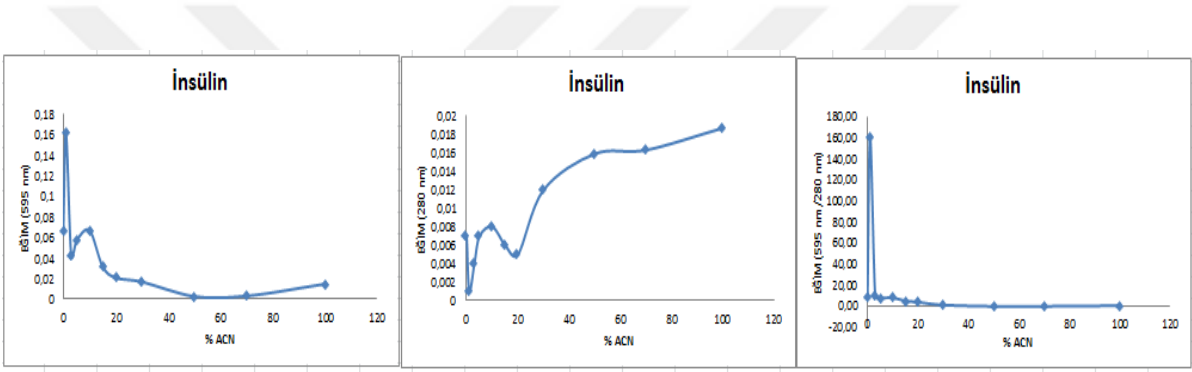
Şekil 4.74. % 99.9 ACN % 0,1 formik asit çözücü karışımı ile HPLC C₁₈ kolonda İmmünglobulin G proteinini ayrılması model alındığında spektrofotometrik olarak 595 ve 280 nm dedeksiyonu için konsantrasyona karşı absorbans grafiği karşılaştırması



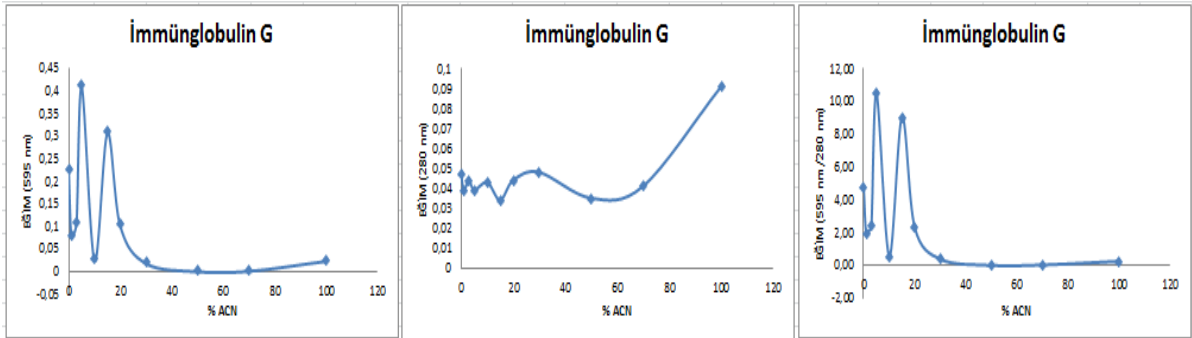
Şekil 4.75. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



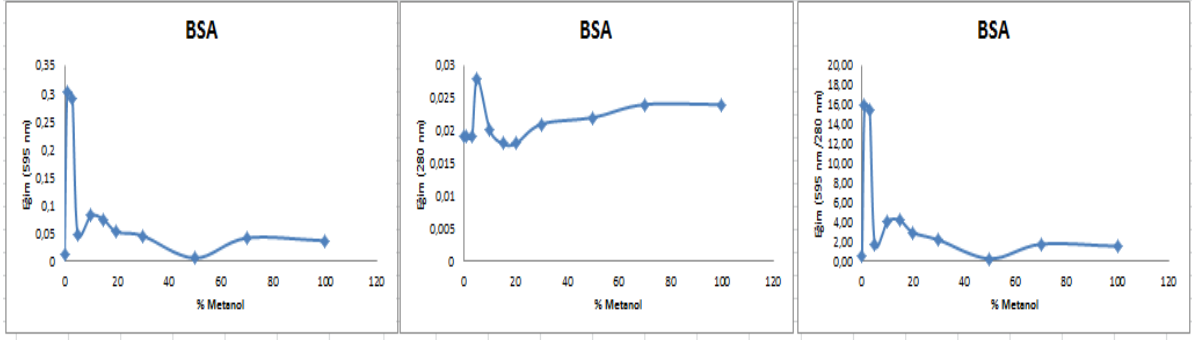
Şekil 4.76. CA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



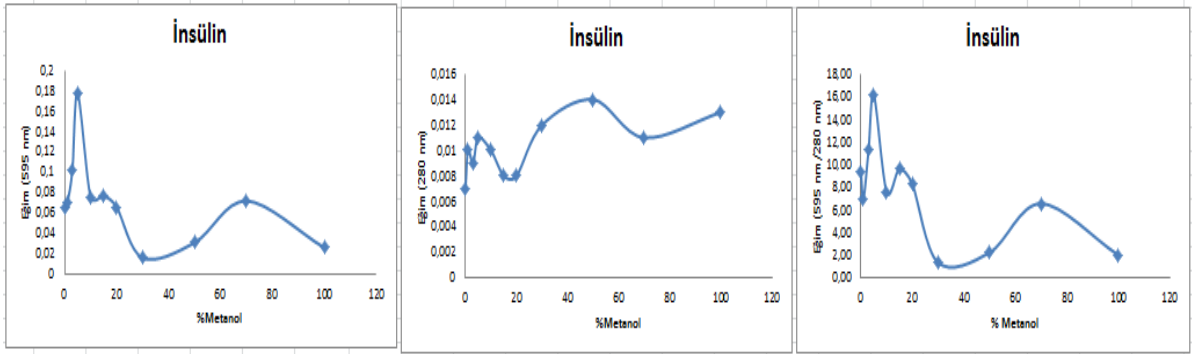
Şekil 4.77. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



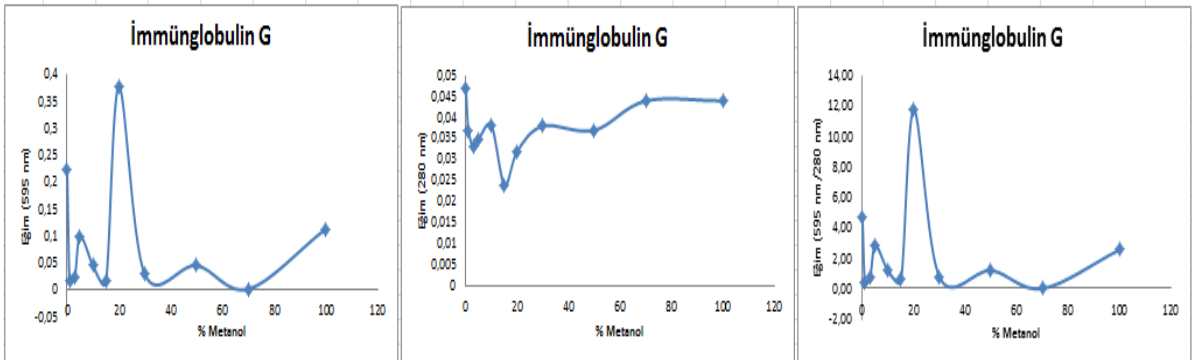
Şekil 4.78. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı ACN çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



