

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOVINE SERUM ALBUMİN İLE POLİAKRİLİK ASİDİN
SUDA ÇÖZÜNEN KOMPLEKSLERİNİN VE KOVALENT
KONJUGATLARININ HPLC YÖNTEMİYLE
İNCELENMESİ**

Fizikçi Namık AKKILIÇ

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE (YTÜ)

İSTANBUL, 2006

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. SIVI KROMATOĞRAFİSİ	4
2.1 HPLC Cihazları	5
2.1.1 Pompalar	5
2.1.2 Enjektörler	5
2.1.3 Kolonlar	6
2.1.4 Dedektörler	6
2.1.4.1 Ultraviyole/Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS):.....	7
2.1.4.2 Fotodiyod Array Dedektörü (Photodiode array dedector-DAD):.....	7
2.1.4.3 Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD):	8
2.1.4.4 İletkenlik Dedektörü (Conductivity dedector-CDD):.....	8
2.1.4.5 Kırılma İndisi Dedektörü (Refractive index dedector-RID):.....	8
2.1.4.6 Elektrokimyasal Dedektörü (Electrochemical dedector-ECD):	8
2.1.4.7 Kütle Dedektörü (Mass dedector-MS):	8
2.2 Gradient Elüsyon	8
2.3 HPLC' nin Avantajları	9
2.3.1 Hız:	9
2.3.2 Pik Belirginliği (Rezolüsyon):.....	9
2.3.3 Hassasiyet:	9
2.3.4 Kolonların Yeniden Kullanımı:	10
2.3.5 Büyük Moleküller ve İyonik Şekiller:	10
2.3.6 Örneğin Geri Kazanılmasındaki Kolaylık:	10
2.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinin Teorik Esasları	10
2.4.1 Teorik Plato Sayısı	11
2.4.1.1 Teğet Yöntemi	11
2.4.1.2 Sigma (σ) Yöntemi	11
2.4.2 Rezolüsyon	12
2.4.3 Kapasite Faktörü (k').....	13
2.4.4 Ayırma Faktörü (α).....	14
2.4.5 Ayırma Faktörü (α) ve Kapasite Faktörü (k')' nün Ayırma Üzerine Etkisi	14
2.4.5.1 α ve k' nün Rezolüsyon Üzerine Etkisi.....	14
2.4.5.2 α ve k' nün Teorik Plato Sayısı (N) Üzerine Etkisi	14
2.5 HPLC'de Ayırma Mekanizmaları	15
2.5.1 Normal Faz Sıvı Kromatografisi:	15

2.5.1.1	Katı-Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Kolon Dolguları.....	15
2.5.2	Ters Faz Kromatografisi:.....	16
2.5.2.1	Ters Faz Kromatografisinde Kullanılan Hareketli Fazlar	18
2.5.3	İyon değiştirme kromatografisi:	19
2.5.3.1	İyon Değiştirme Kromatografisinde Ayırma Mekanizması	20
2.5.4	İyon çifti kromatografisi:.....	21
2.5.5	Afinite kromatografisi:	21
2.5.6	Moleküler Eleme Kromatografisi.....	22
2.5.6.1	Teorik Esaslar	23
2.5.6.2	Kolonların Seçilmesi	25
2.5.6.3	Kolonlar	26
2.5.6.4	Kolon Seçiminde Önemli Noktalar	28
2.5.6.5	Hareketli Fazlar	29
2.5.6.6	Tekniğin Kullanım Alanları.....	30
3.	POLİELEKTROLİTLER	31
3.1	Polielektrolitlerin yapısal davranışlarını etkileyen faktörler	31
3.2	Homopolielektrolitler	32
3.3	Poliamfolitler	34
3.4	Bovine serum albumin proteinin fizikokimyasal özellikleri	35
4.	POLİMER-PROTEİN KOMPLEKSLERİ	36
4.1	Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller	36
4.2	Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler	36
4.3	İnterpolielektrolit Kompleksler	38
4.4	Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar	39
5.	DENEYSEL KISIM	43
5.1	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	43
5.1.1	Kullanılan Cihazlar	43
5.1.2	Kullanılan Kimyasallar Maddeler.....	44
5.2	BSA/PAA Kompleksleri.....	45
5.2.1	Kullanılan Çözeltiler.....	45
5.2.2	Komplekslerin Hazırlanışı	45
5.2.3	Hesaplamalar	45
5.3	UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri.....	46
5.4	Moleküler Eleme Kromatografisi Ölçümleri.....	47
5.5	Komplekslerin pH'a Bağlı Türbidimetrik Titrasyonu	47
6.	DENEY SONUÇLARI	48
7.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	71
7.1	PAA'nın BSA ile Çökmesi.....	71
7.2	Suda-Çözünür Sistemlerin HPLC Yöntemi ile Analizi	72
7.2.1	pH 5.0-7.0 Aralığında Kompleks Oluşumu.....	72
7.3	pH 4.0-4.3 Aralığında Kompleks Oluşumu.....	74
7.4	Suda-Çözünmeyen Polikomplekslerin Fraksiyon Bileşenleri	76
7.5	PAA'nın BSA ile Suda Çözünür Kovalent Konjugasyonu	76
	KAYNAKLAR.....	78

SİMGE LİSTESİ

g	gram
kcal	kilokalori
M	Molar
mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre
Mw	ağırlıkça-ortalama molekül ağırlığı
n	mol
nm	nanometre
τ	türbidite
°C	Santigrat derece
μ l	mikrolitre
Å	angström
dak	dakika
w	pik genişliği
c	konsantrasyon
a	pik genişliğinin ölçüldüğü yüksekliğe bağlı sabit
t_0	ölü zaman
t_R	alıkonma zamanı
ε	molar sönmleme katsayısı
I	yansıyan ışın şiddeti
I_0	gelen ışın şiddeti

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
Ab	Antikor
Ag	Antijen
BSA	Bovin serum albumin
CH ₃ COOH	Asetik Asit
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN ₃	Sodyum azid
PAA	Poliakrilik Asit
PE	Polielektrolit
PSSNa	Poli(sodyum stiren sülfonat)
QELS	“Quasielastic” ışık saçılması
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet
RT	Retention Time

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Basit bir sıvı kromatografi sisteminin ana parçaları.....	5
Şekil 2.2 Teğet yöntemi.....	11
Şekil 2.3 Sigma (σ) yöntemi.....	11
Şekil 2.4 İki bileşenin birbirinden ayrılması (rezolüsyon)	13
Şekil 2.5 Rezolüsyona k' , N ve α 'nın etkisi.....	15
Şekil 2.6 Silika jelin kimyasal yapısı	16
2.7 Ters faz kromatografisinde sabit fazla etkileşme mekanizması	17
Şekil 2.8 Ters faz kromatografisinde solvent etkisi	17
Şekil 2.9 Affinite Fazın Bileşenleri ve affinite kromatografisinde etkileşim	22
Şekil 2.10 Şematik Eleme İşlemi, [6].....	23
Şekil 2.11 Jel filtrasyon kromatografisinde molekül boyutuna göre oluşan kromatogram, [7].24	
Şekil 3.1 Polielektrolitlere örnekler.....	31
Şekil 3.2 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu	32
Şekil 3.3 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu almasa [2]	33
Şekil 3.4 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi	34
Şekil 4.1 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı (Kokufuta, 1994).....	36
Şekil 4.2 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması.....	39
Şekil 4.3 Protein ve poliyon içeren stokiyometrik kompleksin şematik gösterimi.	41
Şekil 6.1 BSA-PAA karışımlarının pH'a bağlı optiksel yoğunluğu (OD), $n_{BSA}/n_{PAA} = 15$; (a) pH 4'de hazırlanan BSA-PAA karışım çözeltilerinin pH titrasyonu; (b) pH 7'de hazırlanan BSA-PAA karışım çözeltilerinin pH titrasyonu (Çimen, 2006).	48
Şekil 6.2 (A) Farklı pH değerlerinde, BSA-PAA karışımlarının n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı optiksel yoğunluğu (OD ₅₀₀); (B) Farklı pH değerlerinde, bileşenlerin oranına bağlı BSA-PAA karışımlarından elde edilen çökelti miktarı (Çimen, 2006). ...	49
Şekil 6.3 Çözeltilerin farklı pH değerlerinde 4.0-4.3 (A) ve 5.0-7.0 (B) elde edilen, n_{BSA}/n_{PAA} oranlarına göre BSA-PAA karışımlarının üst fazlarının optik yoğunluğuna (OD ₂₈₀) bağlı değişimi	50
Şekil 6.4 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}=1(1); 5(2); 20(3); 35(4); 50(5)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 7.0 (A). n_{BSA}/n_{PAA} oranlarının Pik I (○) ve Pik IV (□) alanlarına bağlı değişimi; pH 7.0 (B). PAA konsantrasyonu sabit (1mg/1ml). BSA konsantrasyonu 2mg/ml.	51
Şekil 6.5 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}= 1(1); 2(2); 3(3); 5(4)$ oranlarında hazırlanan BSA- PAA karışımlarının HPLC kromatogramları, pH 6.0 (A). Serbest PAA ve Pik IV'ün $n_{BSA}/n_{PAA}= 7.5(1); 10(2); 30(3); 40(4); 50(5)$ oranlarındaki HPLC kromatogramları, pH 6.0 (B). PAA konsantrasyonu sabit (1mg/1ml). BSA konsantrasyonu 1mg/ml.....	52
Şekil 6.6 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}= 0.1(1); 0.25(2); 0.4(3); 0.5(4); 0.75(5); 1.0(6)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının pH 5.0'deki HPLC kromatogramları (A). Bu n_{BSA}/n_{PAA} oranlarının, alanlarına bağlı değişimi; pH 5.0 (B).	53
Şekil 6.7 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}= 2(1); 3(2); 5(3); 7.5(4); 10(5)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 5.0.	54
Şekil 6.8 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}= 15(1); 20(2); 25(3); 35(4); 40(5)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 5.0.	55
Şekil 6.9 $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.05-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I'e ait alan değişimi; pH 5.0.....	56
Şekil 6.10 $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5-50$ oranlarına bağlı olarak, pik II'ye ait alan değişimi; pH 5.0.	56
Şekil 6.11 Bileşenlerin farklı $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5-50$ molar oranlarında kompleksin içindeki (pik	

I) BSA konsantrasyonu; pH 5.0.....	57
Şekil 6.12 Bileşenlerin farklı $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5-50$ molar oranlarında polikompleksin bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı; pH 5.0.....	58
Şekil 6.13 Serbest PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1); 0.75(2); 1.0(3)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.....	59
Şekil 6.14 Serbest BSA ve $n_{BSA}/n_{PAA} = 2(1); 3(2); 5(3); 7.5(4)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.....	60
Şekil 6.15 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA} = 25(1); 30(2); 35(3); 50(4)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.....	61
Şekil 6.16 $n_{BSA}/n_{PAA} = 25-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I (A) ve pik II (B)'e ait alan değişimi; pH 4.0.....	62
Şekil 6.17 $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.05-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I'e ait yükseklik değişimi; pH 4.0.....	63
Şekil 6.18 $n_{BSA}/n_{PAA} = 2-40$ oranlarında çökelekteki polikompleks parçacıklarının bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı; pH 4.0.....	64
Şekil 6.19 $n_{BSA}/n_{PAA} = 40$ kompleksinin supernatantı ve fraksiyonlarının HPLC kromatogramları (A); ve bunların 280 nm'deki floresans ölçümleri a: fraksiyon I, b: fraksiyon II ve c: $n_{BSA}/n_{PAA} = 40$ kompleksinin supernatantı; pH 4.0 (B) (B. Battal, 2006).....	65
Şekil 6.20 $n_{BSA}/n_{PAA} = 5-40$ oranlarında, pH = 4.3'deki BSA-PAA karışımlarının 3mg/ml konsantrasyonundaki çökeltilerinin pH 7'de tekrar çözünmüş hallerinin HPLC kromatogramları.....	66
Şekil 6.21 $n_{BSA}/n_{PAA} = 5-30$ oranlarında, pH = 4.3'deki BSA-PAA karışımlarının çökeltilerinin pH 7.0'de tekrar çözündüğünde açığa çıkan komplekslerde, polikompleks parçacıklarının bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı.....	67
Şekil 6.22 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramları; pH 7.0; 25° C.....	68
Şekil 6.23 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramlarındaki pik I' e ait alanlarındaki değişimi, pH 7.0.....	69
Şekil 6.24 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramlarındaki pik II' ye ait alanlarındaki değişimi, pH 7.0.....	69
Şekil 6.25 Bileşenlerin farklı $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ molar oranlarında kovalent konjugata bağlanan BSA konsantrasyonu.....	70
Şekil 6.26 pH 5.0'deki polikomplekste (1) ve pH 7.0'deki kovalent biyokonjugatta (2), $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ oranlarında polikomplekslerin/kovalent konjugatlarının bileşimindeki BSA moleküllerinin sayısı.....	70
Şekil 7.1 Farklı pH değerlerinde (pH 4, pH 5, pH 7) PAA ve BSA'nın sahip olduğu yüklerin şematik gösterimi.....	73

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 Belirli Dalgaboylarında Çeşitli Fonksiyonel Grupların Molar Soğurganlık (ϵ) Değerleri	7
Çizelge 2.2 Sigma (σ) Yöntemi	12
Çizelge 2.3 Ters faz kromatografisinde kullanılan ticari adsorbentlere ait parametreler.....	18
Çizelge 2.4 Ters Faz Kromatografisinde hareketli faz olarak kullanılan solventlere ait önemli parametreler	19
Çizelge 2.5 İyon değiştirme kromatografisinde kullanılan anyon ve katyon değiştiriciler [1] .	19
Çizelge 2.6 İyon Çifti Kromatografisinin Uygulanması	21
Çizelge 2.7 Afinite kromatografisinde analit-ligand ilişkisi	22
Çizelge 2.8 Yarı Katı Büyük Partiküllü Dolgu Maddeleri	26
Çizelge 2.9 Yarı Katı Küçük Partiküllü Dolgu Maddeleri	27
Çizelge 2.10 Eleme Kromatografisi Kolonları İçin Katı Dolgu Maddeleri	27
Çizelge 2.11 Eleme Kromatografisi Kolonları İçin Yumuşak Jeller.....	28
Çizelge 5.1 $n_{BSA}/n_{PAA}=0.05-50$ aralığındaki sabit 1mg/1ml PAA konsantrasyonunda hazırlanan komplekslerdeki BSA konsantrasyonu	46

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteğini esirgemeyerek, beni yönlendiren sayın danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste'ye,

Bu tezin oluşmasının her aşamasında, engin bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen değerli bilimadamı, Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Kurucu Başkanı hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafaev'e şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışmasında öncelikle kompleksleri hazırlayan Nermin Çimen'e, paylaşımları için Arş. Gör. Murat Topuzoğulları'na ve Arş. Gör. Eray Dalkakıran'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü laboratuvarlarındaki çalışmalarım sırasında, arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma;

Maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme, teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Proteinler ile sentetik polianyonların kompleksleri ve kovalent konjugatları biyomühendislik, tıp ve temel bilimlerde büyük öneme sahiptir. Bu sistemler antijen-antikor etkileşimi, spesifik nükleoprotein kompleksleri ve nükleotid-protein kompleksleşmesi için taklitçi model oluştururken, aynı zamanda sentetik aşı geliştirilmesi amacıyla immunojenik bileşenler hakkında yeni bilgilerin elde edilmesini sağlar.

Poliyon zincirleri ve protein molekülünün zıt yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşimler, polimer-protein komplekslerinin oluşmasını sağlar. Kompleks oluşumu mekanizması ve çözünebilen-çözünemeyen fazların transformasyonu sırasında oluşan parçacıkların yapısının anlaşılması için matriks çözeltiler pH titrasyonu, spektrometrik ve HPLC yöntemleriyle incelenmiştir. Kompleks oluşumunun ve sistemdeki faz geçişlerinin, çözeltilerin pH'ına ve bileşenlerin oranına bağlı olduğu gösterilmiştir. Poliakrilik asit (PAA) ve bovine serum albumin (BSA), farklı pH değerlerine (pH=4,0-7,0) ve geniş bir aralıktaki protein/polimer oranlarına ($n_{BSA}/n_{PAA}=0,05-50$) bağlı olarak, suda çözünebilen ve çözünemeyen polimer-protein kompleksleri oluştururlar. pH > pI olduğu zaman, PAA-BSA komplekslerinin kararlılığı ihmal edilebilecek kadar zayıftır (pH 7,0). Polielektrolit komplekslerinin oluşumu ve serbest bileşenlerin varlığı ilk kez pH 6,0 değerinde gözlenmeye başlanmıştır. Fakat pH < pI durumunda kararlı polikompleks oluşumları artmıştır ve geniş bir aralıktaki n_{BSA}/n_{PAA} oranlarında, farklı fizikokimyasal ve konformasyonel özelliklere sahip polikompleks oluşumları incelenmiştir (pH 5,0). Suda çözünemeyen PAA-BSA komplekslerinin varlığı pH 4,0 değerinde gözlenmiştir. Bu çalışmada suda çözünebilen PAA-BSA komplekslerinin çözünemeyen hale faz geçişleri ilk defa incelenmiş ve proteinlerle polielektrolitlerin bağlanma mekanizmasının bileşenlerin oranına da bağlı olduğu gösterilmiştir; sonuçta çözünebilir, kompleks kooservasyon veya amorf çökelti oluşumlarının varlığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: polielektrolit, poliakrilik asit, bovine serum albumin, faz ayrılması, jel filtrasyon kromatografisi

ABSTRACT

The complexes and covalent conjugates of synthetic polyanions with proteins appear to be of great importance for bioengineering, medicine and different areas on basic science. This systems can be considered as a model of antigen-antibody interaction, specific nucleoprotein complexes and nucleotid-protein complexes, in particular supplying us with novel information on immunogenic compounds for synhetic vaccine innovation.

Polymer-protein complexes form as a result of the electrostatic interaction of polyion chains with the oppositely charged groups of the protein molecules. To find out the mechanism of the polycomplex formation and structure of forming particles as well as the transition of soluble polycomplexes to insoluble state, water-soluble mixtures and matrix solutions of insoluble BSA-PAA complexes investigated by pH titration, spectrometric and HPLC methods. It was shown that the complex formation and the phase state of the systems depends on pH of the solution and ratio of components. Polyacrylic acid (PAA) and bovine serum albumine (BSA) form polymer-protein complexes which are water soluble or insoluble depending on pH values (pH=4.0-7.0) and a wide range of protein/polymer ratios ($n_{BSA}/n_{PAA}=0.05-50$). The stability of PAA-BSA complexes at pH > pI is negligible weak (pH 7.0), at the same time decreasing of pH (pH < pI) results with increasing of the stability of polycomplex particles and it was established that formation of polycomplexes have different physicochemical and conformational properties at a wide range of n_{BSA}/n_{PAA} ratios (pH 5.0). Existence of water-insoluble PAA-BSA complexes have been observed at pH 4.0. It was first time transition of soluble polycomplexes to insoluble state have been stated and binding mode of polyelectrolytes to proteins is assumed to be dependent on the ratio of components as a result in formation of soluble polycomplexes, complex coacervation or amorphous precipitates.

Key words: polyelectrolyte, polyacrylic acid, bovine serum albumin, phase separation, gel permeation chromatography

1. GİRİŞ

Fonksiyonel biyopolimer sistemlerden olan, suda çözünebilir ve çözünemeyen protein-polielektrolit kompleksleri, çok çeşitli alanlardaki uygulamaları ile polimer-protein bileşenlerinin çok özel bir sınıfını teşkil ederler (Lee ve Schon, 1977; Mustafaev ve Saraç, 1996a; Mattison vd., 1998). Sentetik polielektrolitler (PE) kovalent bağlanma yoluyla proteinleri modifiye ederek orjinal antijenik proteinlerin immunogenetiğini ve/veya immunoreaktivitesini ve in vivo kararlılığını artırır (Abuchouwski vd., 1977; Bae vd., 1987; Monji ve Hoffman, 1987; Petrov vd., 1992; Putnam ve Kopecek, 1995). Ayrıca, özel viral antijenler ile PE konjugatları (veya kararlı kompleksleri) çok güçlü koruyucu özellikler gösterirler ve yeni bir aşı gibi gözönüne alınabilirler. Geçiş iyonları varlığında proteinler ve PE' ler daha önceki çalışmalarda gösterildiği gibi üçlü kompleksleri oluştururlar (Morawetz ve Hughes, 1952; Mustafaev, 1996b; Mustafaev, 1996c, 1998).

PE' ler ile proteinlerin sulu çözeltilerdeki etkileşimi pH ve iyonik şiddete hassas olduğu kadar proteinlerin izoelektrik noktasına da göre de değişir (Kabanov vd., 1978; Park vd., 1992). Polimer-protein kompleksleri poliyon zincirleri ile zıt yüklü protein molekül grupları arasındaki elektrostatik etkileşimler sonucu oluşur. PE' lerin proteinlere bağlanma modu bileşenlerin oranına göre değiştiği varsayılabilir ve çözünebilir polikompleks (Berdick ve Morawetz, 1954; Kabanov vd., 1980; Mustafaev vd., 1990), kompleks koaservasyon (Lenk ve Thies, 1987; Dubin vd., 1987; Sacco vd., 1988), veya amorf çökelti oluşumu ile sonuçlanabilir (Burgess ve Carlesa, 1984; Veis, 1991). Bu faz değişimlerinin sonuçları; proteinleri ayırmada polielektrolitlerin kullanımını, polielektrolit komplekslerde enzimlerin immobilizasyonu veya stabilizasyonunu ve protein substrat affinitesinin modifikasyonunu içermektedir (Shieh ve Glatz, 1991). Bu durum şüphesiz ki hücrelerde oldukça önemlidir. Bazik histonlarla DNA'nın coulombik etkileşimi nükleik asitlerin "yığılmasına" neden olmaktadır ve polilizin gibi bazik polipeptidlerin DNA'nın davranışında son derece etkili olduğu düşünülmektedir. Protein ve nükleik asitler arasındaki benzer elektrostatik etkileşimler transkripsiyon prosesinde rol almaktadır.