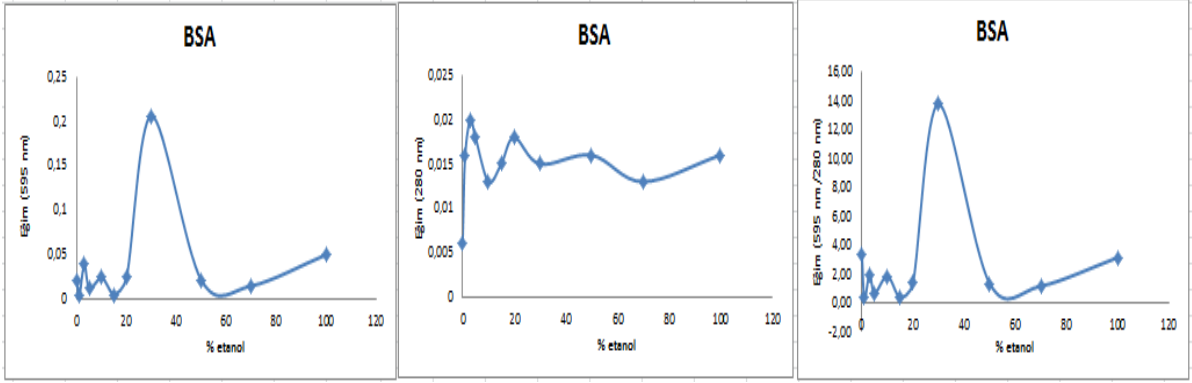
Şekil 4.79. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



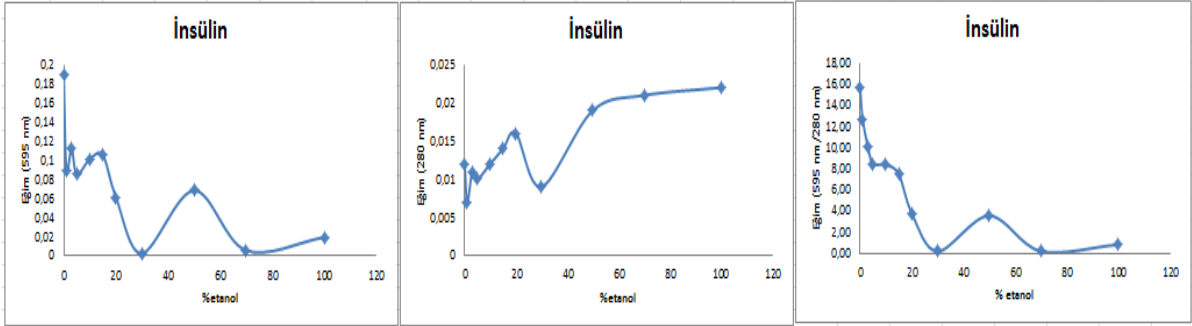
Şekil 4.80. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



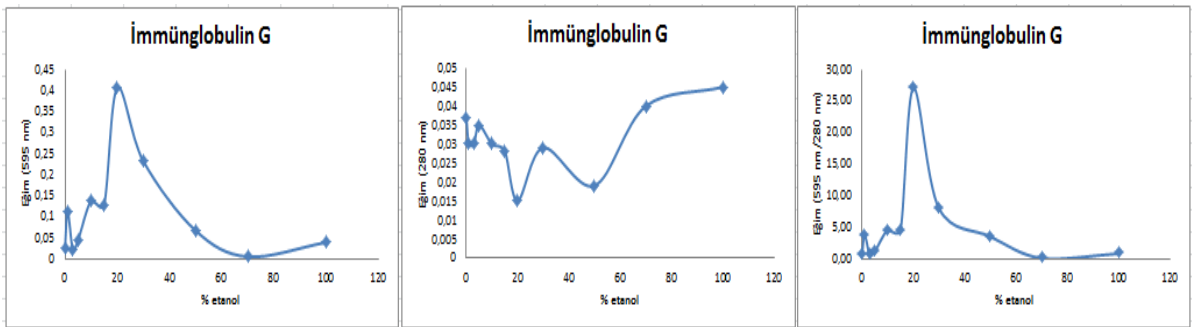
Şekil 4.81. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı metanol çözücü yüzdelerine karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



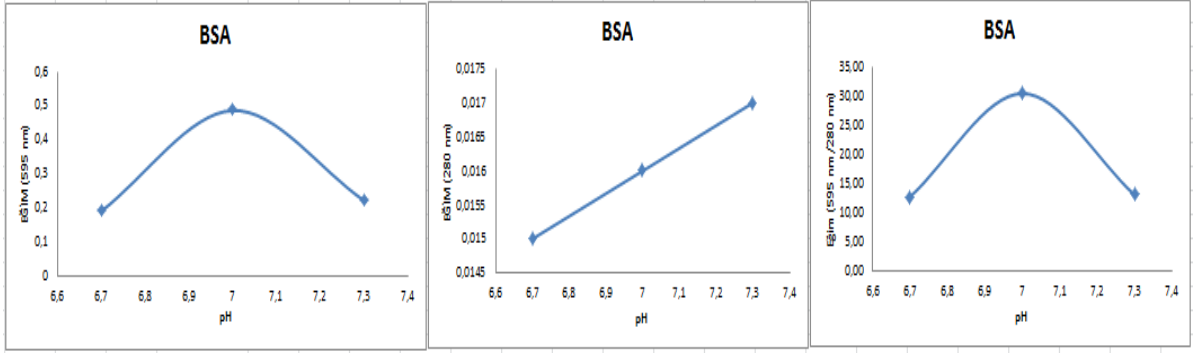
Şekil 4.82. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



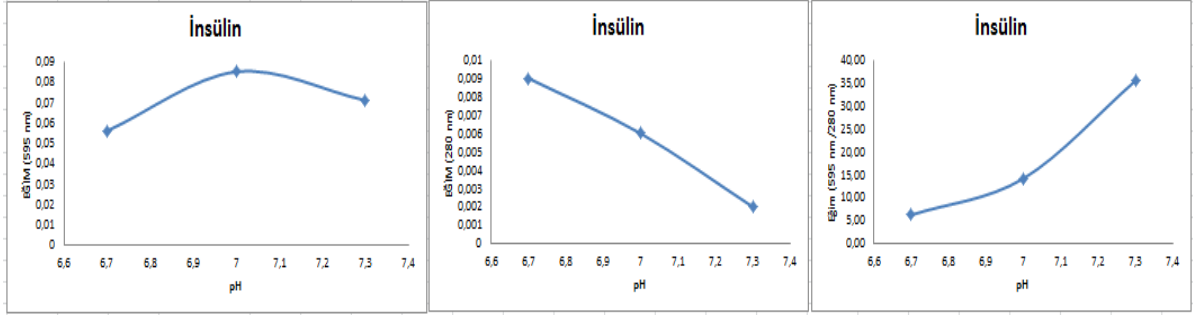
Şekil 4.83. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



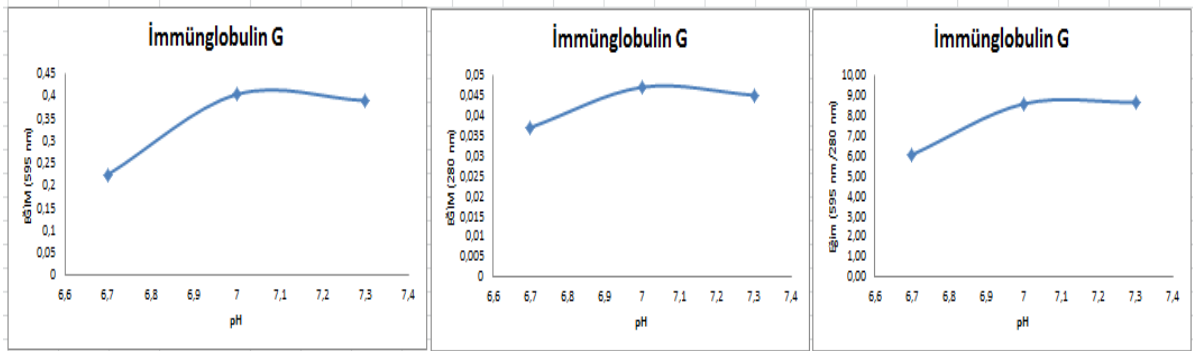
Şekil 4.84. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı etanol çözücü yüzdelere karşı olarak 595 nm, 280 nm eğimler ve 595/280 eğimler oranına karşı çizilen grafiklerin karşılaştırması



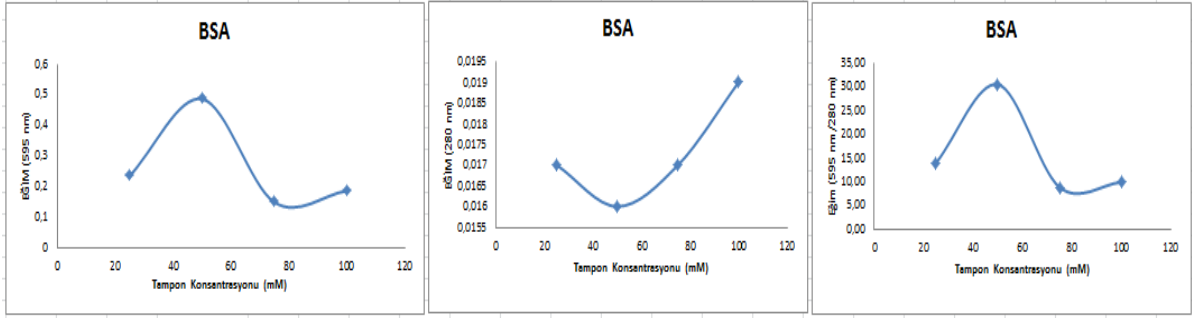
Şekil 4.85. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması



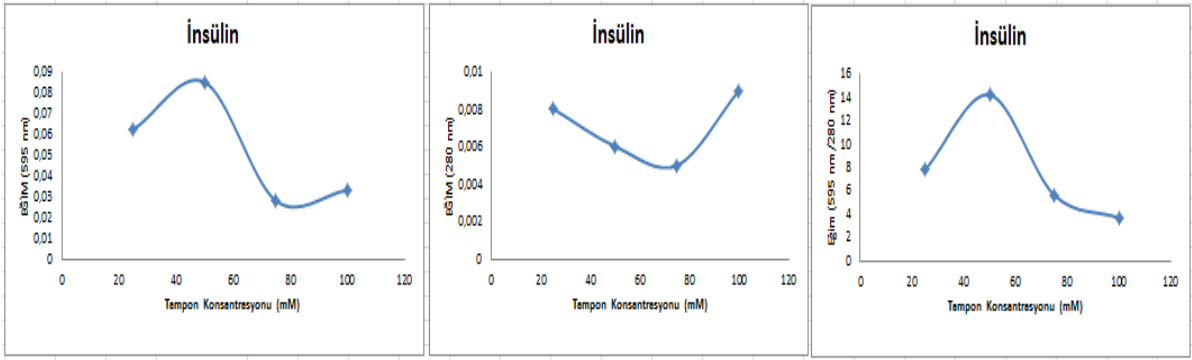
Şekil 4.86. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması



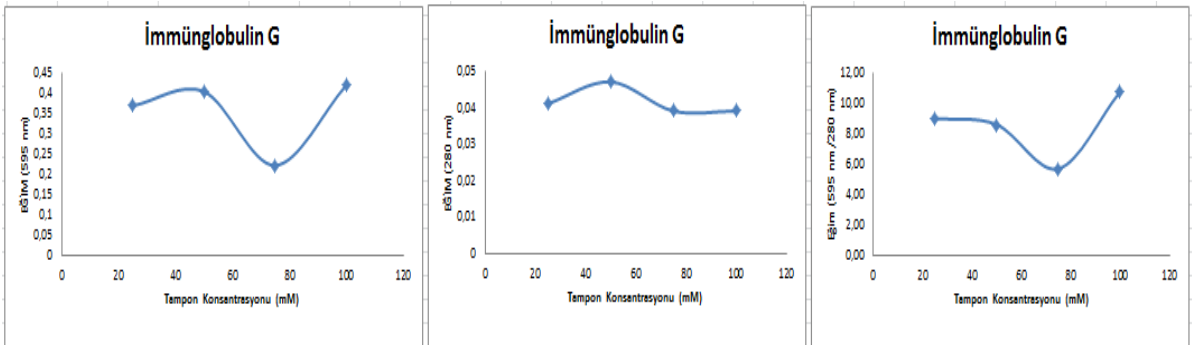
Şekil 4.87. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 50'şer mM pH 6.7, pH 7 ve pH 7.3 fosfat tamponları ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm'de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı pH'lara karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması



Şekil 4.88. BSA proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması



Şekil 4.89. İnsülin proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması



Şekil 4.90. İmmünglobulin G proteinin 8 farklı konsantrasyonunun 25, 50, 75, 100 mM, pH 7 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl ile 595 ve 280 nm’de elde edilen absorbanslarıyla oluşturulan spektrofotometrik kalibrasyon grafiklerinden elde edilen eğimlerin farklı tampon konsantrasyonlarına karşı olarak çizilen grafiklerin karşılaştırması

% 20 ACN BSA için % 1 ACN insülin için % 10 ACN CA için % 5 ACN immünglobulin G için % 20 metanol immünglobulin G için % 1 metanol BSA için % 5 metanol insülin için % 20 etanol immünglobulin G için % 0 etanol insülin için % 30 etanol BSA için spektrofotometrik 595 nm'de optimum değerlerdir.

Ayrıca 50 mM tampon konsantrasyonu ve pH 7,0 fosfat tamponu açısından BSA, immünglobulin G ve insülin için de spektrofotometrik 595 nm'de optimum değerlerdir (Şekil 75-90) ve on-line HPLC'de uygulamalar bu tamponla yapılmıştır.



5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Spektroskopi bilimi kullanılarak yıllarca sayısız icatlar yapılmıştır. Bunların içinde 200 ila 800 nm arasında değişen dalga boylarında ışık absorpsiyonuna dayalı ölçüm alınan spektrofotometreler önemli bir yer teşkil etmektedirler. Günümüzde yerlerini akıllı telefon kolorimetresi almaya başlamıştır (Gee vd., 2017).