Yapılan çalışmalarla polikomplekslerin bileşimini makromoleküler seviyede anlamak mümkün olmuştur. Polimer-protein karışımlarının homojen çözeltilerine basit fizikokimyasal metodların uygulanması polikomplekslerin yapısı hakkında güvenilir sonuçlar verme imkanı sağlamıştır (Dubin, 2005).

Zayıf bir polielektroliti (poliakrilik asid (PAA), polimetakrilik asid (PMAA), v.d.) protein bağlanmasında bir matriks gibi kullanmak kompleks veya konjugat özelliklerinin

etkilenmesinde ekstra olanaklar sağlar (Mustafaev vd., 1975, 2001; Kabanov vd., 1977). Proteinlerin PAA ve PMAA tarafından çöktürülmesi ve suda çözünemeyen komplekslerin çözünebilen faza geçişleri pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı ve PE' nin polimerleşme derecesine bağlı olarak çalışıldı. Polimer sarmalının konformasyonel durumunun protein-polimer konjugatlarının özelliklerine etkisi araştırıldı (Mustafaev vd., 2001). Sedimentasyon ve dinamik ışık saçılması çalışmaları, çözünabilir protein-poliyon komplekslerinin faz ayrılmaları ve faz geçişlerinin öncülleri olduğunu göstermiştir (Xia ve Dubin 1994). Faz ayrılması, karışımdaki protein konsantrasyonuna bağlı olarak kısmi veya tamamen önlenabilir. Bununla birlikte, çözünemeyen komplekslerin varlığında çözünür protein-polimer komplekslerinin veya konjugatlarının fiziko-kimyasal parametrelerine dair detaylı bilgiler hala eksiktir.

Mustafaev ve arkadaşları akrilik asitle N-isopropilakrilamid ve N-vinilpirolidonun kopolimerleri gibi polianyonlar ile protein antijenlerinin karbodiimidle aktifleştirilmiş kovalent konjugatlarını araştırmışlardır (Başalp vd., 2000; Dilgimen vd., 2001). BSA-EDC-PE karışımı içindeki elektrostatik inter (polimer-protein) kompleksinin oluşumunun, en hızlı ilerleyen proses şeklinde ve sonra bileşenlerin karboksil ve amino grupları arasında kondensleşmenin (kovalent konjugasyon) olduğu ilk defa gösterilmiştir. Protein-polimer komplekslerinin kovalent konjugasyon reaksiyonlarının öncüsü olduğu farzedilebilir ve buna göre, istenilen fiziko-kimyasal özelliklerdeki konjugat molekülleri hazırlamak için bileşenlerin etkileşiminin (kompleks oluşumu) detaylı analizi gerekmektedir. Bu kovalent konjugatlardan bazıları yüksek immunogenetiklik gösterirler ve yüksek seviyede immunolojik koruma sağlarlar (Petrov vd., 1990, Mustafaev vd., 1996d, 1998; Yücel vd., 2001, Başalp vd., 2002). Ancak, bundan önce kullanılan polianyonlar daha yüksek bileşimli heterogenetik ve moleküler ağırlık dağılımıyla karakterize edildiler. Bu nedenle, kovalent konjugattaki immunogenetiklik ve fiziko-kimyasal özellikler arasındaki ilişkiye dayalı bilgi hala yoktur.

PE ile proteinler arasındaki kompleks oluşumu birçok araştırmanın konusu olmuştur. Çözünür polimer-protein kompleksleri kolloid ve polimer kimyasında çok iyi bilinen geniş aralıktaki yöntemler ile çalışılmıştır (Kabanov vd., 1978; Mustafaev ve Kabanov, 1981; Seyrek vd., 2003). Son zamanlarda, HPLC yönteminin polimer-protein karışımlarına uygulamaları geleneksel fiziko-kimyasal yöntemlerle kıyaslamayı mümkün kılarken, kompleks oluşumu hakkındada yeni bilgilerin açığa çıkmasını sağlar (Mustafaev vd., 1996b; Dinçer vd., 1997; Hatano vd., 2003; Taşdelen ve Bayülken, 2004).

Bu çalışmada, bovine serum albuminin poliakrilik asit (PAA) ile etkileşimleri bileşenlerin

farklı molar oranlarına ve pH değişimlerine dayanarak sistematik olarak turbidimetrik, floresans ve HPLC yöntemleriyle araştırılmıştır. Suda çözünebilen karışımların ve çözünemeyen BSA-PAA komplekslerinin matriks çözeltilerinin analiziyle, polikompleks oluşum mekanizması ve çözünebilen komplekslerin çözünemeyen duruma geçerken oluşan parçacıkların yapısı ve tersinir olarak, farklı kompleksleşme durumlarında suda-çözünemeyen polikomplekslerin çözünürlüğü hakkında yeni bilgiler edinilmiştir. Bu çalışmada ayrıca PAA'nın BSA ile kovalent konjugasyon mekanizması, karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2. SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografi, gaz veya likit olabilen hareketli bir fazla (mobil faz) likit ya da solid olabilen sabit bir faz (stasyoner faz) arasında maddelerin dağılması esasına dayanan ayırma yöntemidir. Kalitatif (nitel) ve kantitatif (nicel) analize olanak sağlar. Kromatografi uygulama biçimine göre gaz ve sıvı kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır.

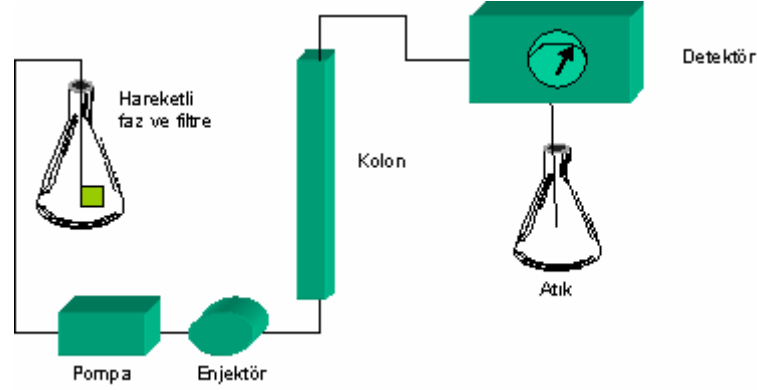
Kromatografi tekniğinin mucidi olarak Rus botanist Michael Tsweet gösterilmektedir. Tsweet yeşil yapraklardaki pigmentleri ayırmak için 1903'te bir tebeşir kolonu düzeneği kullanmıştır. Kromatografi terimi de, Tsweet tarafından 1906 yılında yayınlanan makalede konulmuş ve kolondan aşağı hareket eden renkli bölgeler için kullanılmıştır. D.T. Day'in de aynı yıllarda petrol fraksiyonlarını ayırmak için kromatografik yöntemler kullandığı belirtilmektedir. Kromatografi uzun yıllar geri planda kalmış, kullanıldığı zaman ise genellikle sıvı- katı kromatografisi (LSC) yöntemi olarak kullanılmıştır. 30'lu yılların sonunda ve 40'lı yılların başlarında kromatografi tekniği ince tabaka kromatografisinin bulunmasıyla gelişmeye başlamıştır.

İnce tabaka kromatografisi 1938'de Izmailov ve Schraiber tarafından önerilmiş ve 1958'de Stahl tarafından geliştirilmiştir. Martin ve Synge'nin 1941'de kendilerine Nobel kazandıran başarılı çalışmaları sıvı kromatografisinde sadece bir devrim yapmamış aynı zamanda gaz kromatografisi ve kağıt kromatografisinde de gelişmeler sağlamıştır. 1952'de Martin ve James gaz kromatografisi üzerine ilk yayınlarını yayınlamışlardır. 1952- 1960'ların sonlarına doğru gaz kromatografisi sofistike bir analitik teknik olarak gelişmiştir.

Sıvı kromatografisi, başlangıçta düşey kolonlarda yer çekimi etkisiyle yapılan yavaş bir tekniktir. Kolonlara basınç uygulanması ile elüsyon işlemi hızlandırılmış ve yöntem "yüksek basınçlı sıvı kromatografisi" adını almıştır. Günümüzde yöntem çok gelişmiştir ve üstün ayırma gücünden dolayı "High Performance Liquid Chromatography (HPLC)" olarak da tanımlanmaktadır (Lough ve Wainer, 1996).

2.1 HPLC CİHAZLARI

Bir sıvı kromatografi aletinin ana parçaları şematik olarak Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Basit bir sıvı kromatografi sisteminin ana parçaları

2.1.1 Pompalar

HPLC’de pompanın fonksiyonu, hareketli fazı kolondan kontrollü bir akış hızıyla geçirmektedir. Pompaların sabit basınçlı ve sabit akış pompası olmak üzere iki ana tipi vardır.

Sabit basınçlı pompa bu işi hareketli faza sabit basınç uygulayarak yapar. Böylelikle kolondaki akış hızı, kolonun akış direncine ve pompa ve dedektör çıkışındaki diğer kısıtlamalara bağlıdır. sabit akış pompalarda emmebasma ve şırınga pompaları olarak ikiye ayrılabilir.

Emmebasma pompalar atımlı bir akış meydana getirirler ve dedektör akışa hassas ise bu pompalar atım önleyiciler ve elektronik önleyiciler gerektirirler. Stabil bir dedektör “baseline”ı bu şekilde elde edilebilmektedir. Rezervuar sınırlamasının bulunmayış bunların avantajıdır. Şırınga pompalarda atımsız akış vardır. Buna karşılık rezervuarları kısıtlıdır. Akış değişiklikleri alıkonma sırasında belirgin bir eksiklik (akış süresinin kısılması) ve kaydedicide düzensiz beslenme oluşturdıklarından arzu edilmez. Bu yüzden HPLC cihazlarında sabit basınç pompaları çok kullanılmaz. Akıştaki değişiklikler önemli değildir.

2.1.2 Enjektörler

Numune, kolonun dolgu maddesini olumsuz yönde etkilemeyecek şekilde kolon başlarından sisteme verilmelidir. İki genel çalışma şekli vardır:

1. Çözücü akımını durdurarak

2. Çözücü akımını durdurmadan

Enjektörlerin üç ana şekli vardır:

- a) Dur-Ak: Akış durdurulur, enjeksiyon atmosfer basıncında yapılır; sistem kapalıdır ve akış yeniden başlatılır. Sıvılarda difüzyon küçük olduğu ve böylece rezolüsyon etkilenmediği için bu teknik kullanılabilir.
- b) Perdeli: Bu enjektörler gaz kromatografisinde kullanılan enjektörlere benzerler. 60-70 atmosfer civarına kadar kullanılabilir. Perdeler bütün sıvı kromatografisi çözücüleri ile uyum içinde olmamaktadır. Ayrıca, küçük partiküller yırtılmalara ve tıkanmalara sebep olabilmektedir.
- c) Loop Valfi: Bu tip enjektörler otomatize sistemlerde ve 10 µl'den daha büyük enjekte edilecek hacimler için kullanılır. Özel adaptörlerle daha küçük hacimler elle enjekte edilebilir. Doldur konumunda örnek loopu atmosfer basıncında doldurulur. Valf harekete geçirilince looptaki örnek kolona verilir.

2.1.3 Kolonlar

Kolonlar kromatografin en önemli parçasını teşkil eder. Analizin başarısı veya başarısızlığı kolona ve uygun çalışma koşullarına bağlıdır. Kolonlar iki grupta toplanabilir:

- a) Analitik: İç çapları 2-6 mm arasında değişir. Kolon uzunluğu genelde dolgu maddesinin tipine bağlıdır. Pelliküler dolgu maddeleri için alışlagelmiş uzunluk 50-100 cm'dir, mikropartiküler poröz dolgu maddeleri için 10-30 cm'lik kolonlar daha yaygındır.
- b) Preparatif: Genel olarak çapları 6 mm' dir ve daha geniş olanları bulunur. Uzunlukları 25-100 cm'dir. Kolonlar hemen her zaman paslanmaz çelikten üretilir. Genelde oda sıcaklığında çalışırlar, daha yüksek sıcaklıklarda da özellikle, iyon değiştirme ve eleme kromatografilerinde kullanılmaktadırlar.

2.1.4 Dedektörler

Dedektörler kolondan çıkan örnek bileşenlerin varlığını ve miktarını belirlemek için kullanılır. İyi dedektörlerden yüksek duyarlılık, düşük ses, geniş lineer cevap alanı ve tüm kimyasal yapılara duyarlılık göstermeleri, akış hızından ve sıcaklık değişiminden fazla etkilenmemeleri istenir. Modern bir HPLC dedektörü 254 nm UV dedektörüdür. Değişik dalga boylarında UV-VIS dedektörleri daha geniş bir bölgedeki bileşikler tarayabildikleri için yaygınlaşmaktadır. Jel filtrasyon kromatografisinde refraktif indeks dedektörleri kullanılmaktadır. Ancak bu tür dedektörler UV-VIS dedektörlerden daha az hassastır. Diğer dedektör türleride örneğin florometreler, alev iyonlaşma, elektro kimyasal kullanılabilir.

2.1.4.1 Ultraviyole/Görünür Bölge Dedektörü (Ultraviolet/Visible dedector-UV/VIS):

Absorbans (A) ölçülür. Absorbans, gelen ışın şiddetinin (I_0) yansıyan ışın şiddetine (I) oranının logaritmasına eşittir. Lambert-Beer yasasına göre molar soğurganlık (molar sönümlleme katsayısı, ϵ), numunenin kalınlığı (hücrenin izlediği yol, b) ve numunenin molar konsantrasyonu, c belirlenir:

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon bc \quad (2.1)$$

Spektrum taraması yapmak, farklı dalga boyunda çalışmak veya dalga boyunu zamana karşı programlamak mümkündür. HPLC' de fotodedektör yansıyan ışığın şiddeti I değerini ölçer; ancak konsantrasyona bağlı bir şekilde, elektronik olarak bu sinyal logaritmik A' ya çevrilir. Kromatogramın ordinatı hücredeki analitin konsantrasyonuna bağlı olarak detector sinyalini gösterir.

Çizelge 2.1 Belirli Dalgaboylarında Çeşitli Fonksiyonel Grupların Molar Soğurganlık (ϵ) Değerleri

İsim	Kromofor	Dalgaboyu (nm)	Molar sönümlleme, ϵ
Asetil	-C=C	175-180	6,000
Aldehid	-CHO	210	1,500
Amin	-NH ₂	195	2,800
Azo	-N=N-	285-400	3-25
Bromür	-Br	208	300
Karboksil	-COOH	200-210	50 - 70
Disülfid	-S-S-	194	5,500
Ester	-COOR	205	50
Ether	-O-	185	1,000
Keton	>C=O	195	1,000
Nitrat	-ONO ₂	270	12
Nitril	-C=N	160	-
Nitrit	-ONO	220 - 230	1000-2000
Nitro	-NO ₂	210	kuvvetli

2.1.4.2 Fotodiyod Array Dedektörü (Photodiode array dedector-DAD):

UV/VIS dedektörden farkı, 512 elementden oluşan bir yüzeyde, her elementin ayrı bir dalga buyundaki absorbansı eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Bu sayede 3 boyutlu kromatogramlar almak ve istenilen her pikin çok hızlı spektrum taramasını görebilmek olasıdır. Ayrıca istenilen dalga boyu aralığında çalışılabilmesi bu dedektörün sağladığı bir diğer önemli avantajdır. Kullanılan ışık kaynağı döteryum veya tungsten lambadır.

2.1.4.3 Floresans Dedektörü (Fluorescence dedector-FLD):

Organik maddelerin yaklaşık %15' i floresans oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan floresans ölçülmektedir. Kullanılan ışık kaynağı xenon lamba olup, duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık 10^3 kat fazladır. Bu dedektör ile 10^{-11} g/mL gibi çok düşük gözlenebilme sınırlarına inilebilmektedir. Luminesans özelliğine sahip olan ilaçların, aminoasitlerin tayini yapılabilir yada bazı biyokimyasal bileşikler floresant bir madde ile tepkimeye sokulup, yeni bir floresant ürün veya etiketlenirilmiş ürün oluşturulur.

2.1.4.4 İletkenlik Dedektörü (Conductivity dedector-CDD):

İletkenlik ölçülür. Daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılır. Organik sistemler için çok fazla uygun olmayıp, sulu sistemlere 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.

2.1.4.5 Kırılma İndisi 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.

2.1.4.6 Elektrokimyasal Dedektörü (Electrochemical dedector-ECD):

Elektroaktif maddeler analiz edilebilir. Yani bileşenler, belirli potansiyel değerlerinde yükseltgenebilir veya indirgenebilir olmalıdır. Ölçülen fiziksel özellik tayin sırasında oluşan elektrik akımıdır. 10^{-11} - 10^{-12} g/mL değerinde gözlenebilme sınırları vardır.

2.1.4.7 Kütle Dedektörü (Mass dedector-MS):

Örnek bileşenlerine ait çok özgün kromatogramlar elde edilir, dolayısıyla özellikle kalitatif tayinlerde teşhis amaçlı kullanımlarda çok önemli bir dedektördür.

2.2 Gradient Elüsyon

Gradient elüsyon kromatografik analiz sırasında mobil fazın kuvvetini arttırma olarak tanımlanır. Gradient elüsyonun toplam etkisi kolonda kuvvetle tutulan bileşiklerin retensiyon zamanlarını kısaltmaktır. Gradient elüsyonun esasları Snyder tarafından tanımlanmıştır. Gradient elüsyon pek çok avantajlar sağlar:

- 1- Toplam analiz süresi önemli derecede kısalmır.
- 2- Pik şekli düzelir (kuyruklanmada azalma).

3- Pik şeklinde küçük değişmeler olduğu için efektif hassasiyet artar.

Gradient aşamalı veya sürekli olabilir. Optimum gradient deneme yanılma ile seçilir. Uygulamada gradientler pompadan önce veya sonra oluşturulur.

2.3 HPLC' nin Avantajları

HPLC gaz kromatografisinin tamamlayıcısı olarak düşünülebilir. Birçok durumda her iki teknik aynı ayırmayı sağlayabilir. Gaz kromatografisinde türevlendirme gerekiyorsa HPLC'de türevlendirilmemiş materyelle çalışma mümkün olabilir. Isıya dayanmayan veya uçucu olmayan materyallerde HPLC'nin seçimi mantıksal bir yoldur. Türevlendirme genelde kullanılan UV-görünür bölge dedektörlerinin hassasiyetlerinde artışlara yol açtığı için HPLC de popülerdir.

HPLC'nin geleneksel sıvı kromatografisine göre bazı avantajları vardır:

- a) Hız
- b) Pik Belirginliği (Rezolüsyon)
- c) Hassasiyet
- d) Kolonların yeniden kullanımı
- e) Büyük moleküller ve iyonik şekiller için idealdir,
- f) Örneğin geri kazanılmasında kolaylık.

2.3.1 Hız:

Analiz zamanı 1 saatten azdır. Analizlerin çoğu 15-30 dakikada tamamlanır. Kompleks olmayan analizlerin süresi 5 dakikadan azdır.

2.3.2 Pik Belirginliği (Rezolüsyon):

Gaz kromatografisinin aksine sıvı kromatografisi seçimli etkileşimlerin olduğu iki faza sahiptir. Gaz kromatografisinde akan gaz çözünmüş madde ile çok az etkileşime sahiptir. Ayrılma yalnız sabit faz tarafından gerçekleştirilir. HPLC de çözünmüş madde seçimli bir şekilde hem sabit hem de hareketli fazla etkileşir.

2.3.3 Hassasiyet:

HPLC' de kullanılan UV absorpsiyon dedektörleri nanogram (10^{-9} g) mertebesinde çok çeşitli materyeli saptayabilir. Floresans ve elektrokimyasal dedektörlerinde bu sınır 10^{-12} g,

pikogram düzeyine ulaşır. Kütle spektrometreleri, refraktif indeks v.s, dedektörlerin hepsi HPLC de kullanılabilir.

2.3.4 Kolonların Yeniden Kullanımı:

Klasik sıvı kromatografisinin aksine HPLC kolonları tekrar kullanılabilir. Kolonun değiştirilmesi gerekmedikçe aynı kolonda birçok analiz gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte kolonun bozulması enjekte edilen örneğin ve çözücünün tipine bağlıdır. Çözücü saflığı da kolonun ömrünü etkiler. Kolonlar kolayca rejenere edilebilirler.

2.3.5 Büyük Moleküller ve İyonik Şekiller:

Gaz kromatografisi için düşük uçuculukları sebebiyle uygun olmayan bu materyeller, eleme ve iyon değişimi modellerinde analiz edilirler. Türevlendirme sorunu ortadan kalkar.

2.3.6 Örneğin Geri Kazanılmasındaki Kolaylık:

HPLC’de kullanılan dedektörlerin çoğu moleküller için yıkıcı değildir. Örnek bileşenleri dedektörden geçerken kolaylıkla toplanabilirler. Birçok hallerde çözücü buharlaştırma yoluyla kolayca uzaklaştırılabilir. Bunun tek istisnası özel işlemler gerektiren iyon değişimidir.