Şimdilerde 130'dan fazla farklı protein ya da peptid klinik amaçlı Amerika Gıda ve İlaç Birliği tarafından kullanılıyor ve bu sayı giderek artmaktadır. Terapötik proteinlerin küresel ticari hacmi 141,5 milyar dolardır. Bu bakımdan terapötik proteinlerin biyoanalitik tekniklerle desteklenmesinin önemi artmaktadır (Van den Broek vd., 2013). Spektrofotometrelerle yapılan analizlerde proteinler 216 nm'de peptid bağından kaynaklı 280 nm'de triptofan, tirozin ve sistein amino asitleri temelli absorbans verirler. 200 ila 400 bölgesi bazı tampon ve çözücülerin de absorbans yaptığı girişim bölgesidir (Metsamuuronen vd., 2011). Dolayısıyla kolorimetrik ölçümlerin yapıldığı 400 ila 800 bölgesi bu girişimden uzaktır ve tercih edilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada bu bölgede absorbans gösteren spektrofotometrik yöntemler ele alındı ve bunlardan HPLC'ye adapte olabilecek nitelikte olanlar çalışılarak denendi. Bunlar biüret, ninhidrin ve bradford yöntemleridir.

Biüret yöntemi Kobbr tarafından 1916'da spektrofotometrik olarak uygulandığı şekliyle on-line HPLC'ye ilk defa uyarlanmıştır. Uyarlama aşamasında normalde numune:reaktif (1:50) oda sıcaklığında uygulanan metod HPLC açısından uygun olabilecek seçeneklerde, bakır sülfat ve sodyum potasyum tartaratın 4 kat derişigi kullanılarak (HPLC açısından dedeksiyonu artırmak için) vücut sıcaklığı (37 °C) ve oda sıcaklığında (25 °C) reaktif: numune oranı 5'e 1 ve 1'e 5 oranlarında spektrofotometrik olarak denendi ve en iyi ölçümler oda sıcaklığında, reaktifin orjinal haliyle ve numune:reaktif (1:5) olduğu görüldü fakat 280 nm'ye göre dedeksiyon duyarlılığı daha yüksek bir metod geliştirmek istenildiği için on-line biüretin duyarlılığının 280 nm'ye göre çok düşük olduğu görüldüğü için ve biüret reaktifinin proteinlerle oluşturduğu cevap geç tamamlandığından (10 dk'da) bu metodla denemelere devam edilmedi. Ayrıca reaktifin aşırı bazik oluşu tübing sistemini ve cihazı etkilemesi (pompa, dedektör vs.) yüzünden kullanışlı bulunmadı.

Siegfried Ruhemann tarafından 1910'da amino asitlerin analizinde kullanılan ninhidrin yöntemi, Schwarz ve arkadaşları tarafından 2005'te plazma proteinlerinin iyon değişim kromatografisi ile amino asitlere ayrıldıktan sonra reaksiyon sarmalıyla yüksek sıcaklıkta

ninhidrinle birleştirildikten sonra oluşan renkli amino asit fragmentlerinin fotometrik olarak 570 nm’de absorbansları okunmuştur, aynı çalışmada HPLC analiziyle de amino asit analizi yapılmış sonuçlar karşılaştırılmıştır. Wimalasena ve arkadaşları tarafından 2003’te kolon sonrası ninhidrin reaktifiyle muamele sonrası türevlendirme ve florojenik dedeksiyonla bradikinin proteininin düşük pikomol seviyelerinde dedeksiyonu yapılmıştır.

Bu çalışmalar geliştirilen on-line ninhidrinle birleştirilerek HPLC analizi yapıp boyut dışarılama kolonuyla protein ayrımı yapıldı ve reaksiyon sarmalından sisteme eş zamanlı şırınga pompayla ninhidrin reaktifi gönderilerek UV 570 nm’de dedeksiyon ilk defa uygulandı. Spektrofotometrik tayin sınırlarının çok çok üzerine çıktığı halde (20 mg/mL) HPLC’de on-line 570 nm’deki UV dedeksiyonu 280 nm’ye göre beklenenden çok düşük çıktığından ve baseline dalgalanması tayin ve tespit limitlerini belirlemede önemli olduğu için ve çok fazla olduğundan ve ninhidrin reaksiyonundan kaynaklı oluşan CO₂ tubing içinde basınç yükselmesine neden olduğu için ve reaksiyon 15 dk’da tamamlandığından (HPLC’deki tubing sarmalı mesafesi 1,5-2 dk’lık zaman dilimi kadarki kısa sürede tamamlanamadığından) yöntem geliştirilemedi, başka spektroskopik yöntem denemesine geçildi.

Bradford tarafından 1976’da geliştirilen Coomassie Brilliant Blue G250 boya bağlama temelli ve 2 dk gibi kısa bir zamanda reaksiyon veren spektrofotometrik yöntem HPLC’ye adapte edilip geliştirilmeden önce aynı konsantrasyonda (0,25 mg/mL) BSA ve CA proteinleri farklı reaktif konsantrasyonu ve farklı karışım oranlarıyla (reaktif:protein) spektrofotometrik olarak 10 dk’lık periyot boyunca absorbans okuması yapılarak çalışıldı. Sonuçlar birbiriyle örtüştü (Şekil 4.1-2). Ardından farklı proteinlere Bradford reaktifinin verdiği cevap için aynı konsantrasyonda (1 mg/mL) amilaz, BSA, arı zehiri proteinlerinin 60 dk boyunca spektrofotometrik olarak periyodik absorbans okuması yapıldı, reaksiyonun tamamlandıktan hemen sonrası (3 ila 15. dk arası) % farklara bakıldığında amilaz için % 2,99, BSA için % 0,24, arı zehiri için % 0,9’dur. Fark en az olan protein boyayla stabil davranış gösterdiği için standart protein olarak kullanıldı. Daha sonra BSA ve CA proteinlerinin sabit konsantrasyonlarında 10 dk boyunca farklı sıcaklıklarda (25, 30, 40, 50 °C) absorbans okuması yapıldı, HPLC açısından tübingte gerçekleşecek reaksiyon 1,5 dk olduğu için bu dk için optimum sıcaklık baz alındığında en yüksek 30 °C’dir (Şekil 4.4).

Literatürde spektrofotometrik ölçümlerin akış enjeksiyon sistemiyle uygulanmasına yönelik örnekler (Flow Injection Analysis: FIA) mevcuttur (Korenaga vd., 1992; Vidal vd., 2003; Luca ve Reis, 2004). Da Silva ve Arruda tarafından 2006’da yapılan bir çalışmada

Bradford yöntemi ve akış enjeksiyon analizi kullanılarak optimize edilip 3 farklı protein numunesine uygulanmıştır. Liang ve Li tarafından 2013'te yapılan başka bir çalışmada da günlük ürünlerde protein içeriğini belirlemeye yönelik düzensiz enjeksiyon temelli akış enjeksiyon spektrometresiyle Coomassie Brilliant Blue G250 kullanılmış 200 cm reaksiyon sarmalı 2,65 mL/dk akış hızı ile BSA proteini için lineer aralık 0,5-15 ppm ve LOD 0,05 ppm olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda Bradford yönteminin HPLC'ye optimizasyon çalışmalarına geçilerek protein ve reaktif konsantrasyonu sabit tutulup optimum reaktif akış hızı, reaktif akış hızı ve protein konsantrasyonu sabit tutulup optimum reaktif konsantrasyonu, protein konsantrasyonu, reaktif akış hızı ve konsantrasyonu sabit tutulup optimum reaksiyon sıcaklığı pik alanı değerlerine göre belirlendi. Sabit protein (BSA) konsantrasyonunda optimum koşullarda elde edilen normalize pik alanlarından optimum tübing boyu belirlendi. Optimum değerler; 30 °C reaksiyon sıcaklığı, 0,3 mL/dk reaktif akışı, 0,5 mL/dk sabit HPLC pompa akışı, 70 mg/L reaktif konsantrasyonu, 2,5 m tübing boyudur.