2.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinin Teorik Esasları

Kolon çıkışına uygun bir dedektör yerleştirilirse dedektörden çıkan sinyal konsantrasyon-zaman grafiği şeklinde kayıt edilir. İdeal durumda grafik bir Gauss eğrisi şeklindedir. Bu grafiğe kromatogram denir.

t_0 = Ölü zaman (Belirli bir akış hızında solventi kolondan geçirmek için gerekli zaman olarakta bilinir. İnert bir bileşiğin kolon başlangıcından, kolon sonuna kadar sabit faz tarafından alıkonmadan geçişi için gerekli süredir.

t_R = Alıkonma zamanı: Örnek bileşenlerin kolona girişinden (örneğin enjeksiyonundan) kolondan çıkışına kadar (dedektöre ulaşması) gerekli olan süredir. Kromatogramdaki pikler dışında kalan kısımlar hareketli fazı göstermektedir ve “baseline” adını almaktadır. Alıkonma zamanı dakika olarak verilmektedir. Bazı hallerde alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmi de kullanılmaktadır. Bu durumda okuduğumuz değer maddenin, hareketli fazın kaçınıcı mililitresinde kolondan çıktığını göstermektedir. Piklerin kapladıkları alanlar maddelerin miktarları ile orantılıdır. Alıkonma zamanına,

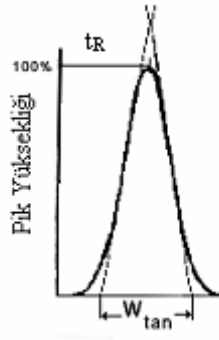
- Hareketli fazın cinsi,
- Sabit fazın cinsi ve tanecik büyüklüğü,

- c) Sıcaklık,
 - d) Kolon boyutları,
 - e) Hareketli fazın akış hızı
- etki etmektedir.

2.4.1 Teorik Plato Sayısı

Kolon etkinliği, sabit fazın ayırma işlemini tam olarak başarabilmesinin bir ölçüsüdür. Adsorbanın partikül boyutlarına, çözücünün akış hızına ve kolon uzunluğuna bağlıdır. Kolon etkinliği, pik darlığı ile tanımlanır. Pikler keskinleşince teorik plato sayısı ve buna bağlı olarak etkinlik artar.

2.4.1.1 Teğet Yöntemi

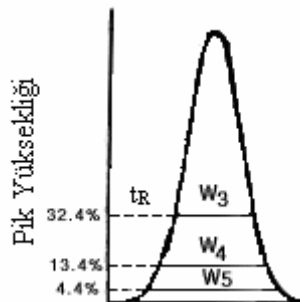


Şekil 2.2 Teğet yöntemi

$$N = a (t_R / W)^2 \quad (2.2)$$

Teğet yöntemine göre kolon etkinliği, $W_{tan}=W$; $a=16$ olmak üzere 2.2 formülü ile hesaplanır.

2.4.1.2 Sigma (σ) Yöntemi



Şekil 2.3 Sigma (σ) yöntemi

Bu yöntem, pik yüksekliğinin azalan değerlerinde pik genişliğini ölçer. Sonuç olarak, 3σ yöntemi pik yüksekliğinin % 32.4'ünde, 4σ yöntemi % 13.4'ünde ve 5σ yöntemi ise % 4.4'ünde ölçülür. 5σ yöntemi assimetriye göre en hassas yöntemdir. Çünkü pik genişliği en düşük noktadan ölçülür. 5σ yöntemi, kuyruk oluşumundan daha fazla etkilendiği için, Gauss eğrisi şeklinde olmayan piklerde daha küçük N değeri bulunur (Şekil 2.3).

Çizelge 2.2 Sigma (σ) Yöntemi

Method	W	a
3-sigma	W_3	9
4-sigma	W_4	16
5-sigma	W_5	25

Farklı uzunluklardaki kolonları kıyaslamak için teorik plato sayısı yerine HETP (height equivalent of theoretical plate) değeri kullanılır [1].

$$H = L / N \quad (2.3)$$

L = kolon uzunluğu (mm)

H = HETP (mm)

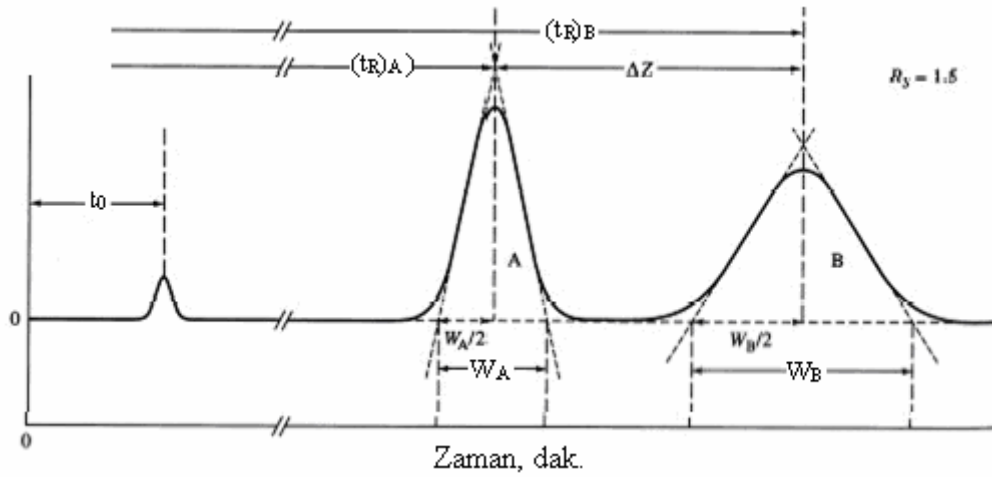
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde kolonlarda en uygun H değeri genellikle 0.01-1 mm arasındadır. İyi kolonlar daha küçük H değeri gösterir. H değeri kullanılan dolgu maddesinin partikül büyüklüğüne, akış hızına, hareketli fazın viskozitesine ve dolgu maddesinin kalitesine bağlıdır.

2.4.2 Rezolüsyon

İki bitişik pikin birbirine göre durumunu tanımlar (Şekil 2.4).

$$R = 2 [(t_R)_B - (t_R)_A] / (W_A + W_B) \quad (2.4)$$

Rezolüsyon yukarıdaki formül yardımıyla hesaplanır ve ayrılmanın ölçüsüdür. İyi bir ayırma için R değeri 1 veya daha büyük olmalıdır. Kolon etkinliği, çözücü akış hızı, dolgu maddesinin partikül büyüklüğü, çözücünün viskozitesi gibi kolon parametrelerinin fonksiyonudur. Rezolüsyonu, kolon seçimliliğini değiştirmek suretiyle düzeltmek de mümkündür.



Şekil 2.4 İki bileşenin birbirinden ayrılması (rezolüsyon)

2.4.3 Kapasite Faktörü (k')

Geciktirme faktörü olarak da tanımlanabilir. Maddenin adsorban tarafından geciktirilmesinin ölçüsüdür.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2.5)$$

$$k' = (t'_R) / t_0 \quad (2.6)$$

formülü ile hesaplanır. Burada t_0 ölü zamandır. Aletin ölü hacmi (V_0) yardımıyla hesaplanabilir.

$$V_0 = t_0 \times \text{akış hızı} \quad (2.7)$$

$$V_0 \approx \Pi / 8 \times 10^3 (\text{kolon çapı, mm}) (\text{kolon uzunluğu, mm}) \quad (2.8)$$

Ölü hacmin hesaplanmasında yararlanılan diğer bir yol ise, çalışma koşullarında kolonda tutulmayan bir madde enjekte etmektir. Örneğin Johansson ve arkadaşları meklofenamik asit ve metabolitlerini C_{18} kolonda metanol:fosfat tampon karışımı (45:55) ile ayırma sırasında, ölü hacmi sulfatiazol enjekte ederek bulmuşlardır.

Kapasite faktörü, kolon uzunluğu ve çözücünün akış hızına bağlı değildir, buna karşılık adsorbanın spesifik yüzey alanı ile orantılıdır. Kapasite faktörü çözücünün polaritesinden etkilenir. Silika jel gibi polar dolgu maddeleri ile çalışılırken hareketli fazın polaritesi arttıkça k' değeri azalır. Nonpolar dolgu maddeleri ile durum tersine döner. k' için en uygun değerler 1-5 arasındadır. k' küçük ise bileşenler kolonda çok az alıkonulmaktadır ve iyi ayırma sağlanamaz.

2.4.4 Ayırma Faktörü (α)

Bağıl retensiyon olarak da tanımlanır, kromatografik sistemin seçimliliğinin ölçüsüdür (Şekil 2.5).

$$\alpha = [(t_R)_B - t_0] / [(t_R)_A - t_0] ; \quad (t_R)_B > (t_R)_A \quad (2.9)$$

veya

$$\alpha = k_2' / k_1' ; \quad k_2' > k_1' \quad (2.10)$$

$(t_R)_B = (t_R)_A$ ise $\alpha = 1$ olur ve ayırma mümkün değildir. Ayırma faktörü hareketli fazın özelliklerinden etkilenir.

2.4.5 Ayırma Faktörü (α) ve Kapasite Faktörü (k')' nün Ayırma Üzerine Etkisi

2.4.5.1 α ve k' nün Resolüsyon Üzerine Etkisi

Ayırma Faktörü (α), kapasite faktörü (k'), teorik plato sayısı (N) in resolüsyonla olan bağıntısı aşağıdaki formül ile verilmiştir.

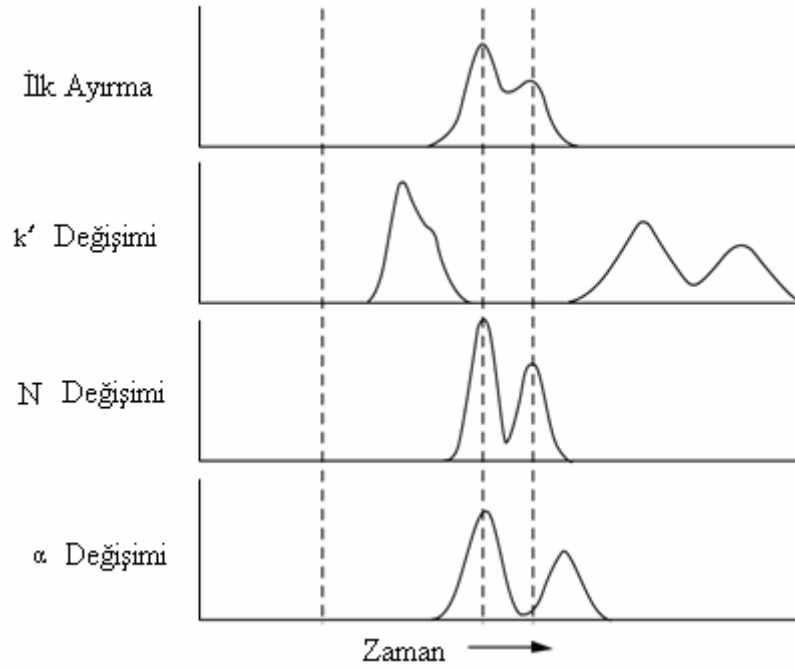
$$R = 0.25 \sqrt{N} [(\alpha - 1) / \alpha] \cdot [(k' / (k' + 1))] \quad (2.11)$$

k' ve α biliniyorsa, bu eşitlik yardımıyla gerekli teorik plato sayısı hesaplanabilir. Resolüsyonu iki kez arttırmak için N dört kez artmalıdır.

2.4.5.2 α ve k' nün Teorik Plato Sayısı (N) Üzerine Etkisi

Ayırma Faktörü (α) ve kapasite faktörü (k'), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi veya ince tabaka kromatografisi yardımıyla kolayca hesaplanabilir. Bir karışımın ayrılabilmesi için gerekli kolon etkinliğini bilmek önemlidir. Formül değiştirilerek N hesaplanabilir ($R=1$ kabul edilir).

Şekil 2.5'de görüldüğü gibi iki pikin resolüsyonu k' , α veya N 'i arttırmak suretiyle değiştirilebilir. Ayırmanın amacına (miktar tayini, teşhis vb.) göre istenen parametre değiştirilir.



Şekil 2.5 Resolüsyona k' , N ve α 'nın etkisi

2.5 HPLC'de Ayırma Mekanizmaları

HPLC'yi kolon içinde gerçekleşen ayırma mekanizmalarına göre şu şekilde sınıflandırabiliriz:

2.5.1 Normal Faz Sıvı Kromatografisi:

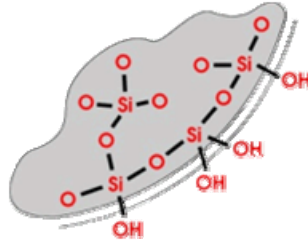
Bu teknik, adsorpsiyon kromatografisi olarak da isimlendirilir. Özellikle izomerlerin ayrılması amacıyla sıkça kullanılır. Maddelerin sabit fazda farklı güçte adsorplanması prensibi ile çalışan kromatografi türüdür. Teknik, çözelti ile bir adsorbanın (silikajel, alumina) yüzeyi arasındaki spesifik girişimlere dayanır. Sabit faz polar bir katıdır ve en çok, geniş yüzey alanına sahip olan silika jel kullanılmaktadır. Alumina ise aromatik hidrokarbonların ayrılması için kullanılır. Hareketli faz olarak ise hekzan, eter gibi apolar çözücülerden faydalanılmaktadır. Bu kromatografi türünde, apolar çözücülerde çözünen maddeler ayrılabilir.

2.5.1.1 Katı-Sıvı Kromatografisinde Kullanılan Kolon Dolguları

Yüksek performanslı katı-sıvı kromatografisinde kullanılan kolon dolguları iki çeşittir: Poröz dolgu maddesinin porlar nedeniyle yüzey alanı geniştir. Peliküler destek maddesinde ise yaklaşık 40 μ çapında inert bir çekirdek, 1-2 μ kalınlığında silika, alumina gibi poröz bir

tabaka ile kaplanır.

Sabit fazın, çözücünden daha polar olduğu sistemlerdeki ayırmalar normal adsorpsiyon kromatografisi olarak isimlendirilir. Bugün çeşitli porozite ve partikül büyüklüğündeki (5-45 μ) silika en yaygın olarak kullanılan dolgu maddesidir. Silika jel: Kimyasal görüş açısından silika gel, silisyum ve oksijen atomlarından oluşmuş üç boyutlu ağ yapısında bir bileşiktir (Şekil 2.6). Herbir silika gel partikülünde uçlardaki silisyum atomları OH grupları ile bağlıdır (silanol grupları) ve poröz yapı gösterir (Connell, 1999).

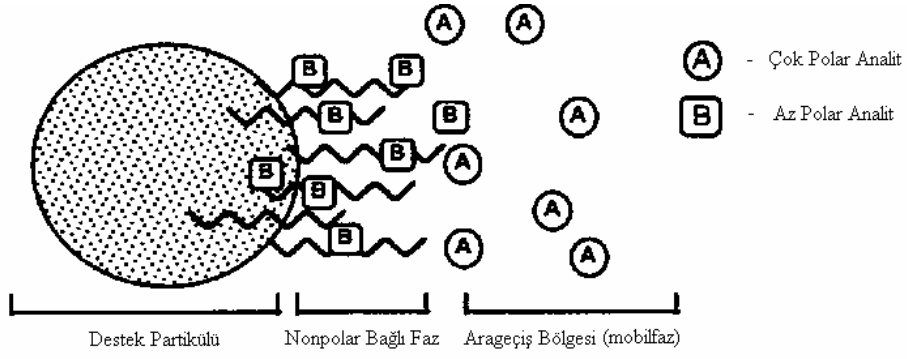


Şekil 2.6 Silika jelin kimyasal yapısı

Silika gel zayıf asidik yapıdadır, pH 1-8 arasında dayanıklıdır. Alkali bileşikler, nötral çözücülerle piklerde kuyruk oluşur.

2.5.2 Ters Faz Kromatografisi:

Sabit faz apolar yapıdadır ve hareketli faz polar çözücülerdir (su, alkol gibi). Burada, karışım bileşenlerinin farklı hızlarda göç etmeleri maddelerin sıvı sabit faz ve sıvı hareketli faz arasındaki farklı dağılımına dayanır. Sıvı sabit faz çok ince taneli destek katısının yüzeyine çok ince bir film halinde kaplanmıştır. En çok bilinen sabit fazlar C8 (oktil silan, $-(CH_2)_7-CH_3$) ve C18 (oktadesil silan, $-(CH_2)_{17}-CH_3$) adıyla bilinen yapılardır. C18 daha apolardır. Bu teknikte suda ve alkolde çözünen maddeler ayrılabilir (Şekil 2.7). Ters fazlı sistemlerdeki uygulamada; su nonpolar (hidrofobik=su sevmeyen) alkil gruplarını ıslatamaz ve böylece bu gruplarla girişim yapamaz. Hareketli fazdaki su miktarı arttıkça alıkonma süresi uzayacaktır.

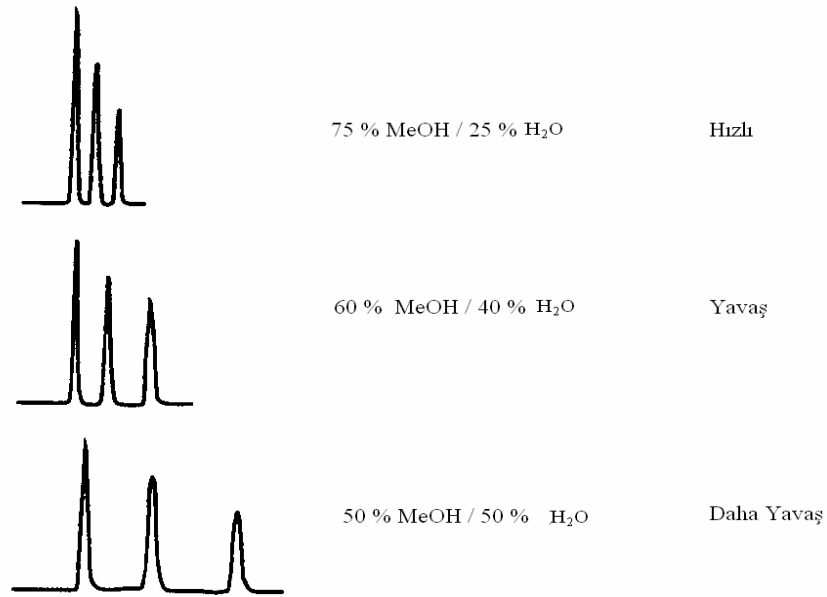


2.7 Ters faz kromatografisinde sabit fazla etkileşme mekanizması

Daha az polar olan (fazla hidrofobik) analitler hidrofobik bağlı faza daha fazla tutunurlar.

Daha fazla hidrofobik bağlı fazla ilgili daha fazla zaman harcar. Ve son olarak elue edilir. Methanol aktif bir solventtir. Silika jelin yüzeyi birçok farklı tipte fonksiyonel gruptan oluşmuş homojen olmayan bir yapıdadır.

Solvent Etkisi



Şekil 2.8 Ters faz kromatografisinde solvent etkisi

Metanol, suya göre daha apolar olduğu için metanol konsantrasyonu arttıkça daha hızlı ayırma işlemi gerçekleşir ve çözünürlük daha yüksektir (Şekil 2.8).

Çizelge 2.3 Ters faz kromatografisinde kullanılan ticari adsorbentlere ait parametreler

Adsorban	Por büyüklüğü	Por hacmi	Yüzey alanı	Karbon miktarı	Bağlanma yoğunluğu
	[Å]	[ml/g]	[m ² /g]	[%]	[μmol/m ²]
IB-Sil C18 (monomerik)	125	0.75	165	11	3.27
Prodigy ODS(2)	150	1.1	310	18.4	3.5
Selectosil C18	110	1.1	330	13	1.99
Ultracarb ODS (20)	90	0.75	370	22	3.53
Zorbax ODS	70	-	330	20	3.47
Kromasil C18	100	0.9	340	19	3.1
LiChrospher RP-18	100	1.25	350	21.4	3.9
Inertsil ODS-2	150	-	320	18.5	3.22
Nucleosil C18	100	1.0	350	14	2.06
Spherisorb ODS (2)	80	0.5	220	12	2.72
Hypersil C18 (ODS)	120	0.7	170	10	2.84
Novapak C18	60	0.3	120	7	2.71

2.5.2.1 Ters Faz Kromatografisinde Kullanılan Hareketli Fazlar

Hareketli faz genelde su ve su ile karışabilen çözeltilerin değişik oranlarda karıştırılmasıyla elde edilir. Ters-faz kromatografisinde sıklıkla kullanılan çözücü çiftleri su-metanol ve su-asetonitrildir. Ancak metanolün bir çok dezavantajı vardır. Şöyleki su ile karışımının yüksek viskozitesi, kolonun etkinliğini azaltır ve karışım hacimleri çok küçüktür (Örneğin 1 hacim MeOH ve 1 hacim H₂O₂ karışım vermezler). Yüksek viskozite sorunu yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında ortadan kaldırılabilir. Ancak bu durumda siloksana bağlı kolonların çabuk dejenere olmasına yol açar.

İstenilen sıcaklıkta yüksek kolon etkinliği istenirse, bunun için asetonitril daha az viskoz olduğundan ve polar olmayan çözeltilerde daha uyumlu olduğu için metenolden daha sık kullanılır. Asetonitril kullanımında alıkonma süreleri daha kısa olacaktır. İyon içeren sulu çözeltilerde ters-faz kromatografisi ile ayrılabilirler. İyonik örnekler en iyi şekilde iyon değişimi ya da iyon-çifti kromatografisi ile ayrılırlar. Ancak örnek zayıf asit veya zayıf baz

içeriyor ise ters-faz kromatografisi kullanılabilir. Bunun için hareketli faz önce asitlendirilir daha sonrada alkali hale getirilir.

Çizelge 2.4 Ters Faz Kromatografisinde hareketli faz olarak kullanılan solventlere ait önemli parametreler

İsim	MW	BP	R.I.	UV	Viscos.	μ
		[°C]		[nm]	[cP]	[Debye]
Asetonitril	41	82	1.341	195	0.358	3.37
Dioksan	88	101	1.421	215	1.26	0.45
Etanol	46	78	1.359	205	1.19	1.68
Metanol	32	65	1.326	205	.584	1.66
Isopropanol	60	82	1.375	205	2.39	1.68
Tetrahidrofuran	72	66	1.404	215	2.20	1.70
Su	18	100	1.333	185	1.00	1.84

2.5.3 İyon değiştirme kromatografisi:

İyonik maddelerin iyon değiştiriciler üzerinde tutulması metodu kullanılır. Anyon değiştiriciler ve katyon değiştiriciler olmak üzere iki çeşittir. Anyon değiştirici olarak $-\text{NH}_3^+$ ve NR_3^+ fonksiyonel grupları, katyon değiştirici olarak $-\text{COOH}$ ve $-\text{SO}_3\text{H}$ kullanılmaktadır. Anyonlar, katyonlar, zayıf asidik ve bazik gruplar içeren organik bileşikler ayrılır.

Çizelge 2.5 İyon değiştirme kromatografisinde kullanılan anyon ve katyon değiştiriciler, [1].

Ortam (X = matriks)	Doğa	pH	Uygulamaları
Anyon değiştiriciler			
X- $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	güçlü	2 - 11	Nükleotidler
X- $\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$	orta	2 - 7	Organic asidler
(CH_3CH_2) ₂ X- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+$ dietilamino-etil (DEAE)	zayıf	3 - 6	Proteinler
Katyon değiştiriciler			
X- SO_3^-	güçlü	2 - 11	amino asidler
X- COO^-	orta	6 - 10	Peptidler

X-CH ₂ COO ⁻ karboksimetil (CM)	zayıf 7 - 10	proteinler
--	--------------	------------

2.5.3.1 İyon Değiştirme Kromatografisinde Ayırma Mekanizması

Benzoik asit ($pK_a = 4.2$) ve o-metil benzoik asit ($pK_a = 3.9$) karışımının kuvvetli bazik anyon değiştirici yardımıyla ayrılmasını inceleyelim. Hareketli fazın içerdiği asetat iyonları, iyon değiştiriciye bağlı katerner amonyum grubu ile iyon çifti oluşturur. Ayrılacak asit karışımı bu sisteme enjekte edildiğinde, hareketli fazın pH'sına bağlı olarak iyonlaşacaklardır. $pH > 4.2$ ise her iki asitte iyonize hale geçer. Kural olarak asitlerin ayrılmasında çalışma pH'sı en büyük pK_a değerinden 1.5 fazla seçilir. Önce benzoik asit, sonra toluik asit sistemden ayrılır.

$$pH = pK_a + 1.5 \quad (2.12)$$

Bazlarla çalışılırken ise ayrılacak maddelerin iyonize olabilmesi için;

$$pH = pK_b - 1.5 \quad (2.13)$$

formülü ile hesaplanır.

Çalışma pH'sının seçiminde iyon değiştiricinin özelliklerine de dikkat etmek gerekir. Kuvvetli asidik ve bazik iyon değiştiriciler pH 2-10 arasında iyonizedir. Zayıf asidik katyon değiştiriciler $pH > 8$ koşulunda iyonize olduğu için silika ve peliküler esaslı zayıf asidik katyon değiştiriciler HPLC ayırmalarında kullanılamazlar (Silika çözünür). Zayıf bazik anyon değiştiriciler ise pH 6'nın altında iyonizedir.

Benzoik asit ve o-metilbenzoik asit karışımının zayıf bazik anyon değiştirici ile (μ Bondapak-NH₂, $pK_b = 6.5$) ayırmak için tamponun pH'sı 5'in altında olmalıdır. İyon değiştirici, iyonize olmadığı zaman ayırma adsorpsiyon yöntemine göre yürür. pH'nın değiştirilmesi kapasite faktörü (k') ve ayırmayı (α) etkiler.

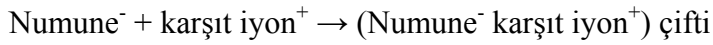
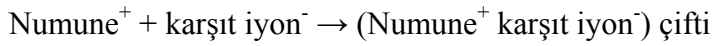
Kuvvetli asidik katyon değiştiriciler, kuvvetli ve zayıf asitlerin katyonlarını değiştirebildikleri gibi kuvvetli ve zayıf bazların katyonlarını da değiştirirler (Ca^{+} , K^{+} gibi katyonlar veya amin tuzları). Kuvvetli bazik anyon değiştiriciler kuvvetli ve zayıf asitlerin anyonlarını değiştirirler (asetat, fosfat gibi anyonlar veya asitler). Zayıf bazik anyon değiştiriciler kuvvetli veya orta kuvvetteki asitlerin anyonlarını tutarlar.

İyon değiştirme kromatografisinden polikarboksilli asitlerin, nükleotidlerin, karbonhidratların analizinde yararlanılır. Kolon sıcaklığı, iyon değiştirme kromatografisinde önemli bir parametredir.

2.5.4 İyon çifti kromatografisi:

İyonik maddelerin ters faz kromatografisi ile ayrılmasını olanaklı kılar. Analiz edilecek örneğin yükünün karşıt yüklü iyonu hareketli faza katılarak iyon çifti oluşturulur. İyon çifti apolar sabit fazda tutulur. Katyon (pozitif yüklü iyon) analizinde hekzan sülfonik asit, pentan sülfonik asit gibi uzun alkil zincirli sülfonatlar kullanılır. Anyon (negatif yüklü iyon) analizinde tetra alkil amonyum tuzları kullanılmaktadır. Her iki türde de karşıt iyondaki uzun alkil zincirlerinin amacı apolar bir karakter kazandırmaktır.

En önemli üstünlüğü iyonize ve noniyonize komponentler içeren karışımların analizinde yararlanılabilmesidir. Hareketli faz, metanol veya asetonitrilin su ile karışımıdır. İyonik bileşikler nonpolar kolonda tutulacak kadar lipofil hale getirmek için hareketli faza karşıt iyon ilave edilir. Numune iyonu (X^{-n}) ve karşıt iyon (Q^{+2}) birleşerek ($X^{-n}Q^{+n}$) şeklinde iyon çifti oluştururlar.

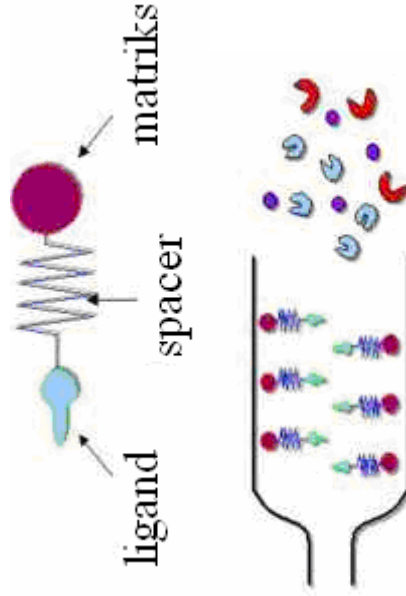


Çizelge 2.6 İyon Çifti Kromatografisinin Uygulanması

Bileşik	Karşıt iyon
Aromatik sülfonatlar	$(C_4H_9)_4N^{+} OH^{-}$
Adrenalin	Sülfonik asitler
Sulfa ilaçları	Sülfonik asitler

2.5.5 Afinite kromatografisi:

En seçici olan kromatografi türüdür. Bu yöntem biyolojik maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. Buradaki etkileşim enzim-substrat, antijen-antikor, hormon-reseptör etkileşimleridir (Çizelge 2.7). Bu sebeple çok seçicidir. Sabit faz üzerinde çok özel ödevli gruplar bulunur. Bu ödevli gruplar sadece tek bir maddeyi tutar ve seçici olarak bağlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 Affinite Fazın Bileşenleri ve afinite kromatografisinde etkileşim

Ligand: Etkileşim Bölgesi

Spacer: Ligand ile destek malzemesi arasında köprü kuran zincir

Matriks: Destekleyen Faz

Çizelge 2.7 Afinite kromatografisinde analit-ligand ilişkisi

Analit Türü	Bağlanan Ligand
Enzim	Substrat, koenzim, tersinir yarışmacı inhibitor
Antijen	Antikor
Antikor	Antijen, virus, Hücre Fragmanı
Hormon	Reseptör, Bağlanan protein
Reseptör	Effektör molekül; hormon, nörotoksin gibi

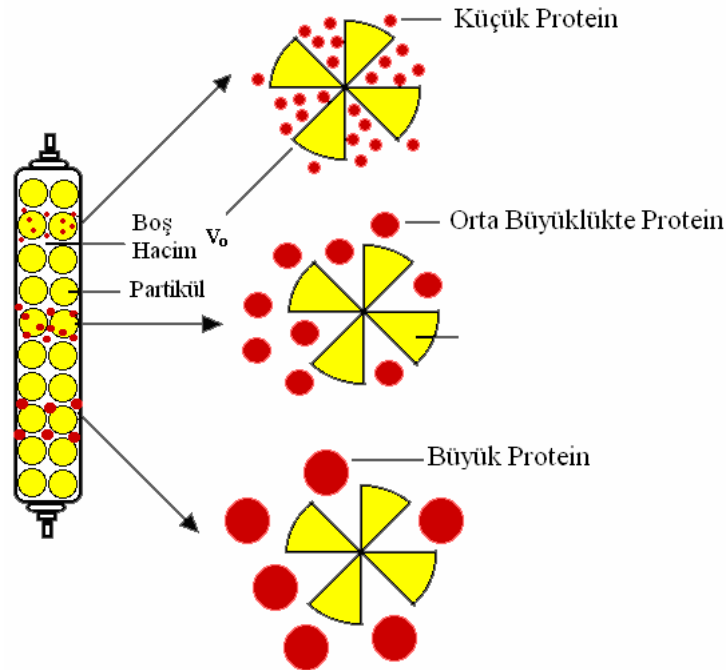
2.5.6 Moleküler Eleme Kromatografisi

Eleme kromatografisi ayırma ve uygulama işlemleri yönüyle kromatografinin en kolay şeklidir. Diğer kromatografi tekniklerinde ayrılma olayı ayrılması istenilen maddelerle durgun faz ve hareketli fazlar arasında olan etkileşimlere dayanır. Eleme kromatografisinde ise ayırma işlemi molekülün boyutuna göre olmaktadır.

Teknik, birçok isimler alır: Jel filtrasyon, jel geçirgenlik, eksklüsyon, moleküler eleme, sterik eleme gibi. Eleme kromatografisi çok çeşitli materyallere uygulanabilmektedir. Bu materyellerin molekül ağırlıkları hem yüksek hem düşük olabilir.

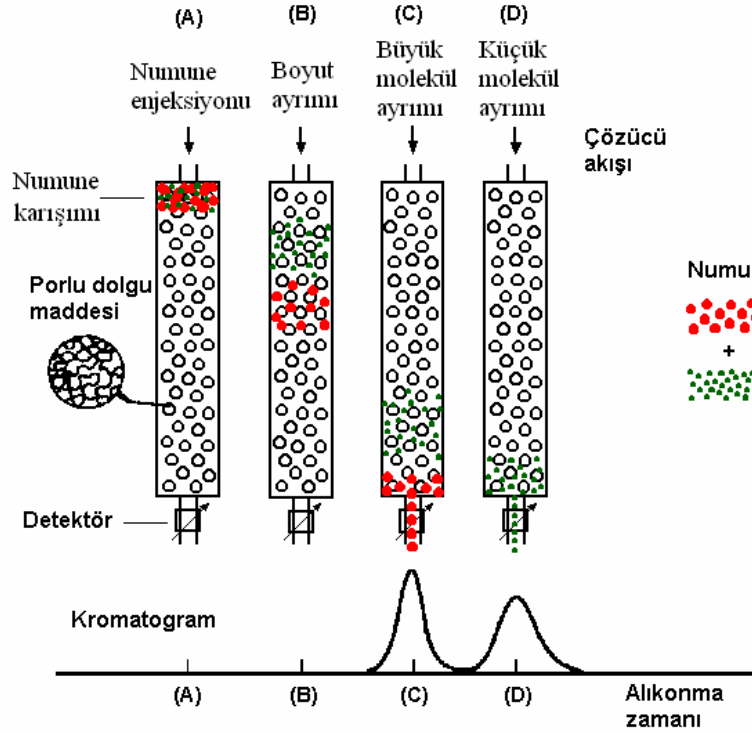
2.5.6.1 Teorik Esaslar

Eleme kromatografisinde kullanılan durgun fazlar poröz taneciklerdir ve bu porların çapları farklıdır. Çözülmüş haldeki maddeler karışımı böyle taneciklerle doldurulmuş bir kolona verilirse maddeler porlara difüze olurlar. Olay Şekil 2.10'daki gibi gösterilebilir:



Şekil 2.10 Şematik Eleme İşlemi, [6].

Difüzyonun gerçekleşebilmesi için por büyüklüğünün molekül efektif çapından büyük olması gereklidir. Uzun ve dar bir molekülün efektif çapı molekülün uzunluğuna eşit bir kürenin çapı olarak tanımlanır.



Şekil 2.11 Jel filtrasyon kromatografisinde molekül boyutuna göre oluşan kromatogram, [7].

Çözülmüş maddenin efektif çapı artarken kendine uyan porların sayısında azalma olur. Moleküller herhangi bir pora difüze olma imkanı bulamazlar ise porlar arası boşluklardan mobil faz ile sürüklenerek kolonu terkederler. Bu moleküllerin elüsyon hacimleri kolonda kullanılan taneciklerin aralarında kalan hacme, kolonun V_o hacmine karşı gelmektedir.

Diğer moleküller porlara girerler. En küçük efektif çaplı molekül bütün porlara girer (total geçirgenlik). Bu türden bir molekülün kolonda elüsyonu için daha çok çözücüye gerek vardır. Daha büyükçe olanlar kendilerine uygun porlara difüze olurlar (kısmi geçirgenlik). Komponentler V_o ile total geçirgenlik hacmi arasında kalan bir retensiyon hacmi ile elüsyona uğrarlarsa birbirlerinden ayrılabilirler. Bir eleme kolonunda hacim üç ayrı komponent halindedir:

- 1- Boş hacim V_o : Bir eleme kolonunda partiküller arasından akan mobil fazın hacmi.
- 2- Por hacmi: Bu hacim atıl mobil fazın hacmidir.
- 3- Dolgu maddesinin katı kısmının kapladığı hacim.

Çözülmüş bir madde için dağılma katsayısı (K) tanımlama olanağımız vardır. Dağılma katsayısı (K) çözülmüş molekülün ulaşabildiği por hacminin (V_A) total por hacmine (V_P) oranıdır:

$$K = V_A / V_P \quad (2.14)$$

V_R retensiyon hacmi aşağıdaki eşitlikle hesaplanabilir:

$$V_R = V_0 + KV_P \quad (2.15)$$

K 'nın değeri 0 ile 1 arasında yer alır. Madde tamamıyla elue oluyorsa $K = 0$, tamamıyla geçirgenliğe uğruyorsa $K = 1$ olacaktır. $V_A = V_P$ olduğu zaman kolon ideal hareket ediyor demektir. Maksimum ayrılma için boş hacmin küçük, por hacminin büyük olması istenir. Belirli bir sistemde örneğin bütün komponentlerini ayırmak için gerekli hacim sabittir ve V_0 ile V_P arasında yer alır. Bütün çabalar band genişlemesini önlemek için gösterilir. Bu tartışmalar kolonun ideal tavır içinde olduğu düşüncesiyle yapılmaktadır yani adsorpsiyon, iyon değişimi v.b. gibi olayların olmadığı varsayılmaktadır. Oysa bu mekanizmalar retensiyonu $V_R = V_0 + KV_P$ 'nin ötesine götürme eğilimindedir. Adsorpsiyon retensiyonunun artmasında en sık görülen etken olup, piklerde kuyruklanmaya yol açar.

Poröz camlardan yapılmış dolgu maddeleri muhtemelen SiOH gruplarının neden olduğu adsorpsiyon etkisi gösterirler. Adsorpsiyon stiren-divinilbenzen dolgu maddelerinde, Sephadex LH-20'de, polivinil asetat jellerinde önem kazanır. Adsorpsiyon ölçü eğrisi yoluyla molekül ağırlığı saptanmasında hatalı sonuçlara götürür. Kuyruklanmalar ise bilindiği gibi rezolüsyonda azalmalara yol açar.

2.5.6.2 Kolonların Seçilmesi

Kolonların seçilmesi genellikle ayrılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlıdır. Maddelerin molekül büyüklükleri (molekül ağırlıkları) genellikle farklıdır ve bir çeşit dolgu maddesi bütün moleküler yapıların ayrılmasında yeterli olmaz.

Moleküllerin bazıları porlardan tamamen elue olurlar ($K = 0$) ve V_0 da tek bir pik verirler. Bazıları bütün porlara difüze olurlar ($K = 1$) ve total geçirgenlik hacminde ($V_0 + V_P$) tek bir pikle elüsyona uğrarlar. Diğerleri porlara seçimli olarak girebildiklerinden relatif büyüklüklerine bağlı olarak $V_R = V_0 + KV_P$ koşuluyla kolonu terkederler.

Dolgu maddesinin por dağılımı ölçü eğrisinin eğimini kontrol eder. Por dağılımı geniş ise eğrinin eğimi dikleşir. Molekül ağırlığı alanı genişler ancak molekül ağırlığı yakın olan maddelerde rezolüsyon azalır. Buna karşılık por dağılımı küçük ise eğri düzleşir ve boyutça yakın moleküllerin rezolüsyonu artar.

Kolonların ölçü eğrileri molekül ağırlığı belli standart örnekleri kolona vererek retensiyon

zamanlarının (V_R) tayini ile elde edilir.

Molekül ağırlıkları belli polistirenler susuz hareketli fazlarla standart olarak kullanılmaktadır. Çözünebilen dekstranlar ise sulu çözeltideki kalibrasyonlar için kullanılmaktadır. Eleme kromatografisi standartlarla karşılaştırma yoluyla bir örneğin molekül ağırlığının saptanmasında kullanılabilir. Metodun iyi sonuç vermesi için örneğin ve standardın aynı kimyasal yapıda olması gerekir. Polistiren için polistiren, poliolefin için poliolefin gibi.

2.5.6.3 Kolonlar

Eleme kromatografisi kolonları dolgu maddeleri üç gruba ayrılır:

1) Yarı Katı Jeller

Yarı katı bir yapıyı oluşturmak üzere çeşitli yüzde oranlarında divinilbenzenin polistirenle çapraz bağlantılar yapmasından türerler. Tetrahidrofuran, aseton gibi organik çözücülerde kullanılırlar. Tipik örnekleri Styragel[®], TSK jelleridir. Bu geniş partiküllü jellerin dezavantajı ($dp=37.75 \mu m$) kütle transferinin yavaş oluşudur. Yeterli ayırmalar için düşük akış hızları kullanılır. Bu da analiz süresini uzatır.

Çizelge 2.8 Yarı Katı Büyük Partiküllü Dolgu Maddeleri

İsim	Mol. Ağ. Alanı
Styragel ¹	10^2 - 10^8
Poragel ¹	10^2 - 10^4
Merckogel DR ²	10^3 - 10^6
Ar Gel ³	10^7 ye kadar

¹Waters Associates; ²E.Merck; ³Applied Research Labs.

Likid kromatografinin diğer şekillerinde olduğu gibi küçük partiküllü dolgu maddeleri geliştirilmiştir ($d = 10 \mu m$). Bunlarla kütle transferi hızlanır. Yüksek akış hızlarına ulaşılabilir, analiz süresi kısalmır. Küçük porlu bu dolgu maddeleriyle rezolüsyon artar ve daha küçük molekül ağırlıklı maddeler (1000-100) ayrılabilir.

Çeşitli firmaların hazırladığı küçük partiküllü eksklüzyon dolgu maddeleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 2.9 Yarı Katı Küçük Partiküllü Dolgu Maddeleri

İsim	Partikül boyutu, μm	M_A
HSG ¹	10	$4 \times 10^2 - 10^7$
μ Styragel ²	10	$10^2 - 10^6$
Shodex ³	10	$1.5 \times 10^3 - 5 \times 10^7$
TSK Gel ⁴	10	$10^2 - 10^8$

¹Shimadzu; ²Waters Associates; ³Showa Denko KK; ⁴Toya Soda Co.

2) Katı Dolgu Maddeleri

Bu dolgular silika veya camdan üretilirler. Çok çeşitli por büyüklüğü, büyük ya da küçük partikül büyüklüğü olan tipleri vardır. Dayanıklı oluşları akış hızları üzerindeki sınırları ortadan kaldırır, daha yüksek basınçlarda çalışılabilir. Hem sulu hem organik çözeltiler kullanılabilir ve çözücü değişimi hızla yapılabilir. Silika ya da camı çözdüğü için $\text{pH} > 7.5$ olan çözücüler kullanılmaz. Bu dolgu maddelerinin en büyük dezavantajı adsorbsiyon etkisidir. Polar maddeler kuvvetle adsorblanır ve piklerde kuyruklanma problemi, ölçü eğrisinde değişme görülür. Bu sebepten büyük bir molekül daha küçük molekül ağırlığına sahip bir moleküle ait elüsyon hacminde kolondan çıkar. Bu etki bazı yaklaşımlarla azaltılabilir. örneğin çeşitli sililleyici ajanlarla taneciklerin muamelesi aktif bölgeleri deaktive eder. Taneciklerin Carbowax 400 veya polietilenglikol ile muamelesi de kullanılan bir başka yöntemdir.