Geliştirilen yöntemin tayin ve tespit limitleri ilaç, gıda ve standart proteinler açısından gürlütülerin standart sapmaları ortalamasının sırasıyla 3 ve 10 katı şeklinde belirlendiler (EURACHEM, 1998). 595 nm için LOD: 0,0264 mg/mL, LOQ: 0,0882 mg/mL, CA için LOD: 0,0323 mg/mL, LOQ: 0,1076 mg/mL, immunoglobulin G için LOD: 0,0513 mg/mL, LOQ: 0,1711 mg/mL, insulin için LOD: 0,3301 mg/mL, LOQ: 1,1004 mg/mL olup en iyiden en kötüye dedeksiyon sırasıyla BSA, CA, immünglobulin G, insülin şeklindedir. Bradford reaktifinin bazik amino asitlerce (lizin, arjinin, histidin) zengin proteinlerde dedeksiyonu yüksektir (Ku vd., 2013; Congdon vd., 1993). Dolayısıyla bir gıda proteini olan jelatin ve bir ilaç protein olan immunoglobulin G bazik amino asitlerce zengin (sırasıyla 49 adet ve 47 adet) olduklarından geliştirilen on-line HPLC-Bradfordla dedeksiyonları 280 nm'ye göre (yarı kantitatif, triptofan, tirozin ve sistein temelli) oldukça yüksektir (Şekil 4.27, Şekil 4.29, Tablo 4.6). 595 nm ölçümü hem geliştirilen on-line HPLC-Bradford yöntemi ile hem de off-line spektrofotometrik olarak 280 nm'ye göre üstündür. On-line uygulaması eş zamanlı ayırım ve dedeksiyonu sağlamaktadır, yöntem oldukça hızlıdır (Tablo 4.7).

Çözücü karışımları (metanol ve % 0,1 formik asit, etanol ve % 0,1 formik asit, ACN ve % 0,1 formik asit, pH 7,0 fosfat tamponu ve 0,2 M KCl karışımları) BSA, CA, immünglobulin G, insülin proteinleri için spektrofotometrik olarak Bradford protein tayin yöntemiyle on-line HPLC-protein tayin yöntemine model olması amacıyla (0,5 mL/dk çözücü akışı, 0,3 mL/dk reaktif akışı ve 20 µL protein enjeksiyonu oranları baz alınarak)

çözücü % kompozisyonu ya da tampon konsantrasyonu veya pH değiştirilerek denenmiştir. Birçok çalışmada farklı HPLC kolon türleriyle farklı çözücüler kullanıldığı için geliştirilen yöntemin başka kolon sistemleriyle ve izokratik ya da gradient çözücü sistemleriyle de uygulanabilir olduğu gösterilmek istendiği için yöntem çok kullanılan çözücülerle spektrofotometrik olarak denenerek modellenmesi yapılmıştır.

İzokratik veya gradient asetonitril çözücüsüyle BSA proteini HPLC ile 280 nm'de dedeksiyon yapılacak olsa % 30' larda etkili dedeksiyon görülürken 595 nm'de % 20'lerde etkili sonrasında düşmektedir, metanol çözücüsüyle % 5'te 280 nm'de yüksek dedeksiyon sonrasında sabit kalmaktayken 595 nm'de % 1'de yüksek dedeksiyon sonrasında düşmektedir, etanol çözücüsüyle gradient ya da izokratik dedeksiyon yapılacak olsa 280 nm'de % 3'te maksimum sonrasında sabit dedeksiyon, 595 nm'de Bradford yönteminde ise % 30'da maksimum sonrasında düşmektedir. CA proteini asetonitril çözücüsüyle HPLC' de izokratik ya da gradient ayırım sonrası dedeksiyon yapılacak olsa 280 nm için % 15 izokratik 595 nm (on-line yöntem) için ise % 10'a kadar gradient çalışılabilir. İmmünglobulin G için 280 nm'de HPLC'de asetonitril çözücüsüyle % 100'e kadar gradient çalışılabilirken 595 nm (on-line yöntem)'de % 5'e kadar gradient sonrasında izokratik çalışılmalıdır, metanol ya da etanol çözücüsüyle 280 nm'de % 100'e kadar gradient çalışılabilirken 595 nm'de % 20'de izokratik çalışılmalıdır. İnsülin için asetonitril çözücüsüyle 280 nm'de HPLC'de % 100'e kadar gradient 595 nm (on-line yöntem)'de % 1 izokratik çalışılmalyken metanol ya da etanol çözücüsüyle ise 280 nm'de % 100'e kadar gradient çalışılabilirken metanol çözücüsüyle 595 nm (on-line yöntem)'de % 5'te izokratik çalışılmalıdır.

Peptid ya da proteinlerin çözünürlük özelliklerinde kritik rolü fizikokimyasal parametreler belirler. Molekülün sahip olduğu toplam kalıntı sayısı (polar ve apolar amino asitler) ve toplam yük sayısı etkilidir. Kaotropik çözücü (asetonitril, etanol) miktarı az olduğu zaman hidrojen bağı koparak peptidin jelleşmesi azalır. % 75'ten daha az kalıntı içeren insülin gibi küçük proteinler tamamen polar olmayan kalıntı içerdiği zaman formik asit gibi güçlü çözücülerle çözünürleştirilmeli sonra organik çözücüyle karıştırılmalıdır (Maes vd., 2014; Schein vd., 1990).

Maes K. ve arkadaşlarının 2014'teki derlemesinde moleküler arası hidrojen bağı oluşturabilen amino asit kalıntıları (D, E, H, K, N, Q, R, S, T, Y) polardır, ayrıca moleküller arası hidrojen bağı oluşturamayan polar amino asit kalıntıları da vardır (W, C) ve polarite ile toplam yükü dikkate alarak organik çözücülerle protein ilişkisini ele almıştır. Dolayısıyla bu açıdan insülin, immünglobulin G, BSA ve CA proteinlerini ele alırsak polariteleri sırasıyla

CA için % 53, BSA için % 57, insülin için % 41 İmmünglobulin G için % 50'dir. Asidik (D, E amino asitleri temelli) ve bazik (R, H, K amino asitleri temelli) karakterleri ele alındığında CA, BSA, İmmünglobulin G bazik, insülin nötr karakterlidir. İyonlaşabilme yüzdeleri ise CA için % 25, BSA için % 33 insülin için % 18 immünglobulin G için % 23'tür. Polarite % 50 ve % 50'nin altındayken metanol gibi bir protik çözücü asetonitrilden daha etkilidir (Maes vd., 2014). Bu durumu immünglobulin G ve insülin proteinleri spektrofotometrik Bradford denemeleriyle desteklemektedir.

Ayrıca düşük %'lerde (% 0,1 - % 1) formik asit, trifloroasetik asit, asetik asit ya da amonyak, amonyum bikarbonat gibi asit ya da bazlarla organik çözücüler modifiye edilerek dipol dipol ve iyonik etkileşimlere sebep olan protein adsorpsiyonu düşürülür (Fang vd., 2011; Hughes vd., 2007). Apolar amino asit kalıntı sayısı polardan fazla (insülin proteinindeki gibi) ise % 100 asetonitril ile bulutlu çözelti oluşur ve formik asit eklendikten sonra berraklaşır (John vd., 2004).