Çizelge 2.10 Eleme Kromatografisi Kolonları İçin Katı Dolgu Maddeleri

İsim	Tip	M_A
Bio-Glass ¹	Poröz cam, şekilsiz	5×10^6
CPG ^{2,7}	Poröz cam; 30 μ , 10 μ , şekilsiz	2×10^7
LiChrospher ³	Silika jel; 30 μ , 10 μ , küresel	$> 2 \times 10^6$
Spherosil ⁴	Silika cam; 7 μ , küresel	$> 4 \times 10^6$
Porasil ⁵	Silika cam; küresel	$> 4 \times 10^6$
μ Porasil ¹	Silika cam; 10 μ , küresel	$> 4 \times 10^6$
Vit-x ⁶	Cam, şekilsiz	1×10^6
Merckogel Si ³	Şekilsiz silika	1×10^6
μ Bondagel ⁵ E	10 μ silika	$2 \times 10^6 - 3 \times 10^3$

¹Bio-Rad; ²Corning Glass; ³E.Kerck; ⁴Rhone-Progil; ⁵Waters Associates; ⁷Pierse

3) Yumuşak Jeller

Bu materyeller çapraz bağlı dekstranların tipik örneklerini oluşturduğu dolgu maddeleridir. En tanınan örneği Sephadex® dir.

Yumuşak jel dolgu maddeleri kullanılan çözücüde (genellikle su) şişerler. Bu materyellerin kullanımıyla işlem jel filtrasyonu adını alır. Yumşak jeller molekül ağırlıkları 10^2 - 2.5×10^7 aralığındadır. Ayrıca, suda çözünen maddeleri ayırmak için oldukça uygundur. 150 psi ten daha yüksek basınçlara dayanıklı olmadıkları için çok sık kullanılmazlar.

Çizelge 2.11 Eleme Kromatografisi Kolonları İçin Yumuşak Jeller

İsim	Tip	M_A
Bio Bead S1	Stiren-divinilbenzen	1.4×10^4 e kadar
Bio-Gel A	Agaroz	2×10^4 - 1.5×10^8
Bio-Gel P -	Poliakrilamid	10^2 - 4×10^5
Sephadex G	Dekstran	10^6 ya kadar
Sephadex LH2O	Dekstran türevi	10^2 - 10^4

¹Bio-Rad; ²Merck; ³Pharmacia; ⁴Aldrich

Bu dolgu maddelerinin diğer bir dezavantajı ise bakteriyel bozunmaya uğramalarıdır. Bu da kolonun performansını bozar.

2.5.6.4 Kolon Seçiminde Önemli Noktalar

Yumuşak jeller HPLC uygulamaları için genellikle uygun değildir. Yüksek akış hızlarında ezilebilir ve hasara uğrayabilirler. Bununla birlikte örnek kapasitesi büyüktür.

Yarı katı çapraz bağlı polistiren dolgu maddeleri yüksek etkililikleri ve geniş por alanlarıyla kullanılırlar. Organik solventlerin birçoğuyla çalışma imkanı vardır. Dolgu maddesinin yüzeyi su ile ıslanmadığından su ile çalışılmaz. Yarı katı dolgu maddelerinde çözücü değişimi şişme derecesini değiştirebilir, bu da kolonun elüsyon davranışında değişiklikliğe yol açar ve büyük bir olasılıkla kolon bozulur.

Katı dolgu maddelerinin dezavantajı polar bileşiklerin adsorpsiyonudur. Yarı katı ve katı dolgu maddelerinin kapasiteleri karşılaştırılabilir, ancak yumuşak jellerden düşüktür. Ölçü eğrisinde seçimli geçirgenlik bölümünün eğimi azaldıkça benzer boyuttaki moleküllerin çözünürlüğü daha iyi olmaktadır. Por boyutu alanı daraldıkça eğrinin eğimi düşer. Geniş

dağılım gösteren ve çeşitli molekül boyutlarına sahip örneklerde dik ölçü eğrisi olan kolonlar birim zamanda daha iyi çözünürlük gösterirler. Geniş por dağılımı olan kolonlar bu amaca en uygun olanlardır. Çözünürlüğü artırmak için daha büyük por hacimli dolgu maddesi, düz bir kalibrasyon eğrisi ya da yüksek plato sayısı kullanmak gerekir. Daha uzun kolonlar çözünürlüğü artırır (Pasch ve Trathnigg, 1999).

Micropak-TSK jel veya μ Styragel ile daha kısa kolonlar ve daha yüksek akış hızlarında çalışılabilir, geniş bir uygulama alanına sahiptirler ve birçok organik çözücü ile kullanılabilirler. Örneğin μ Styragel veya Ultramicrostyragel kolonları, çapraz bağlantılı stirendivinilbenzen jel partiküllerinden yapılmıştır ve çelik tüpler içine doldurulmuştur. Çözücüleri tetrahidrofuran veya toluen olabilir.

2.5.6.5 Hareketli Fazlar

Sıvı kromatografisinin aksine eleme kromatografisinde çözücü, dolgu maddesi yüzeyi ile çözünmüş maddelerin etkileşimini azaltacak şekilde seçilir. Gerçekten de yüzeyle olan her türlü etkileşimler istenmez ve bütün çabalar bu etkileşimleri azaltmak içindir. Yüksek saflık derecesi, sabit faza karşı inert olma, sistemin komponentleri ile uyum gösterme, düşük viskozite gibi genel gereksinimlerin yanında seçilen çözücü dolgu maddesinin yüzeyini ıslatmalıdır. Bu kriterlerin karşılanmasıyla çözücü tam bir difüzyonla porlara girer. Çözücü yumuşak jellerde jeli şişirmelidir. En çok karşılaşılan dekstran jelleri için su en yaygın kullanılan çözücüdür.

Eleme kromatografisinde kullanılan çözücülerin birçoğu yüksek hassasiyetli UV detektörleri için uygun değildir. Toluene, tetrahidrofuran ve halojenli aromatik bileşikler, molekül ağırlığı, büyük bileşikler için fevkalade iyi çözücülerdir. Ancak bunlardan yalnız tetrahidrofuran 254 nm de UV ile çalışmaya uygundur. Bununla birlikte tetrahidrofuran (patlayıcı epoksitlerden korumak amacıyla) içerdiği stabilizörden distilasyonla temizlenmeli ve distila azot atmosferinde karanlıkta saklanmalıdır. Eleme kromatografisinde kloroform, m-krezol, dekalin, dimetilformamid, hekzafloroisopropanol, 1,1,2,2-tetrakloroetan, tetrahidrofuran, toluen, 1,2,4-triklorobenzen, triflorobenzen, su ve tamponlar çözücü olarak sık kullanılır. Analizler muhtelif sıcaklıklarda yapılabilir. Yüksek sıcaklıklar viskoziteyi azaltır, difüzyon yeteneğini artırır. ayrıca pekçok polimerinde çözünürlüğü sıcaklıkla artmaktadır. Böylece daha iyi kromatogramlar elde edilebilir.

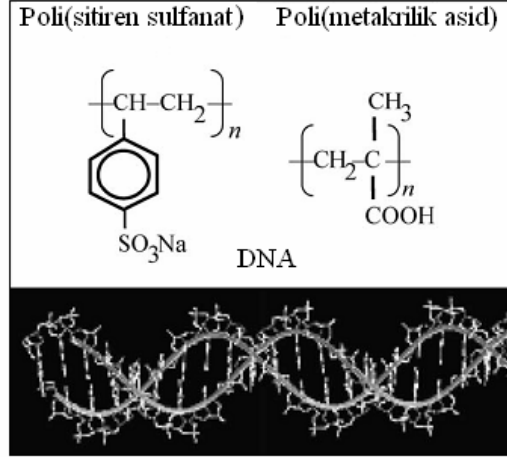
2.5.6.6 Tekniğin Kullanım Alanları

Teknik polimer kimyasında büyük önem taşımaktadır. Birçok polimerizasyon işleminde son ürün genel olarak geniş bir molekül ağırlığı tablosu gösterir. Molekül ağırlıklarının alanı (molekül ağırlığı dağılımı) son polimerin fiziksel özelliklerini belirler. Rutin kullanımlarda eleme kromatografisi bir polimerin parmak izini ortaya koyar. Çok daha mükemmel bir yaklaşım ise molekül ağırlıklarının hesaplanabilmesidir.

Eleme kromatografisi polimer karakterizasyonu yanında besinlerde, farmasötik preparatlarda, doğal bileşiklerde analizleri bozucu moleküllerden küçük moleküllü bileşikleri ayırmada çok yarar sağlar. Böylece yüksek moleküllü fraksiyonlar elimine edilmiş olur. Analitik kolonlarla yapılacak daha ileri analizlerde analitik kolonda dönüşü olmayan adsorpsiyonlara yol açabilecek ya da analitik analizi karıştıracak moleküllerden kurtulunmuş olur. Küçük moleküllerin ayrılmasında eleme kromatografisi kullanılması çok popülerdir. Etkinliği çok yüksek olan küçük partikül kolonları μ Styragel, Ultrastayragel, Mikropak-TSK gibi kolonlar bu alana ilgiyi arttırmıştır. Bu yaklaşımın avantajları arasında çözücü gereksiniminin az oluşu, retensiyon zamanlarının kısa ve kolay değerlendirilebilir olması, kolaylıkla otomatize edilebilmeleri, belirli hacimde elüsyonun tamamlanması sayılabilir (Gooding, 2002).

3. POLİELEKTROLİTLER

Polimerler iyon içeriğine göre polielektrolitler ve poliamfolitler olarak iki gruba ayrılabilirler. Polielektrolitler katyonik veya anyonik grupları içerirken, poliamfolitler katyonik ve anyonik grupların her ikisini bulundurur (Şekil 3.1). Kovalent olarak bağlı anyonik veya katyonik grupları ve bu gruplara bağlı “counter” iyonları olan polimer sistemleridir.



Şekil 3.1 Polielektrolitlere örnekler

Eğer, uygun sayıda iyonik grup herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine kovalent olarak bağlanır ve oluşan çözelti uygun bir pH’da suda çözünür hale getirilirse, teorik olarak bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde bir katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonları sonucunda oluşur. Bununla birlikte, polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler ve çok sayıda proteinler doğadan sağlanabilir. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir (Dautzenberg vd., 1994).

3.1 Polielektrolitlerin yapısal davranışlarını etkileyen faktörler

Polimere bağlı yüklü gruplar anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılır. Bu gruplar da güçlü ve zayıf asitler ve bazlar olarak ikiye ayrılabilir. Kuvvetli bir polielektrolit çözeltide tüm iyonlarına ayrışabilir. Bunun aksine, zayıf bir polielektrolit tüm iyonlarına ayrışamaz. Bu sebeple, zayıf polielektrolitler çözelti içinde tamamen yüklü değildirler ve pH değiştirilerek üzerlerindeki yük dağılımı ayarlanabilir.

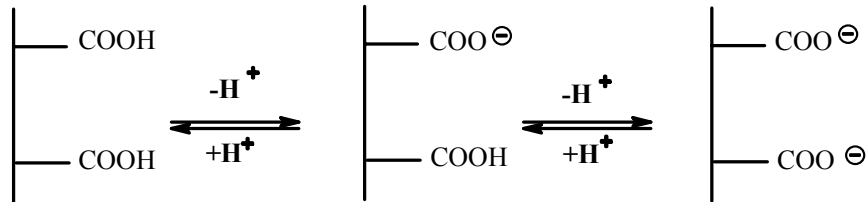
Bununla birlikte, iyonik grubun asit ve baz kuvvetlerinin yanında polimer zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama uzaklık polielektrolit davranışının tayininde önemli bir parametredir. Bu yük yoğunluğu, iyonik kısımlar arasındaki ortalama uzaklık olarak tanımlanabilir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir, örneğin çözünübilirlik.

Çözünürlük ve yapı oluşumunda düşük molekül ağırlıklı “counter” iyonların türünün çözeltideki tüm sistemin özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Bu iyonların önemini anlamak için şu örneği verebiliriz: poli(diallildimetilamonyum) polikasyonunun klorürlü hali suda kolayca çözünürken, iyodürlü hali daha zor çözünür (Dautzenberg vd., 1994).

Polielektrolitlerin karakteristik bir özelliği düşük konsantrasyonlarda deiyonize suda geniş bir hidrodinamik hacme ulaşabilmesidir. Bu etkiye polimer zinciri boyunca yer alan yüklü gruplar arasındaki coulombik itme kuvveti neden olur ve zincirin çubuğa benzer bir konformasyonda bulunmasını sağlar. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH değişimiyle, coulombik itme kuvvetleri engellenir. Bunun sonucunda zincirin hidrodinamik hacmi azalır ve entropik olarak daha uygun konformasyona geçer.

3.2 Homopolielektrolitler

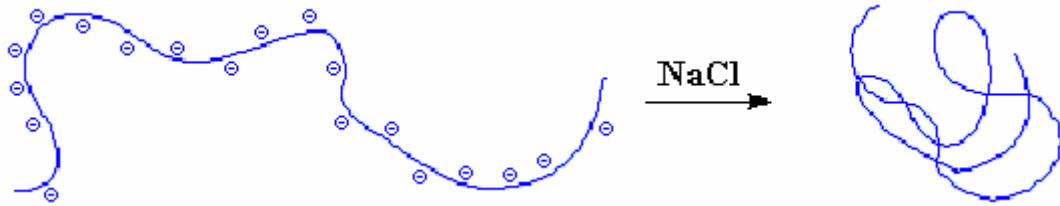
Homopolielektrolitler bütün monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlerdir. Polielektrolitler, herbir tekrarlayan birimi (monomeri) bir elektrolit grup taşıyan polimerlerdir. Bu elektrolit gruplar sulu çözeltilerde dissosiyasyon olup polimeri yüklü hale getirirler (Şekil 3.2). Polielektrolitlerin özellikleri hem elektrolitlere (tuzlar) hem de polimerlere benzemektedir ve bazen polituzlar olarak adlandırılmaktadırlar. Sulu çözeltileri, tuzlar gibi elektriği iletir ve polimerler gibi viskozdur. [1].



Şekil 3.2 Poliakrilik asitin sulu çözeltideki dissosiyasyonu

Polimerlerin konformasyonu polimerin yapısına ve çözeltiyle bağlı olarak değişir. Çözelti içindeki yüksüz bir lineer polimer zinciri rasgele yumak konformasyonu gösterir. Ancak

çözeltideki tuz konsantrasyonunun artırılmasıyla, lineer polielektrolit üzerindeki yükler Coulomb etkisiyle birbirini iter ve lineer forma geçerler (Şekil 3.3). Bu durumda, polielektrolit çözeltilerinin viskozitesi artar. Polielektrolit çözeltilerinin özellikleri sulu ortamın iyonik şiddetine bağlıdır. İyonik şiddetin artmasıyla viskozitenin değişmesi makroiyoandaki elektrik yükleri arasındaki itme kuvvetinin engellenmesinden dolayı gerçekleşir ve iyonik şiddet daha fazla arttığında yüksüz makromoleküllere benzer davranış göstermeye başlar [1].

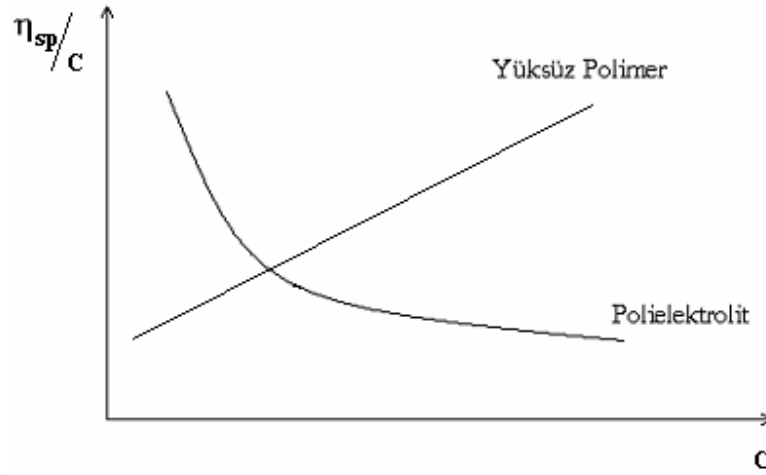


Şekil 3.3 Çözeltiye tuz ilavesi sonucu polielektrolit zincirinin yumak konformasyonunu alması [2]

İyonik şiddetin yanında, ortamın pH'ı da zayıf polielektrolitlerin özelliklerini etkiler. Çünkü iyonik grupların dissosiyasyon derecesi ve polielektrolitin yük yoğunluğu değişir. Polielektrolit çözeltilerinin diğer bir özelliği ise yüksek iyonik iletkenlikleridir. Elektrik alanı altında, küçük molekül ağırlıklı iyonlardan daha yavaş olmakla birlikte makroiyonlar göç etmektedirler (Dautzenberg vd., 1994).

Polimerlerde derişim arttıkça viskozite artarken polielektrolitlerde derişim azalırken viskozite artar (Şekil 3.4). Bunun nedeni azalan derişimle artı ve eksi yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir.

70'li yılların başlarında immunolog ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin bağışıklık yanıtına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Çünkü bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompleksleri sentezlemek mümkündür.



Şekil 3.4 Yüksüz polimerlerde ve polielektrolitlerde viskozite-derişim ilişkisi

Polielektrolitlerde molekül ağırlığı polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimerin bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra polielektrolit çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliiyonun zincir boyuna bağlıdır; yani polikompleksin çökmesi vb. özellikler polimerin polimerleşme derecesine bağlıdır (Mustafaev, 1996e).

3.3 Poliamfolitler

Anyonik ve katyonik grupların her ikisinde kovalent olarak bağlı bulunduğu makromoleküller ise poliamfolitler olarak adlandırılırlar. Protein yapıları poliamfolitler doğada bol miktarda bulunurlar ve sentetik yollarla da elde edilebilirler. Poliamfolitlerin izoelektrik noktalarında molekül üzerindeki net yük toplamı sıfıra eşittir. Polielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı özellikleri anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki coulombik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda ($\geq 10-15$ mol%), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaşılmaya başladıkça coulombik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve bir çok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'ın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünmesi kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla “antipolielektrolit etkisi” olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır. Bu davranışı açıklamak üzere çeşitli teoriler ortaya atılmıştır (Higgs ve Joanny, 1991; Merle, 1987).

3.4 Bovine serum albumin proteinin fizikokimyasal özellikleri

Proteinler poliamfolit sınıfına girerler ve poliamit yapısındadırlar. Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahip olacaklardır. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir. İzoelektrik noktası nötral pH civarında bulunan pek çok proteinde asidik ve bazik amino asit sayısı birbirine eşit durumda demektir.

BSA proteini de bir poliamfolittir ve şu özelliklere sahiptir:

Albumin genelde serum albumini veya plazma albumini anlamında kullanılır (Carter ve Ho, 1994). Serum albuminin kan pH'ını ayarlayan başlıca sorumlu olduğu düşünülmektedir.

Yapılan hidrodinamik deneyler (Hughes, 1954; Squire vd., 1968; Wright ve Thompson, 1975) ve düşük açılı X-ışını saçılması deneylerine (Bloomfield, 1966) dayalı sonuçlar albuminin 140x40 Å boyutlarında bir elips olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalar da bu şekli desteklemiş ve albuminin bir puro şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Ama ¹H NMR ile yapılan çalışmalar yapının elips şeklinde olamayacağını, albuminin daha doğrusu kalp şeklinde bir yapı olduğunu göstermiştir.

Albumin molekülünün birincil yapısında yükler tek dağılım göstermezler. Nötral pH'de BSA'nın I, II ve III numaralı "domain"leri sırasıyla -10, -8 ve 0 net yüke sahiptirler (Peters, 1985). Birincil yapıdaki asimetric yük dağılımına karşın, üçüncül yapıdaki yükler uniform özellik gösterirler (Carter ve Ho, 1994).

Protein çözeltisinin viskozitesi; proteinin molekül kütlesi, boyutu, hacmi, yüzey yükü ve deforme olma gibi karakteristik özelliklerine bağlıdır. Viskozite, ayrıca, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, iyon tipi, "shear" şartları ve ısı değişimi gibi çevresel etkenlere de bağlıdır. Serum albuminin 3,7-4,2 ml/g intrinsik viskozite değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Peters, 1985). BSA'nın disülfid bağları kırıldığında viskozitesi artmaktadır. BSA çözeltilerinin viskozitesi 65 mg/ml'ye kadar doğrusal olarak artar ve daha büyük derişim değerlerinde üstel olarak artar.

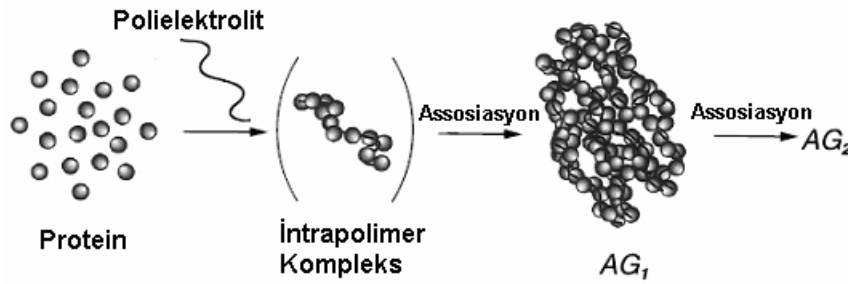
4. POLİMER-PROTEİN KOMPLEKSLERİ

4.1 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Fiziksel Haller

Polielektrolit-protein komplekslerinin fiziksel halleri çözünürlük derecelerine bağlıdır. Çözünür kompleksler çok miktarda su molekülüyle kuşatılmıştır ve genelde proteinin pI değerine yakın pH değerlerinde oluşmaktadırlar. Polikompleksin toplam net yükü Z_T , herbir polimer molekülüne bağlanan protein sayısı n olmak üzere,

$$Z_T = Z_{\text{Polimer}} + nZ_{\text{Protein}} \quad (4.1)$$

formülü ile gösterilebilir. Z_T sıfıra yaklaştıkça (polianyonlar için $\text{pH} < \text{pI}$ olduğu durumlarda) ufak moleküllü iyonların tutulması azalır ve polikompleks daha az su molekülü ile kuşatılmış olan koaservat haline geçer. Polimerin daha fazla yük içermesi, pH'ın proteinin pI değerinden çok uzak olması ve tuz derişiminin az olması gibi daha güçlü etkileşimler var olduğunda faz ayrımı gerçekleşir ve çökelek oluşur (Dubin, 2005). Bu tip faz ayrımı Kokufuta tarafından keşfedilmiştir ve şematik olarak şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Polielektrolit-protein komplekslerinde faz ayrımı (Kokufuta, 1994)

Diğer bir katı hal ise polielektrolit multitarakalarıdır. Bu yapılarda proteinler ya bir polielektrolitin yerini alır ya da ilave bir bileşen olur. Son olarak, proteinlerin polielektrolit jellerinin içinde tutulduğu iki durum bulunmaktadır. İlkinde, önceden hazırlanmış polielektrolit jeliyle protein birleşerek yapıyı oluştururlar. İkinci durumda ise, proteinin kendisi jel oluşumu prosesine katılır (Kabanov, 2004).

4.2 Polielektrolit-Protein Komplekslerinde Etkileşimler

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında

kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donör gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir (Matsudo vd., 2003). Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiometrik çökelme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid titrasyonuna benzemektedir (Thies vd., 1994). Kabanov ve araştırmacıları (2004) zıt yüklü polielektrolitler temeline dayanan interpolielektrolit kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki halli model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı (Kabanov vd., 2004).

Elektrostatik kuvvetler zıt yüklü grupları içeren tüm etkileşimleri esnek bir şekilde tanımlasa da, proteinin etrafındaki dielektrik alanında bulunan tuz köprülerini de bu kuvvetlere dahil etmeliyiz. Bu özel etkileşimler diğer kısa mesafeli kuvvetleri tamamlamaktadır. Klasik biyokimya modelinde, protein-ligand arasındaki spesifik etkileşim yapısal olarak kusursuz ligand-konakçı komplekslerinin oluşumunu sağlayan spesifik kısa mesafeli kuvvetlerden ortaya çıkar. Ama esas olarak, bağlanma enerjisi protein ve polielektrolitlerin sabit yükleri arasındaki itme ve çekme coulomb kuvvetlerinin bir toplamıdır (Dubin vd., 2005).

Proteinlerle hidrofobik olarak etkileşecek polimerler spesifik olarak tasarlanabilir. Ancak önemli olan nokta, hidrofobik etkileşimlerin ciddi bir katkı yapmadığı hallerin bilinmesidir (Radeva, 2001). Bütün proteinlerin değişen miktarlarda hidrofobik bölgeleri bulunduğundan ve tüm vinil polimerlerin ana zinciri hidrofobik olduğundan bu tip etkileşimlerin incelenmesi önemlidir. Diğer taraftan bu kuvvetlerin uzun mesafeli doğasından dolayı kuvvetli elektrostatik kararlılığın olması için çözünme de dikkate alınmalıdır. Hidrofobik etkileşimler bazı karakteristik belirtilere sahiptir. Yüksek tuz konsantrasyonunda daha kuvvetli hale gelirler. Hidrofobik yan zincirler takılmış polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri çeşitli

araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bunlara göre metil ve etil yan zincirleri içeren polielektrolitlerin bağlanmasının yaklaşık aynı olduğu görülmüştür. Karbon sayısı 2-6 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolit protein komplekslerinde bağlanma karbon sayısı ile birlikte artmaktadır. Karbon sayısı 8-10 arasında olan yan zincirlere sahip polielektrolitlerde ise bağlanma azalmaktadır. Sonuç olarak C1 ve C2 yan zincirleri proteinin hidrofobik bölgelerine ulaşamamıştır ve C8-C10 yan zincirli polielektrolitlerde ise intrapolimer miselleşme polielektrolit-protein kompleksine reaksiyonu ile yarışmaktadır. Yapılan çalışmalar elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin birbirlerine katkıda bulunduklarını göstermektedir (Schreiber vd., 2000).

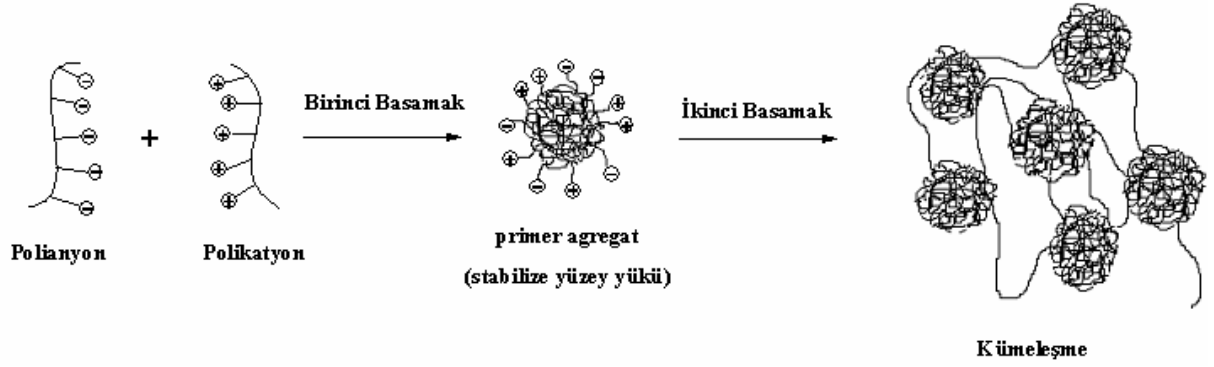
4.3 İnterpolielektrolit Kompleksler

Polielektrolit kompleksler karşıt yüklü makromoleküllerin sulu çözeltide baskın olarak coulombik kuvvetlerin etkisiyle oluşurlar. Diğer intermoleküler etkileşimler hidrojen bağları, yük transferi ve dipol kuvvetler veya hidrofobik etkileşimlerdir. Bu etkiler agregat oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır ve sulu çözeltide kompleksin kolloidal davranışını saptamaktadır. Reaksiyon koşullarına ve kullanılan bileşenlerin doğasına bağlı olarak, kompleks oluşumu prosesi ve komplekslerin özellikleri fazlaca şişmiş hidrojenlerle kompakt çökelekler arasında değişmektedir [5].

Makroskobik homojen sistemler üç yolla elde edilebilir:

- Çok düşük polimer konsantrasyonlarında küçük simpleks agregatların oluşumu
- Bileşenlerden birinin aşırısında ardışık çözünebilir kompleks oluşumu
- Yüksek polimer konsantrasyonlarında komplekslerin disagregasyonu.

Elektroforetik ve viskozimetrik ölçümler simpleks partiküllerinin poliamfolite benzer bir özellikte olduğunu göstermiştir. Seyreltik sulu sistemlerde simpleks oluşumu prosesi için iki basamaklı bir mekanizma önerilmiştir (Şekil 4.2). Birinci basamakta (az miktarda titrant eklendiğinde), iyon eşleşmeleri prosesi ufak simpleks agregatların oluşumuna sebep olmaktadır. Bu primer agregatların yüzey yükü kararlıdır. İkinci basamakta, 1:1 stokiyometrisi için gerekli miktarın %70'inden fazla titrant eklendiğinde, primer agregatların birbirleri ile agrege olması sonucu daha büyük partiküller oluşur [5].



Şekil 4.2 Seyreltik sistemde simpleks oluşumunun iki basamaklı mekanizması

Oluşan materyalin özelliklerini saptayan ilk faktörlerden biri de yük-yük etkileşiminin stokiyometrisidir. Stokiyometrik kompleksler “koaservatlar” ve “çökeltirler” şeklinde de adlandırılmaktadırlar. Oluştukları ortamda çözünür olmayabilirler (Commandur vd., 1989). Ayrıca yükler nötralize olsa bile çözünebilen komplekslerin oluşumu için düşük konsantrasyonlar yeterli olabilmektedir. Bunun aksine nonstokiyometrik polielektrolit kompleksler yüklerinin bazıları iyonize olduğu için farklı olarak çözünebilen partiküller bulundurmaktadır.

Polielektrolit üzerindeki yük yoğunluğu, kompleksin hem oluşumunda hem de özelliklerinde etkilidir. Yük yoğunluğu az olan polielektrolitlerin oluşturduğu kompleksler daha kolay dissosiyasyon olurken yük yoğunluğu yüksek polielektrolitler daha stabil kompleksler oluştururlar (Koetz vd., 1986).

Proteinler de polielektrolit özelliğindedir. Hem sentetik hem de doğal polimerlerle güçlü bir şekilde etkileşime girerek polielektrolit kompleksleri oluşturmaktadırlar (Sacco vd., 1988; Dellacherie, 1991).

4.4 Polielektrolit-Protein Kompleksleriyle İlgili Yapılan Çalışmalar

Sentetik polielektrolitlerin proteinlerle kompleksleri ilk olarak Morawetz (1952) tarafından çalışılmıştır. Morawetz bu çalışmasında farklı pH, iyonik şiddet, polimer/protein oranı değerlerinde BSA'nın polielektrolitlerle kompleks oluşumunu türbidimetrik olarak incelemiştir. Daha çok çökelek oluşumu üzerinde durmuştur. Maksimum çökelek oluşumu için kritik bir oran bulunduğunu göstermiştir. Bileşenlerden birisinin eklenmesiyle, antijen-antikor reaksiyonlarında olduğu gibi, çökelekler çözünür kompleksler oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmada, çökelek oluşumu dengesinde polimerin molekül ağırlığının etkisinin olmadığı

belirtilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda Mustafaev ve arkadaşları (1978) polimerin molekül ağırlığının ve dar dağılımlı olmasının kompleks oluşumu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Morawetz ufak molekül ağırlıklı iyonların BSA'nın polivinilaminle çökelek oluşturduğu pH'ı değiştirdiğini de göstermiştir. Morawetz ve arkadaşları PMAA SA ve oksihemoglobin karışımının reaksiyonunu incelemişlerdir. Bahsedilen proteinlerin izoelektrik noktaları aralığına uygun olan pH değerinde oksihemoglobinin seçici olarak çöktüğü gözlenmiştir. Çalışmada polimetakrilik asit gamaglobulin ile SA ve insan albumini ile bunun antikor karışımını ayırdığı gösterilmiştir.

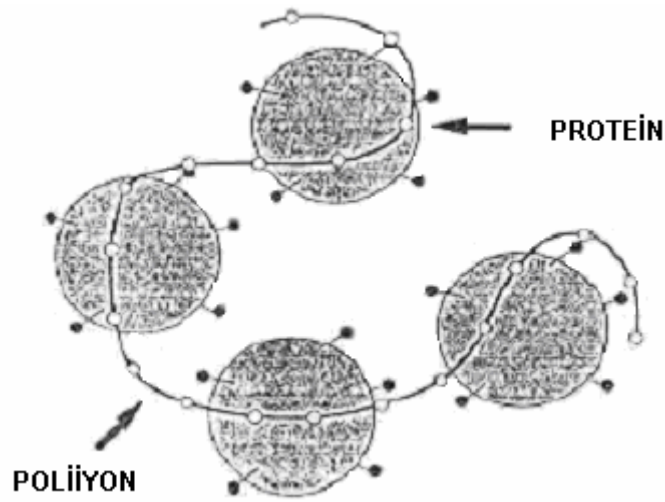
Kabanov, Mustafaev ve araştırmacıları (1978) lineer polielektrolitlerin (poliasitlerin polianyonları, poliamfolitler, polikasyonlar ve onların türevleri) aynı yüklü (pozitif veya negatif) globular proteinlerle karşılıklı etkisini incelemişler ve çok miktarda suda çözünebilen polimer-protein kompleksleri elde etmişlerdir. Yapmış oldukları bazı çalışmalara göre; PAA-BSA çözeltilerinin pH 7'de alınmış sedimentogramları iki pik ile karakterize olmaktadır. Piklerden birinin sedimentasyon sabiti poliasit çözeltisinin sedimentasyon sabitine uygunken diğer pikin ise serbest proteine uygun olduğu bulunmuştur. Proteini ilave ettikçe protein pikinin alanı artarken, diğer pikin alanı ise sabit kalmaktadır. Bu sonuç pH 7.0'de PAA ile BSA'nın kompleks oluşturmadığını gösterir. pH 7.0'de protein ve poliasit negatif yüklenmişlerdir. Buna göre de aynı yüklenmiş partiküllerin birbirini elektrostatik itmesi kompleks oluşumunu engellemektedir.

PAA-BSA kompleksleri "circular dichroism" ve optik çevrilme metodu ile incelenmiştir. Sonuçlar proteinin kompleksleşmesi sırasında sarmallık seviyesinin değişmediğini göstermektedir. Bu sonuca göre proteinin polianyon üzerine adsorbsiyonu ile küresel yapısının fazla değişmediğini söylemek mümkündür. Polielektrolit makromoleküllerinin zincirinin uzunluğunun küresel proteinlerin çapından fazla olduğu dikkate alınarak her bir zincirin ardışık olarak birkaç protein molekülünü bağladığını söylemek mümkündür ve kompleksin yapısı şekildeki gibi gösterilebilir.

Elektrostatik itme faktörünün elimine edilmesi BSA proteinin sodyum poli(stirensülfonat) PSSNa ile etkileşiminde daha iyi görülmektedir. PSSNa sulu ortamlarda tüm olarak polianyona ve sodyum katyonuna ayrılmış kuvvetli polielektrolittir. BSA-PSSNa sulu çözeltileri proteinin çeşitli konsantrasyonlarında sedimentogramlarla ancak şiddetli bir dar pikle karakterize edilmiştir. Bunun alanı ve sedimentasyon sabiti sistemde protein miktarı arttıkça çoğalır. Bu sonuçlar çok büyük ihtimalle pH 7.5'te proteinle polielektrolit arasında kararlı polikompleks oluşmasını göstermektedir. Aynı yüklü partiküllerin birleşmesinde,

proteinin PSSNa poliiyonunun hidrokarbonları ile karşılıklı hidrofobik etkinin baskın olduğu gösterilmiştir (Mustafaev, 1996e).

Thies (1994), insan veya sığır hemoglobini ve sığır tripsininin poli(di-allyldimethylamonyum klorür) ve potasyum poli(vinilalkol sülfat)'la kompleksleşmelerini incelemiştir. Elde edilen sonuçlara göre stokiyometrik protein-polielektrolit komplekslerinin modelini vermiştir. Bu modelde polielektrolit, bütün poliiyon yükleri zıt yüklü proteinler tarafından nötralize edilecek şekilde protein ile kompleks oluşturur. Birbirlerine gevşek bir şekilde bağlanmış polielektrolit iyonları ile birkaç adet esnek olmayan globular protein moleküllerininin oluşturduğu kompleksin şematik gösterimi şu şekildedir:



Şekil 4.3 Protein ve poliiyon içeren stokiyometrik kompleksin şematik gösterimi.

Amorf çökelek oluşturacak şekilde kompleksin yapısını birarada tutan tuz bağları çok gevşektir, çünkü pH'nın değişimi veya poliiyon ilavesi tuz bağlarının bir kısmını, özellikle proteinin imidazolil grubu ile polimerin sülfat grubu arasındakini kırar. Bağların gevşek olması protein ve poliiyon moleküllerinin stokiyometrik olarak nötralleşmesini veya zıt yüklü grupların 1:1 oranında bağlanmasını mümkün kılabilir.

Andrianov ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada pH 7'de BSA-poly[di-(carboxylato-phenoxy) phosphazene] kompleksinin oluşumunu ve immunolojik etkilerini incelemişlerdir. Oluşan kompleksin molekül ağırlığının polimerin tek başına olduğu halden daha ağır olduğunu ama kompleksin boyutunun polimerden önemli derecede farklı olmadığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, makromoleküler yapının daha kompakt bir hal aldığı ortaya konulmuştur.

Son on yılda yapılan çalışmalarda temel olarak şu üç faktörün üzerinde durulmuştur:

uygulamalar, enstrümantel çalışmalar ve simulasyonlar. Polielektrolit multi tabakaları ile protein-polielektrolit kompleksleri üzerine yapılan çalışmaların bir arada sürdürülmesi; glukoz, kolesterol ve antikörlerin saptanmasında kullanılan biyosensörlerin dayanımını ve stabilitesini artırmaya yönelik protein-elektrolit tabakalarının elde edilmesi için önemli olanaklar sağlamıştır. Yüzey karakterizasyonu için optik “waveguide” lazer spektroskopisi, yüzey plasmon rezonans (SPR) ve dar açılı reflaktometrisi kullanılarak uygulanan yeni teknikler bu multitalakaların incelenmesine yardımcı olmaktadır. Protein-polielektrolit komplekslerinin karakterizasyonunda uygulanabilen yeni teknikler kapiler elektroforez ve affinite esaslı ayırma metodlarıdır. Son on yılda komplekslerin faz davranışları ve yapısının iç yüzünün anlaşılmasını sağlamada bu simulasyonlar büyük katkı uyandırmıştır. Son olarak polielektrolitler, proteinler için koaservat ve mikrokapsüller içinde uygun immobilizasyon koşulları sağladığı için, farmasötik uygulamalarda proteinlerin taşınması ve tutulması (entrapment) için polielektrolitlerin jel veya “brush” olarak kullanılması şaşırtıcı değildir. Bu alanlardaki çalışmalar 1995’den önceki literatüre dayanmaktadır. Biyokimya, malzeme bilimi, polimer ve kolloid kimyası ile diğer disiplinlerin bir araya gelmesi önümüzdeki yıllarda bu alanda daha yaratıcı ve geniş kapsamlı bilimsel çalışmaların temelini atmış olacaktır (Dubin, 2005).

5. DENEYSEL KISIM

5.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

5.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Shimadzu HPLC Sistemi
 - Shimadzu model LC-6AD pompa
 - Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS Dedektör
 - Shimadzu FRC-10A Model Fraction Collector
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- PTI QM-4/2003 steady state Fluoresans Spektrometre,
- WTW pH level 1 pH metre
- Precisa XB 220A Hassas Terazî
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvü
- Finnpiette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı

5.1.2 Kullanılan Kimyasallar Maddeler

- Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)
- Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)
- Sodyum klorür (NaCl)
- Sodyum azid (NaN_3)
- Asetik Asit (CH_3COOH)
- HCl
- NaOH
- Bovin serum albumin (BSA)
- Poliakrilik asit (PAA)

5.2 BSA/PAA Kompleksleri

Hesaplamalardaki gibi 19 farklı oranda ve pH 4.0, pH 4.3, pH 5.0, pH 6.0 ve pH 7.0 olmak üzere 5 farklı pH da 95 adet farklı kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiler BSA ve PAA' nın fiziksel karışımlarıdır.

5.2.1 Kullanılan Çözeltiler

a) 0.01 mol/lit'lik PBS Tamponu (pH=7.0, pH=6.0)

1.1998g NaH_2PO_4 ($M_w=119.98$ g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 2.6807 g ($M_w=268.07$ g/mol) tartılarak yine 500 ml ultra saf suda çözülür. Bu iki çözeltiden NaH_2PO_4 çözeltisi Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir. Bu karışıma 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH ayarlanır.

b) Asetat Tamponu (pH 5.0, pH 4.0, pH 4.3)

5.72 ml asetik asit, ultra saf su ile 2 lt'ye tamamlanır. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştıktan sonra 17.53 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. 1M NaOH ile pH ayarlanır.

5.2.2 Komplekslerin Hazırlanışı

PAA stok çözeltisi 3mg/ml olacak şekilde ultra saf suda hazırlandı. Her bir çözeltideki PAA miktarı sabit olduğuna göre her bir çözelti için (19 adet farklı $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranında) hazırlanan stoktan 10 ml çözelti için 3335 μl PAA çekilerek pH 7'lik tamponda iyice karışması sağlandı. Gerekli miktarda BSA tartılarak pH 7 tamponunda çözünmesi sağlanarak BSA stoğu hazırlandı. Daha sonra PAA çözeltilerinin pH'ı kontrol edilerek (pH 7'de olması gerekli) hesaba göre gerekli miktarlardaki BSA stoktan çekilerek karışmakta olan çözeltiye yavaş yavaş ilave edildi. Çözeltinin istenilen pH'da olup olmadığı kontrol edildi. Yaklaşık 30 dk kadar karıştırıldı. Bütün karıştırma işlemleri manyetik karıştırıcıda ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her pH değeri için aynı aşamalar gerçekleştirildi (Çimen, 2006).

5.2.3 Hesaplamalar

PAA konsantrasyonu sabit tutularak, farklı BSA konsantrasyonlarına 19 farklı oranda kompleks çözeltisi hazırlanmıştır. Bu hesaplamalar şu şekildedir:

$$\frac{n_{BSA}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BSA} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{BSA}} \quad (5.1)$$

PAA'nın çözeltideki konsantrasyonu % 0.1'dir.