Çalışma devamı gelebilecek nitelikte (diğer spektrofotometrik yöntemlerinde on-line uygulamaları geliştirilecek) ve birçok çalışmaya ışık tutacak nitelikte olup literatüre on-line HPLC-Bradford yöntemi ilk kez kazandırılmıştır. Geliştirilen on-line yöntem tespit ve tayin sınırının yanında daha sonraki tez ve münferit çalışmalarda özellikle de şırınga pompa yerine HPLC pompası kullanılarak tekrarlanabilirlik, doğruluk, kesinlik, sağlamlık gibi parametreler açısından tam valide edilmesi faydalı olacaktır. Ayrıca metodun farklı organik çözücülerle spektrofotometrik model olarak denendiği sonuçlar HPLC sisteminde on-line uygulamalarda öncü teşkil edip denenebilir.

Çalışmada geliştirilen yeni HPLC-DAD-Bradford yöntemi peptid ve proteinlerin karışımlardan ayrılarak miktarının belirlenmesinin gerektiği çeşitli alanlardaki çeşitli çalışmalarda kolaylıkla uygulanabilecek niteliktedir. Uygulama alanları arasında gıda, tıp ve ilaç sektörleri ön planda olacaktır. Geliştirilen yöntemin özellikle miktarları çok düşük olan peptid ya da proteinlerin tıbbi amaçlı analizlerinde önemli bir yere sahip olması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Aktas-Karaçelik A., Küçük M., Iskefiyeli Z., Aydemir S., DeSmet S., Miserez B. ve Sandra P., 2015. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC/UV/ESI–MS methods, Food Chem., 175, 106-114.
- Arakawa T., Philo J.S., Ejima D. ve Tsumoto D.K., 2006. Arisaka F., Aggregation Analysis of Therapeutic Proteins, Part 1. BioProcess International, 4,10, 32-42.
- Arakawa T., Ejima D., Li T. ve Philo J.S., 2010. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals, Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 4, 1674-1692.
- Arslan Burnaz N., Küçük M. ve Akar Z., 2017. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1052, 66-72.
- Bartolome B., Moreno-Arribas V., Pueyo E. ve Carmen Polo M., 1997. On-line HPLC Photodiode Array Detection and OPA Derivatization for Partial Identification of Small Peptides from White Wine, J.Agric. Food Chem., 45, 3374-3381.
- Bond M.D., Panek M.E., Zhang Z., Wang D., Mehndiratta P., Zhao H., Gunton K., Ni A., Nedved M.L, Sudhir B. ve Volkin D.B., 2010. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody, Journal of Pharmaceutical Sciences, 99, 6, 2582-259.
- Borrey D., Moerman E., Cockx A., Engelrelst V. ve Langlois M.R., 2007. Column-switching LC-MS/MS analysis for quantitative determination of testosterone in human serum, Clin. Chim. Acta, 382, 134-137.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem.,72, 248–254.
- Caira S., Pinto G., Balteanu VA., Chianese L. ve Addeo F., 2013. A Signature Protein-Based Method to Distinguish Mediterranean Water Buffalo and Foreign Breed Milk. Food Chemistry, 141, 597-603.
- Chakraborty A., Chen W. ve Mazzeo J., 2011. A Generic On-line UPLC-SEC/UV/MS Method for the Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies, Waters Corporation, Application Note 720004018EN.
- Chutipongtanate S., Watcharatanyatip K., Homvises T., Jaturongkakul K. ve Thongboonkerd V., 2012. Systematic Comparisons of Various Spectrophotometric and Colorimetric Methods to Measure Concentrations of Protein, Peptide and Amino Acid: Detectable Limits, Linear Dynamic Ranges, Interferences, Practicality and Unit Costs. Talanta, 98, 123-129.

- Congdon R.W., Muth G.W. ve Splittgerber A.G., 1993. The Binding Interaction of Coomassie Blue with Proteins, Analytical Biochemistry, 213, 2, 407-413.
- De Boer A.R., Letzel T., Van Elswijk D.A., Lingeman H., Niessen W.M.A. ve Irth H., 2004. On-line coupling of high-performance liquid chromatography to a continuous-flow enzyme assay based on electrospray ionization mass, Analytical Chemistry, 76, 11, 3155-3161.
- Da silva M. A. O. ve Arruda M. A. Z., 2006. Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins, Notes & Tips / Anal. Biochem., 351, 155–157.
- De Jong C.F., Derks R.J.E., Bruyneel B., Niessen W. ve Irth H., 2006. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts, Journal of Chromatography A 1112, 1-2, 303-310.
- Desilets C.P., Rounds M.A. ve Regnier F.E., 1991. Semi permeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A , 544, 25–39.
- De St. Groth F., Webster R.G. ve Datyner A., 1963. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips, Biochimica et Biophysica Acta, 71, 377-391.
- Eeltink S., Dolman S., Detobel F., Desmet G, Swart R. ve Ursem M., 2009. 1 mm ID poly(styrene-co-divinylbenzene) monolithic columns for high-peak capacity one- and two-dimensional liquid chromatographic separations of intact proteins, Journal of Separation Science ,32, 15-16, 2504-2509.
- EURACHEM G., 1998. The Fitness for Purpose of Analytical methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, ISBN:0-948926-12-0.
- Fanger B.O., 1987. Adaptation of the Bradford protein assay to membrane-bound proteins by solubilizing in glucopyranoside detergents, Analytical Biochemistry, 162, 1, 11-17.
- Fang J., Rand K.D., Beuning P.J. ve Engen J.R., 2011. False EX1 signatures caused by sample carry over during HX MS analyses, Int. J. Mass Spectrom., 302, 19–25.
- Flarakos J., Xiong W., Glick J. ve Vouros P., 2005. A deoxynucleotide derivatization methodology for improving LC-ESI-MS detection, Analytical Chemistry, 77, 8, 2373-2380.
- Gee C.T., Kehoe E., Pomerantz, W.C.K., ve Penn R.L., 2017. Quantifying Protein Concentrations Using Smartphone Colorimetry: A New Method for an Established Test, J. Chem. Educ., 94, 941–945.
- Geng X. ve Regnier F.E., 1984. Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography, J.Chromatogr., 296, 15-30.

- Grotefend S., Kaminski L., Wroblewitz S., Deeb S.E., Kühn N., Reichl S., Limberger M., Watt S. ve Wätzig H., 2012. Protein quantitation using various modes of high performance liquid chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 71, 127-138.
- Grznarora G., Polakovic M., Acai P. ve Gorner T., 2004. Extra-Column Dispersion of Macromolecular Solutes in Aqueous Phase Size-Exclusion Chromatography, Journal of Chromatography A, 1040, 1, 33-43.
- Hansen E. H. ve Miró M., 2007. How Flow Injection Analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses., Trends in Analytical Chemistry, 26, 1, 18-26.
- Hartwell S.K., Pathanon K., Fongmoon D., Kongtawelert P. ve Grudpan K., 2007. Exploiting flow injection system with mini-immunoaffinity chromatographic column for chondroitin sulfate proteoglycans assay, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388, 8, 1839-1846.
- He Y., Zhang Y., Wei C., Li C., Gao Y. ve Liu R., 2014. Illuminate Proteins and Peptides by Elemental Tag for HPLC-ICP-MS Detection, Applied Spectroscopy, Reviews, 49, 492-512.
- Hunter J. B. ve Hunter S. M., 1987. Quantification of proteins in the low nanogram range by staining with the colloidal gold stain AuroDye, Anal. Biochem, 164, 430.
- Hong P., Koza S. ve Bouvier E.S.P., 2012. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 35, 20, 2923-2950.
- Hortin G.L. ve Sviridov D., 2010. The dynamic range problem in the analysis of the plasma proteome, Journal of Proteomics, 73, 3, 629-636.
- Hughes N.C., Wong E.Y., Fan J. ve Bajaj N., 2007. Determination of carry over and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays, AAPS J., 9, 353-360.
- Jaffe H.H. ve Orchin M., 1963. Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, Journal of the Electrochemical Society, 110, 4, 97C.
- John H., Walden M., Schafer S., Genz S. ve Forssmann W.G., 2004. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem., 378, 883-897.
- Kamal Y.T., Singh M., Tamboli E.T., Parveen R., Zaidi S.M.A. ve Ahmad, S., 2012. Rapid RP-HPLC method for the quantification of glabridin in crude drug and in polyherbal formulation, Journal of Chromatographic Science 50, 9, 779-784.
- Kjeldahl J., 1883. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern, Zeitschrift für Analytische Chemie, 22, 1, 366-382.