$M_{PAA}=100$ kDa; $M_{BSA}=66$ kDa

Çizelge 5.1 $n_{BSA}/n_{PAA}=0.05-50$ aralığındaki sabit 1mg/1ml PAA konsantrasyonunda hazırlanan komplekslerdeki BSA konsantrasyonu

n_{BSA}/n_{PAA}	c_{BSA} (mg/ml)
0,05	0,033
0,1	0,066
0,25	0,165
0,4	0,264
0,5	0,33
0,75	0,495
1	0,66
2	1,32
3	1,98
5	3,3
7,5	4,95
10	6,6
15	9,9
20	13,2
25	16,5
30	19,8
35	23,1
40	26,4
50	33

5.3 UV-VIS Spektrofotometresi Ölçümleri

Kompleks çözeltileri hazırlandıktan sonra optik yoğunluklarına Jasco V-530 Model UV/VIS Spektrometre ile bakıldı. Bunun için santrifüj öncesi 500 nm'deki absorbansları ölçüldü. Daha sonra bu çözeltiler santrifüj edilip çökelekleri ayrıldıktan sonra süpernatantların 280 nm'deki absorbanslarına bakıldı.

5.4 Moleküler Eleme Kromatografisi Ölçümleri

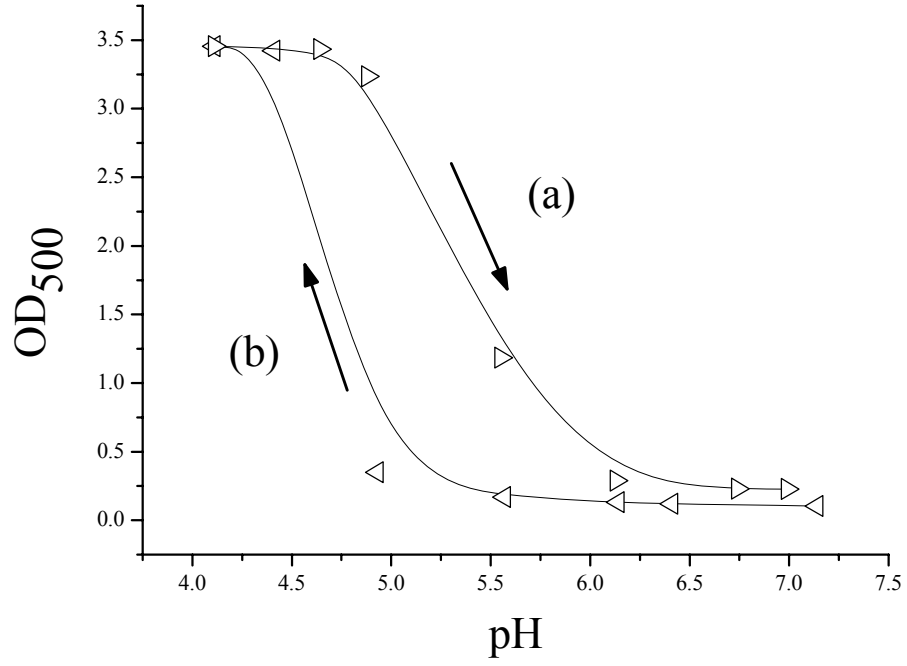
Proteinler, polielektrotlar ve suda çözünür polimer-protein komplekslerinin çözeltileri santrifuj edildikten sonra 0.45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek HPLC cihazında ayrılmıştır. Proteinlerin molekül kütlesi ve polimer-protein karışımlarının veya komplekslerinin fraksiyon bileşenleri, oda sıcaklığında Shim-Pack Diol-300 (7.9 mm ID x 50 cm) ve Shim-Pack Precolumn Diol (4.0 mm ID x 5 cm) kolonları kullanılarak ve jel filtrasyon kromatografisine göre tayin edilmiştir. Shimadzu model LC-6AD pompası ile 1.0 ml/dk akış hızında farklı tampon çözeltileri kullanılmıştır. 20 µl hacimdeki numunenin enjeksiyonu yapılmıştır. Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS detektörüyle 280 nm'de çalışılmıştır. PAA-BSA kompleksleri, Shimadzu FRC-10A model fraksiyon kollektörü ile fraksiyonlanmış ve daha sonra fraksiyon bileşenleri, uyarılma ve emüsyon monokromatörlerinin slit aralığı 2 nm ve uyarılma dalgaboyu 280 nm olan PTI QM-4/2003 model steady state Floresans Spektrometresi ölçülmüştür.

5.5 Komplekslerin pH'a Bağlı Türbidimetrik Titrasyonu

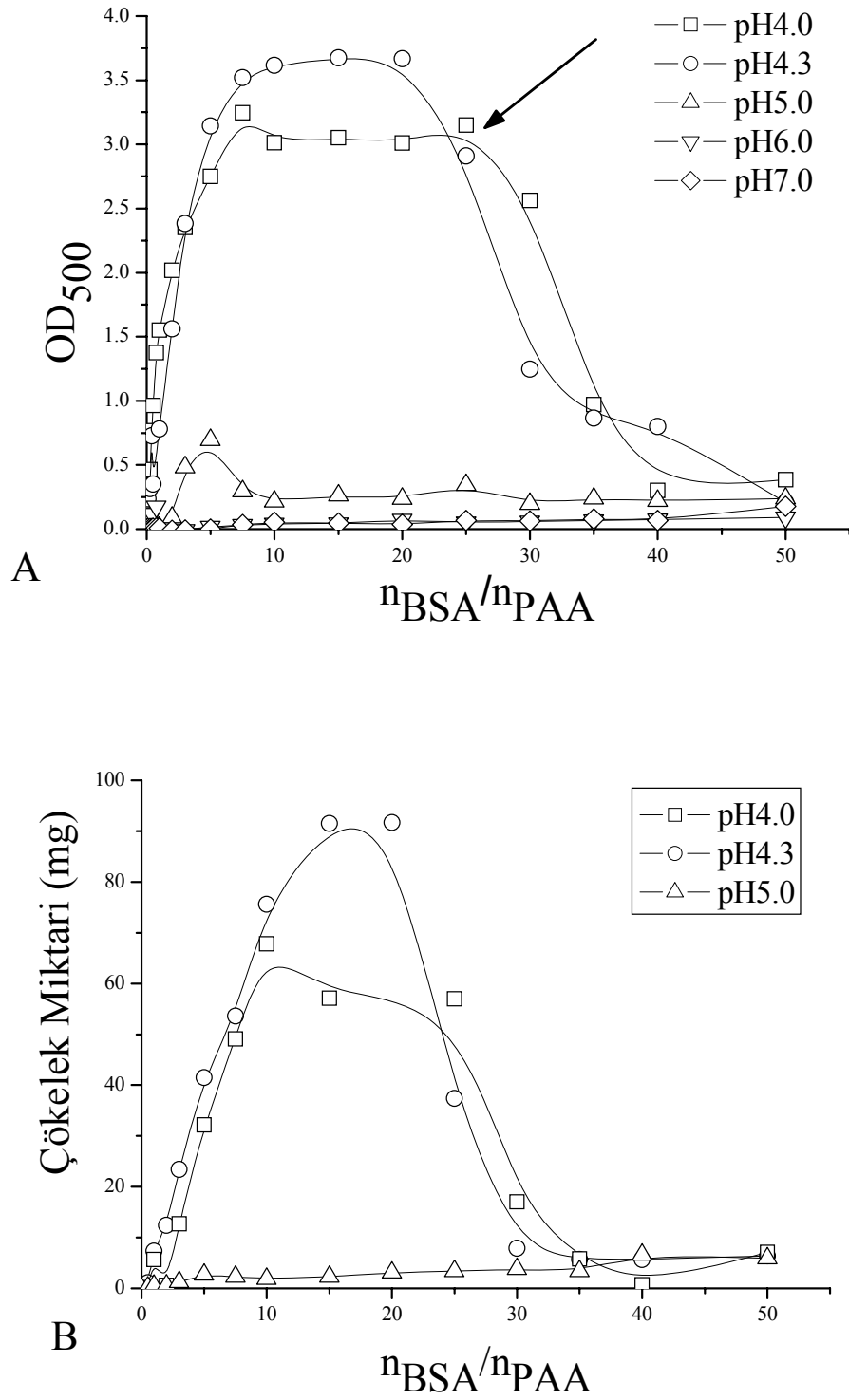
$n_{BSA}/n_{PAA}=1$ oranında pH 7'de kompleks hazırlandı. Hazırlanan çözelti 1 M HCl kullanılarak belli bir pH değerine düşürüldü, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbans değeri ölçüldü. pH 4 oluncaya dek bu işlem tekrarlandı.

$n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranında pH 7'de kompleks hazırlandı. Hazırlanan çözelti 1 M HCl kullanılarak belli bir pH değerine düşürüldü, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbans değeri ölçüldü. pH 4 oluncaya dek bu işlem tekrarlandı. pH 4 değerinden sonra 1 M NaOH kullanılarak pH belli bir değere yükseltildi, 30 dakika karıştırıldı ve 500 nm'de absorbans değeri ölçüldü. Bu işlem pH 7 oluncaya dek tekrarlandı.

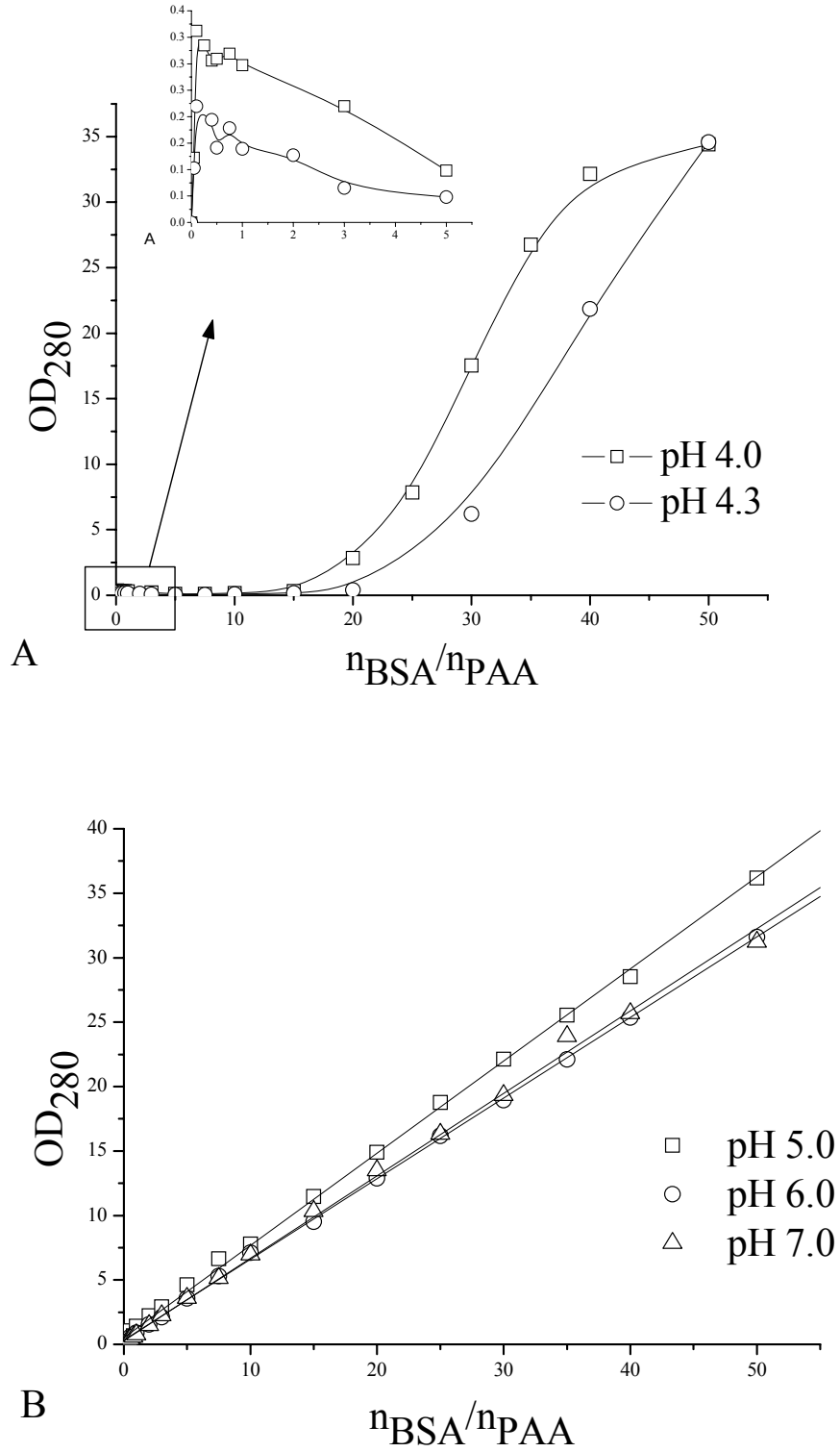
6. DENEY SONUÇLARI



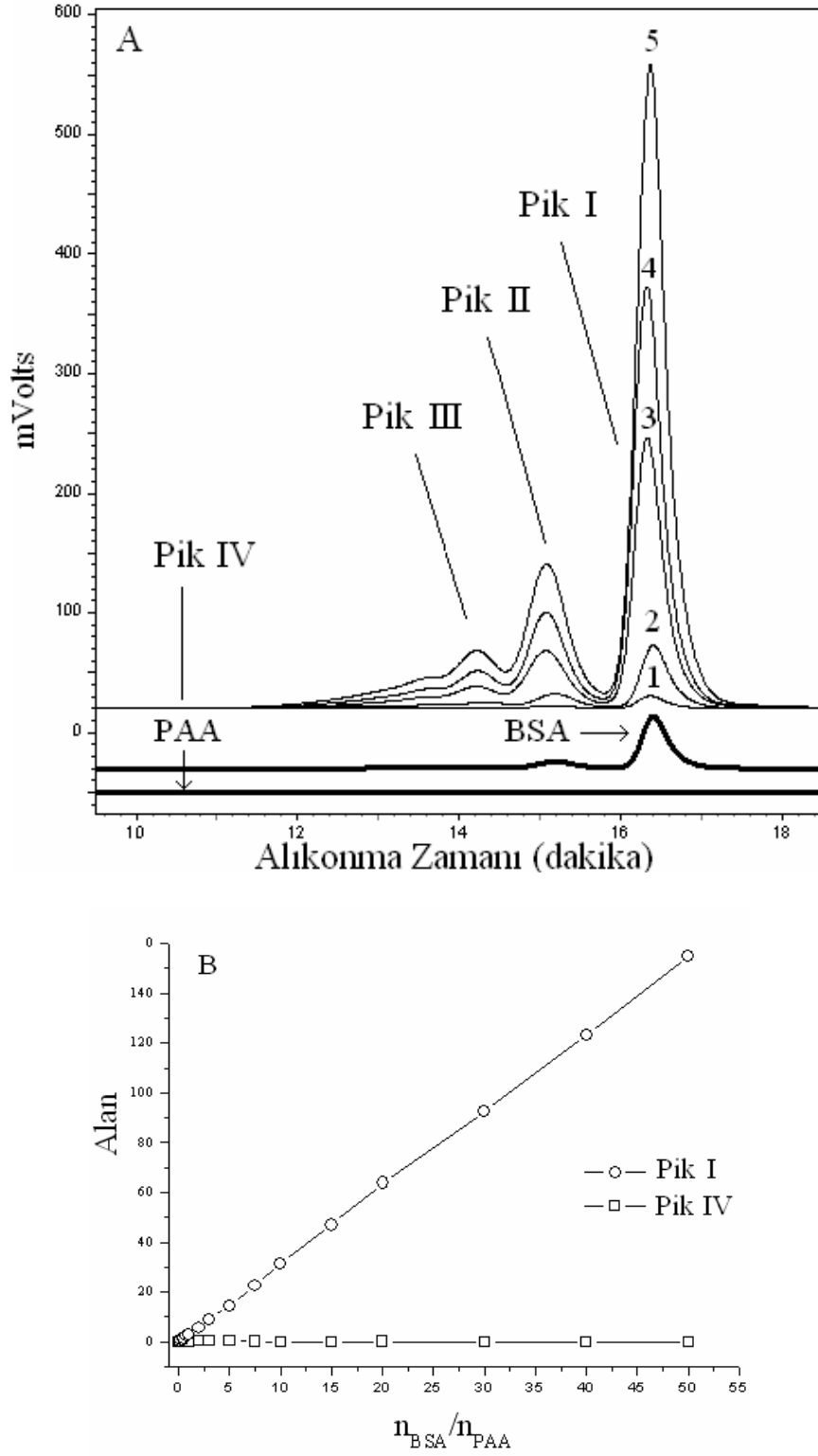
Şekil 6.1 BSA-PAA karışımlarının pH'a bağlı optiksel yoğunluğu (OD), $n_{BSA}/n_{PAA} = 15$; (a) pH 4'de hazırlanan BSA-PAA karışım çözeltilerinin pH titrasyonu; (b) pH 7'de hazırlanan BSA-PAA karışım çözeltilerinin pH titrasyonu (Çimen, 2006).



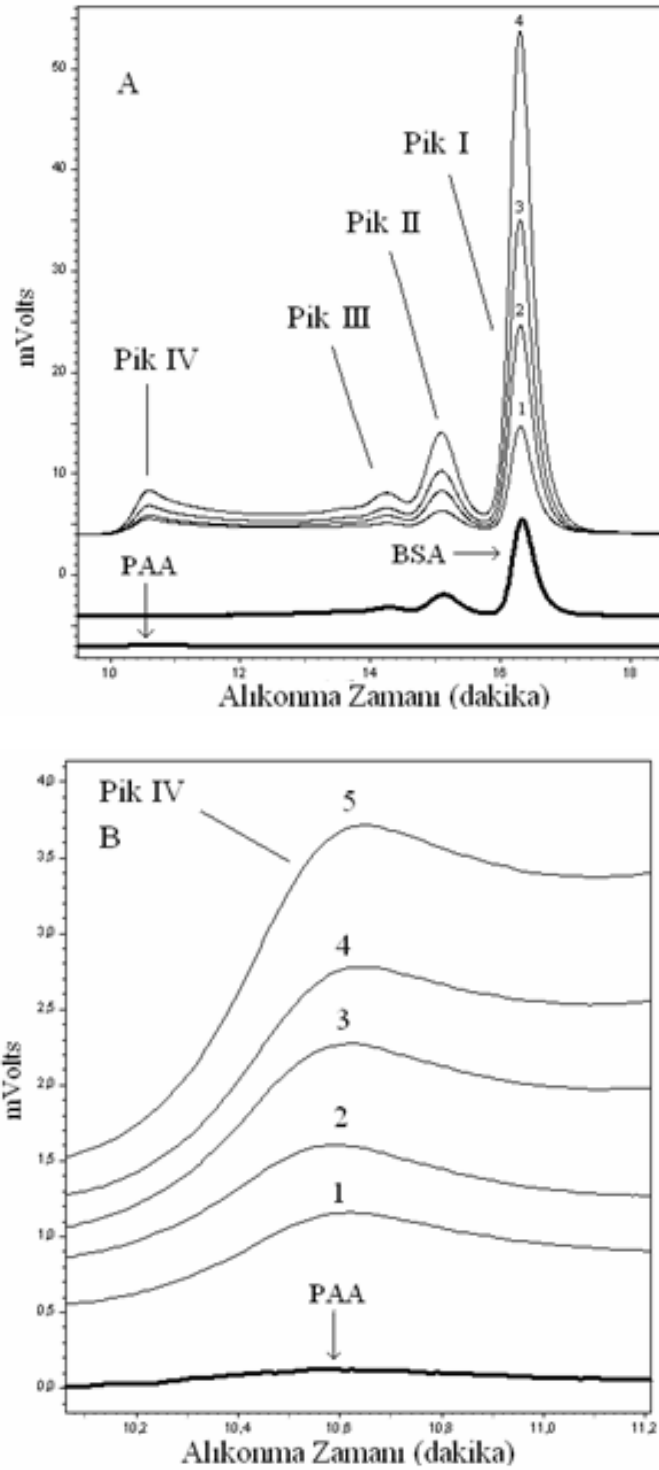
Şekil 6.2 (A) Farklı pH değerlerinde, BSA-PAA karışımlarının n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı optiksel yoğunluğu (OD_{500}); (B) Farklı pH değerlerinde, bileşenlerin oranına bağlı BSA-PAA karışımlarından elde edilen çökelti miktarı (Çimen, 2006).