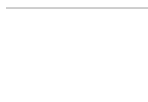
- Kobbr P.A. ve Haw A.B., 1916. Spectrophotometric study of copper complexes and the biuret reaction, Journal of the American Chemical Society 38, 2, 457-472.
- Korenaga T., Zhou X. J., Izawa M., Takahashi T., Moriwake T. ve Shinoda S., 1992. High-sensitivity flow method for the determination of proteins with micro-flow plunger pumps, Analytica Chimica Acta, 261, 67-74.
- Kromidas S., 2007. More Practical Problem Solving in HPLC (Book), 1-294.
- Ku H.K., Lim H.M., Oh K.H., Yang H.J., Jeong J.S. ve Kim S.K., 2013. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models, Notes and Tips / Anal. Biochem., 434, 178-180.
- Liang Q.Q. ve Li Y.S., 2013. A rapid and accurate method for determining protein content in dairy products based on asynchronous-injection alternating merging zone flow-injection spectrophotometry, Food Chemistry, 141, 2479-2485.
- Lindqvist B. ve Storgards T., 1955. Molecular-Sieving Properties of Starch, Nature, 175, 511-512.
- Liu H., Bulseco G. ve Chumsae C., 2009. Analysis of Reduced Monoclonal Antibodies Using Size Exclusion Chromatography Coupled with Mass Spectrometry, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 20, 2, 2258-2264.
- Lorenzen A. ve Kennedy S.W., 1993. A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader, Analytical Biochemistry, 214, 1, 346-348.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. ve Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent, The Journal of biological chemistry 193, 1, 265-275.
- Luca G.C.L. ve Reis B.F., 2004. Simultaneous photometric determination of albumin and total protein in animal blood plasma employing a multicommutated flow system to be carried out on line dilution and reagents solutions handling, Spectrochim. Acta A, 60, 579-583.
- Maes K., Smolders I., Michotte Y. ve Eeckhaut A.V., 2014. Strategies to reduce aspecific adsorption of peptides and proteins in liquid chromatography-mass spectrometry based bioanalyses: An overview (Review), Journal of Chromatography A, 1358, 1-13.
- Mansueto P., Seidita A., D'Alcamo A. ve Carroccio, A., 2012. Non-Celiac Gluten Sensitivity: Literature Review, Journal of the American College of Nutrition 33, 1, 39-54.
- Mertens D.R., Allen M., Carmany J., Clegg J., Davidowicz A., Drouches M., Frank K., Gambin D., Garkie M., Gildemeister B., Jeffress D., Jeon C.-S., Jones D., Kaplan D., Kim G.-N., Kobata S., Main D., Moua X., Paul B., Robertson J., Taysom D., Thiex N., Williams J. ve Wolf M., 2012. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study, Journal of AOAC International, 85, 6, 1217-1240.

- Metsamuuronen S., Manttari M. ve Nyström M., 2011. Comparison of analysis methods for protein concentration and its use in UF fractionation of whey, Desalination, 283, 156-164.
- Moeremans M., Daneels G. ve De Mey J., 1985. Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes, Analytical Biochemistry, 145, 2, 315-32.
- Niederlander, H.A.G., van Beek , T.A., Bartasiute, A. ve Koieva, I.I., 2008. Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, Journal of Chromatography A. 1210, 121-134.
- Nordqvista P., Johanssonb E., Khabbazc F. ve Malmströma E., 2013. Characterization of Hydrolyzed or Heat Treated Wheat Gluten by SE-HPLC and 13C NMR: Correlation with Wood Bonding Performance, Industrial Crops and Products, 51, 51– 61.
- Okutucu B., Dincer A., Habib O. ve Zihnioglu F., 2007. Comparison of Five Methods for Determination of Total Plasma Protein Concentration, J. Biochem. Biophys. Methods, 70, 709-711.
- Pawliszyn, J., 1990. Inexpensive fluid delivery system for supercritical fluid extraction, Journal of High Resolution Chromatography, 13, 3, 199-202.
- Qin W., Dan W., Bin D., Zaijun L. ve Yanqiang H., 2006. A Spectrophotometric Method for Determination of Total Proteins in Cow Milk Powder Samples Using the o-nitrophenylfluorone /Mo(VI) Complex. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 76-82.
- Quinn H.M. ve Takarewski J.J., 1997. inventors; High performance liquid chromatography method and apparatus, US Patent, 5, 919, 368.
- Ratanawimarnwong N., Ponghong K., Teshima N., Nacapricha D., Grudpan K., Sakai T. ve Motomizu S., 2012. Simultaneous Injection Effective Mixing Flow Analysis of Urinary Albumin Using Dye-binding Reaction, Talanta, 96, 50-54.
- Raudonis R., Raudon L., Jakstas V. ve Janulis V., 2012. Comparative evaluation of post-column free radical scavenging and ferric reducing antioxidant power assays for screening of antioxidants in strawberries, J. Chromatogr. A, 1233, 8-15.
- Rea J.C., Moreno G.T., Lou Y. ve Farnan D., 2011. Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 54, 2, 317-323.
- Recktenwald A., Heinz Kroner K. ve Regina Kula M., 1985. Rapid on-line protein detection in biotechnological processes by flow injection analysis (FIA), Enzyme and Microbial Technology, 7, 4, 146-149.

- Rhee I.K., Appels N., Luijendijk T., Irth H. ve Verpoorte R., 2003. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in Plant extracts using a fluorimetric flow assay, Phytochemical Analysis, 14, 3, 145-149.
- Ricker R.D. ve Sandoval L.A., 1996. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules, Journal of Chromatography A 743, 1, 43-50.
- Ruhemann S., 1910. CXXXII. - Cyclic di- and tri-ketones, Journal of the Chemical Society Transactions, 97, 1438-1449.
- Ruzicka, J. ve Hansen, E.H., 2008. Retro-review of flow-injection analysis, TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 27, 5, 390-393.
- Schein C.H., 1990. Solubility as a function of protein structure and solvent components, Biotechnology (N.Y.), 8, 308-317.
- Schobel U., Frenay M., van Elswijk D.A., McAndrews J.M., Long K.R., Olson L.M., Bobzin S.C. ve Irth H., 2001. High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor α and β binding activity using an online HPLC-MS biochemical detection system, J. Biomol. Screen., 6, 5, 291-303.
- Schwarz E.L., Roberts W.L. ve Pasquali M., 2005. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection, Clinica Chimica Acta, 354, 1-2, 83-90.
- Scopes R.K., 1974. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm, Analytical Biochemistry, 59, 1, 277-282.
- Scott R.P.W., 1996. Chromatographic Detectors (Book), Chromatographic Science Series, Volume 73, Elsevier, New York.
- Sedmak J.J. ve Grossberg S.E., 1977. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250, Anal Biochem., 79, 544-552.
- Shi S.Y., Zhang Y.P., Jiang X.Y., Chen X.Q., Huang K.L., Zhou H.H. ve Jiang X.Y., 2009. Coupling HPLC to on-line post column biochemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures, TrAC Trends Anal. Chem., 28, 865-877.
- Smith P.K., Krohn R.I, Hermanson G.T, Mallia A.K, Gartner F.H, Provenzano M.D, Fujimoto E.K, Goetze N.M, Olson B.J. ve Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid, Anal Biochem, 150, 76-85.
- Sözgen K., Demirci Cekic S., Tütem E. ve Apak R., 2006. Spectrophotometric Total Protein Assay with Copper(II) -Neocuproine Reagent in Alkaline Medium, Talanta, 68, 1601-1609.
- Spector T., 1978. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to 50 μg of protein, Analytical Biochemistry, 86, 1, 142-146.

- Trojanowicz M. ve Kołacińska K., 2016. Recent advances in flow injection analysis, Analyst, 141, 2085-2139.
- Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W. ve Weigle M., 1972. Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range, Science, 178, 4063, 871-872.
- Van den Broek I., Niessen W.M. ve van Dongen W.D., 2013. Bioanalytical LC–MS/MS of protein-based biopharmaceuticals, J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 929, 161–179.
- Vidal E., Palomeque M.E., Lista A.G. ve Band B.S.F., 2003. Flow injection analysis: Rayleigh light scattering technique for total protein determination, Anal. Bioanal. Chem., 376, 38–41.
- Wang C., Li S., Tang Y.J., Wang S.W., Zhang Y.L. ve Fan G.R., 2012. Micro dialysis combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of levo-tetra hydropalmatine in the rat striatum, J. Pharm. Biomed., 64–65, 1–7.
- Wang Q.Q., Li X.S, Dai S.J, Ou L., Sun X. ve Zhu B.Z., 2008. Quantification of puerarin plasma by on-line solid-phase extraction column switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its applications to a pharmacokinetic study, J Chromatogr B, 863, 55–63.
- Wang S. ve Raghani A., 2014. Arginine as an Eluent for Automated On-line Protein A/Size Exclusion Chromatographic Analysis of Monoclonal Antibody Aggregates in Cell Culture. Journal of Chromatography B, 945– 946, 115– 120.
- Warburg O. ve Christian W., 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, Die Naturwissenschaften, 29, 39, 589-590.
- Wei Q., Yuan Li Y., Li Y., Du B. ve Hong Duan C., 2005. Rapid and Highly Sensitive Determination of Trace Proteins Using Dibromomethyle Carboxyazo-Pb(II) Complex as a Spectroscopic Reagent, Clinica Chimica Acta, 362, 79-84.
- Wimalasena R., Audus K.L. ve Stobaugh J.F., 2003. Rapid Optimization of the Post-Column Fluorogenic Ninhydrin Reaction for the HPLC- Based Determination of Bradykinin and Related Fragments, Biomed. Chromatogr., 17, 165-171.
- Ynddal L. ve Hansen S.H., 2003. On-line turbulent-flow chromatography–high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for fast sample preparation and quantitation, J. Chromatogr. A, 1020, 59–67.
- Yang C.S., Tsai P.J., Chen W.Y., Tsai W.J. ve Kuo J.S., 1999. On-line Derivatization for Continuous and Automatic Monitoring of Brain Extracellular Glutamate Levels in Anesthetized rats: a Microdialysis Study. Journal of Chromatography B, 734, 1-6.
- Yang R.Q. ve Xie W.L., 2006. Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography–mass spectrometry, Forensic Sci. Int., 162, 135–9.

- Yau W.W., Ginnard C.R. ve Kirkland J.J., 1978. Broad-range linear calibration in high-performance size-exclusion chromatography using column packings with bimodal pores, Journal of Chromatography A 149(C), 465-487.
- Zaia D.A.M., Verri Jr. W.A. ve Zaia C.T.B.V., 1999. Determination of Total Proteins: a Study of Reaction Between Quinones and Proteins. Talanta, 49, 373-376.
- Zhang X.H., Wang R., Xie H., Yin Q., Li X.Y. ve Jia Z.P., 2013. On-line enrichment ability of restricted-access column coupled with high performance liquid chromatography by column switching technique for benazepril hydrochloride, Chin. J. Chromatogr., 31, 451-5.
- Zor T. ve Selinger Z., 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies, Analytical Biochemistry 236, 2, 302-308.



ÖZGEÇMİŞ

12.11.1985 yılında İstanbul'da doğdu. 2003 yılında İstanbul Maltepe Süper Lisesi'nden mezun oldu. 2004 yılında KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne girdi. 2009 yılında bu bölümden onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2010-2011 yılları arasında YTÜ Eğitim Fakültesinde Pedagojik Formasyon Eğitimini tamamladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya bilim dalında Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. Ardından aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya bilim dalında Doktora Eğitimine başladı. Akademik çalışmalarının çoğunu Doktora eğitimi boyunca yapmıştır. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evlidir ve Hamza Eymen adında bir erkek evlat babasıdır.

Yüksek Lisans Tezi

“HPLC Analizinde Çakışan Pik Veren Bileşiklerin DAD, Online FRAP ve Peroksinitrile Reaksiyon Kullanılarak Ayırt Edilmesi”
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

- Aliyazicioglu R., **Eyupoglu, O. E.**, Ozgen U., Alpay Karaoglu, S., Composition of Volatile Components and Biological Activities of *Aethionema diastrophis*, Chemistry of Natural Compounds-March 2017-53(2):379-380. DOI 10.1007/s10600-017-1997-0
- Aliyazicioglu R., Korkmaz N., Akkaya S., Sener S. O., Badem M., Alpay Karaoglu, S., **Eyupoglu, O. E.**, Phenolic components, antioxidant and antimicrobial activities of *Centranthus longiflorus* L., Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. -2016- 3(10): 80-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2016.03.10.012>.
- Yildirmiş S., Aliyazicioglu, R., **Eyupoglu, O. E.**, Ozgen U., Alpay Karaoglu, S., Biological Activity and Characterization of Volatile Compounds of *Teucrium orientale* Var. *glabrescens* by SPME and GC-FID/MS: Biological Activity of *Teucrium orientale* VAR. *Glabrescens*, Journal of Food Biochemistry- June 2016- ISSN 1745-4514, DOI: 10.1111/jfbc.12284.
- Aliyazicioglu, R., Yildiz, O., Sahin, H., **Eyupoglu, O. E.**, Ozkan, M. T., Alpay Karaoglu, S., and Kolayli, S., Phenolic Components and Antioxidant Activity of *Prunus Spinosa* from Gumushane, TURKEY, Chemistry of Natural Compounds-2015-51(2):346-349. DOI 10.1007/s10600-015-1278-8
- Aliyazicioglu, R., Tosun, G., Yaylı, N. and **Eyupoglu, O. E.**, Characterisation of Volatile Compounds by SPME and GC-FID/MS of Capers (*Capparis spinosa* L.), African Journal of Agricultural Research-2015-10(21): 2213-2217. DOI: 10.5897/AJAR2013.8414
- Aliyazicioglu, R., **Eyupoglu, O. E.**, Sahin, H., Yildiz, O., Baltas, N. Phenolic Components, Antioxidant Activity, and Mineral Analysis of *Capparis spinosa* L., African Journal of Biotechnology-2013- 12(47): 6643-6649.