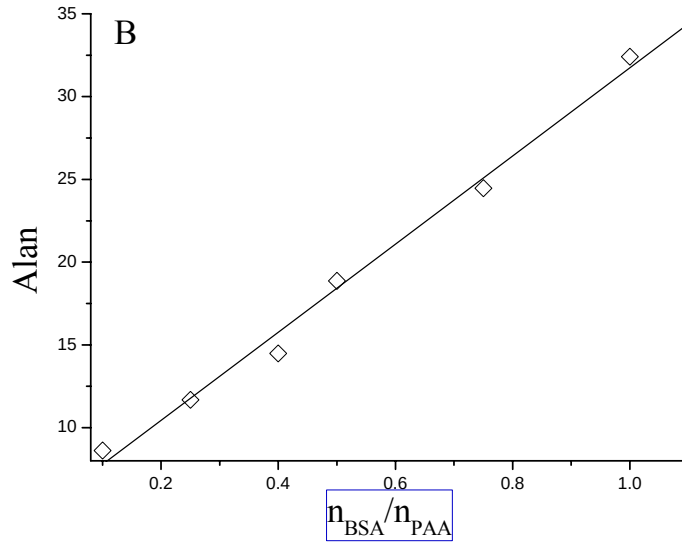
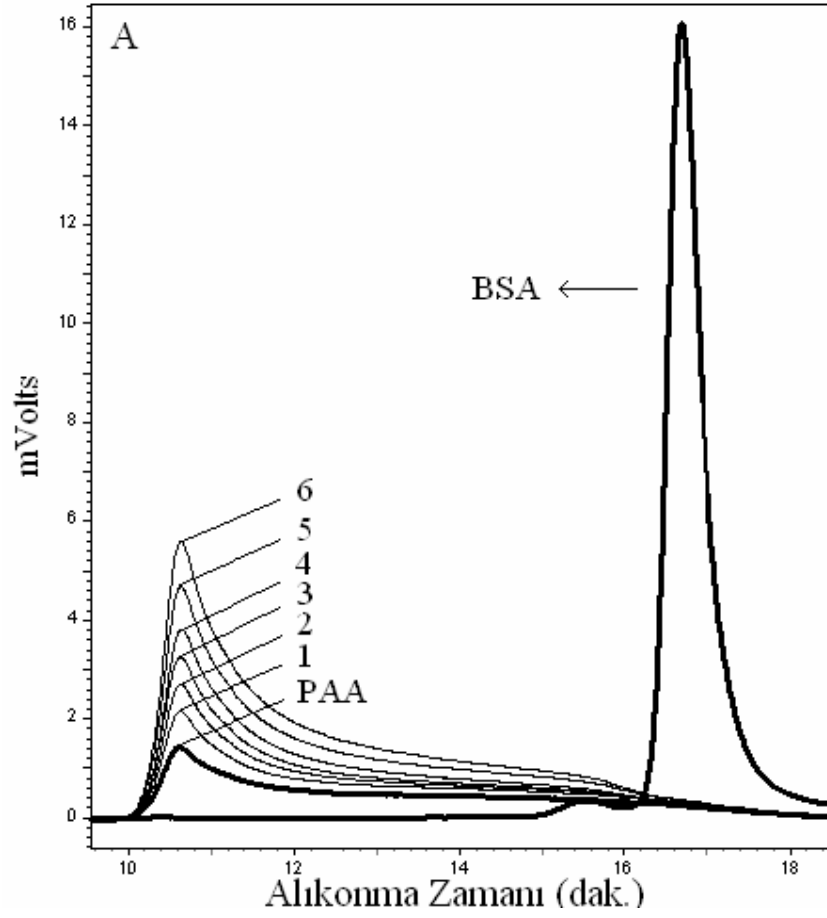
Şekil 6.3 Çözeltilerin farklı pH değerlerinde 4.0-4.3 (A) ve 5.0-7.0 (B) elde edilen, n_{BSA}/n_{PAA} oranlarına göre BSA-PAA karışımlarının üst fazlarının optik yoğunluğuna (OD_{280}) bağlı değişimi (Çimen, 2006).



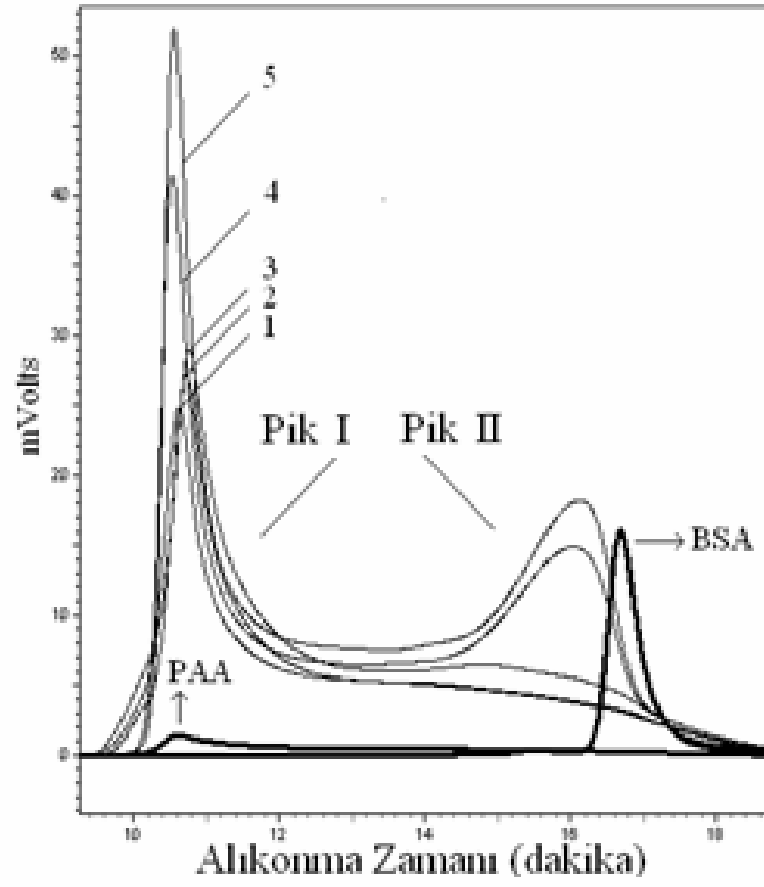
Şekil 6.4 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}=1(1)$; 5(2); 20(3); 35(4); 50(5) oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 7.0 (A). n_{BSA}/n_{PAA} oranlarının Pik I ($\circ$) ve Pik IV ($\square$) alanlarına bağlı değişimi; pH 7.0 (B). PAA konsantrasyonu sabit (1mg/1ml). BSA konsantrasyonu 2mg/ml.



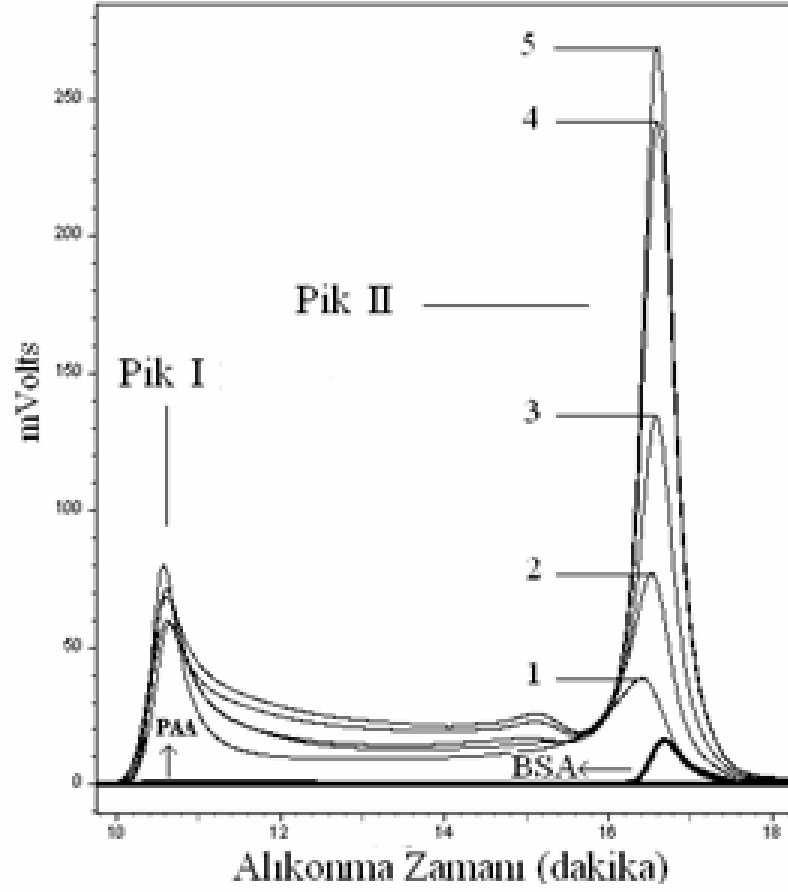
Şekil 6.5 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}=1(1); 2(2); 3(3); 5(4)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları, pH 6.0 (A). Serbest PAA ve Pik IV'ün $n_{BSA}/n_{PAA}=7.5(1); 10(2); 30(3); 40(4); 50(5)$ oranlarındaki HPLC kromatogramları, pH 6.0 (B). PAA konsantrasyonu sabit (1mg/1ml). BSA konsantrasyonu 1mg/ml.



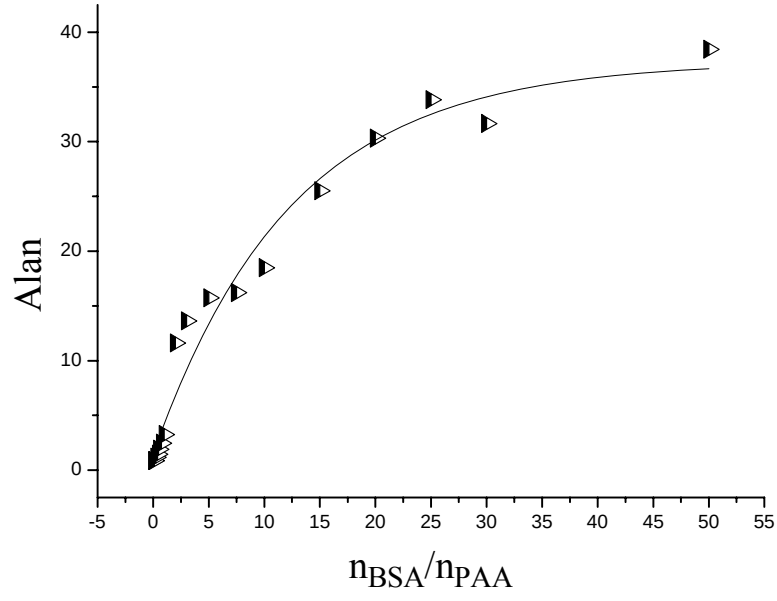
Şekil 6.6 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.1(1); 0.25(2); 0.4(3); 0.5(4); 0.75(5); 1.0(6)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının pH 5.0'deki HPLC kromatogramları (A). Bu n_{BSA}/n_{PAA} oranlarının, alanlarına bağlı değişimi; pH 5.0 (B).



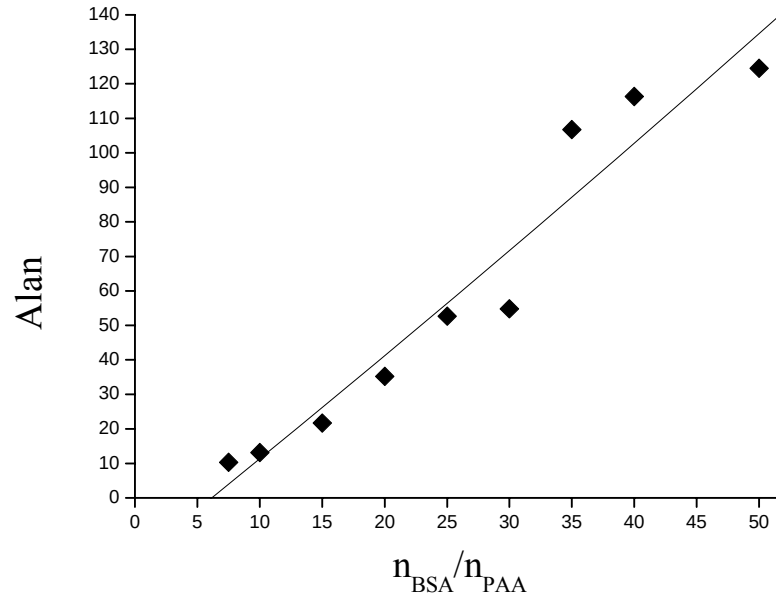
Şekil 6.7 Serbest BSA, PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA} = 2(1); 3(2); 5(3); 7.5(4); 10(5)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 5.0.



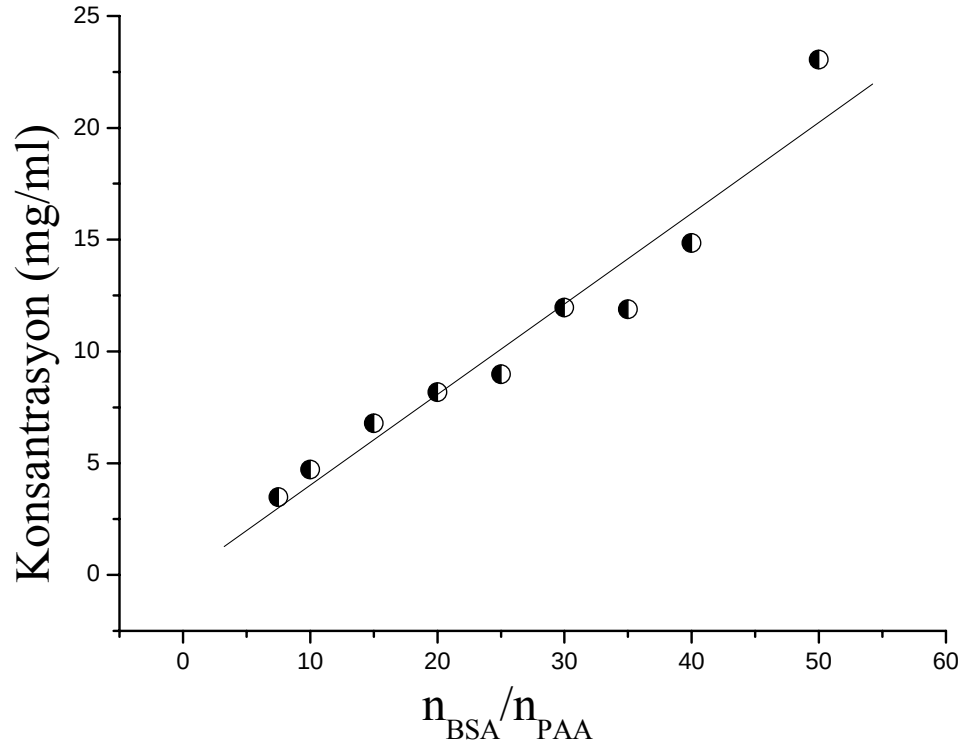
Şekil 6.8 Serbest BSA, PAA ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 15(1); 20(2); 25(3); 35(4); 40(5)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 5.0.



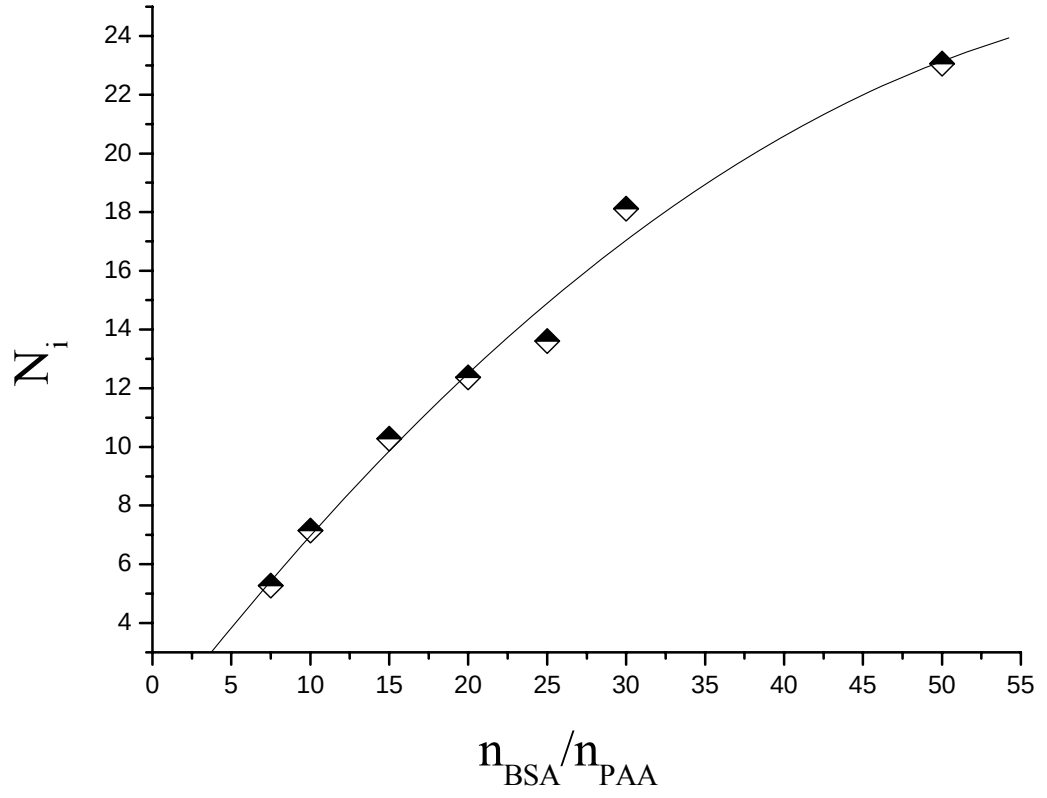
Şekil 6.9 $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.05-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I'e ait alan değişimi; pH 5.0



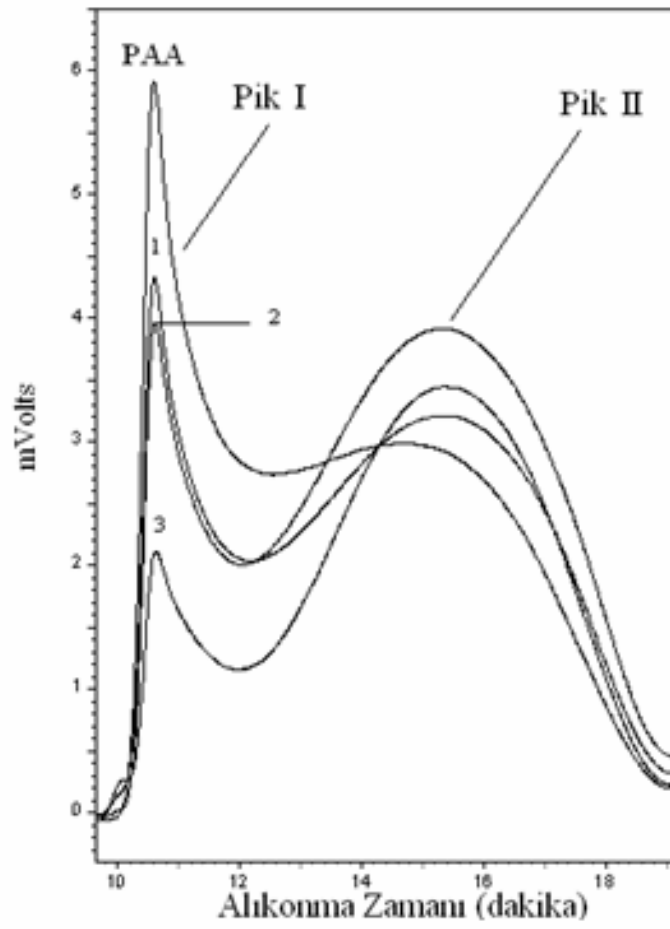
Şekil 6.10 $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5-50$ oranlarına bağlı olarak, pik II'ye ait alan değişimi; pH 5.0.



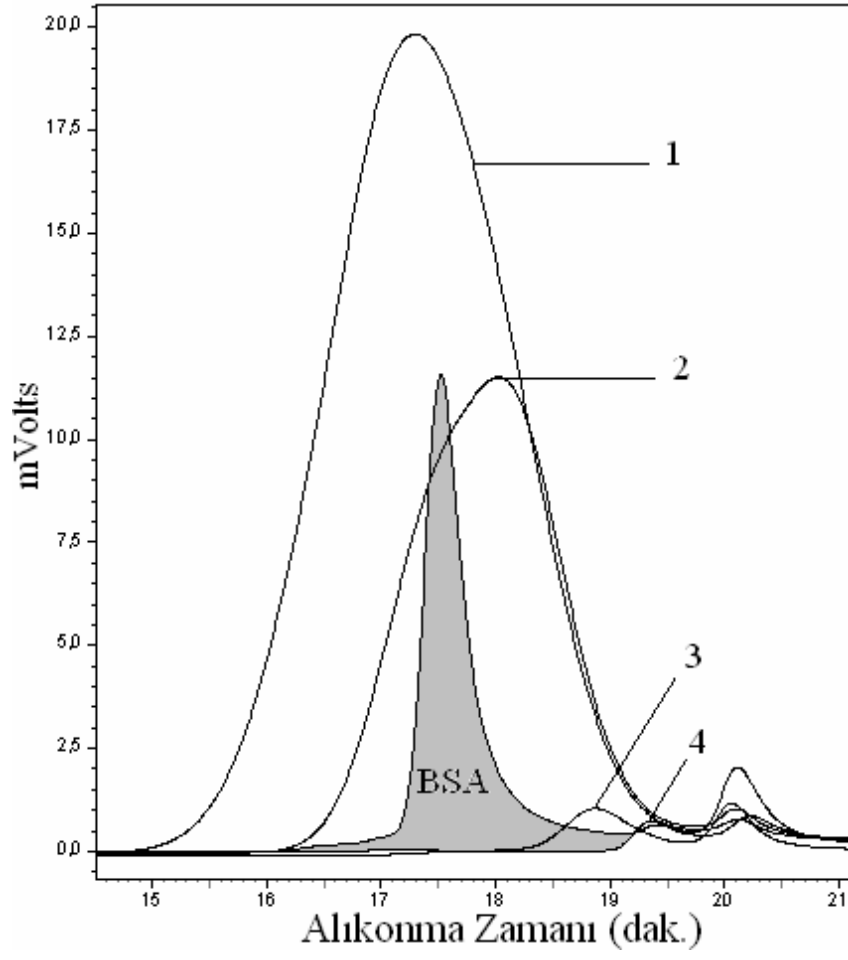
Şekil 6.11 Bileşenlerin farklı $n_{BSA}/n_{PAA} = 7.5-50$ molar oranlarında kompleksin içindeki (pik I) BSA konsantrasyonu; pH 5.0.



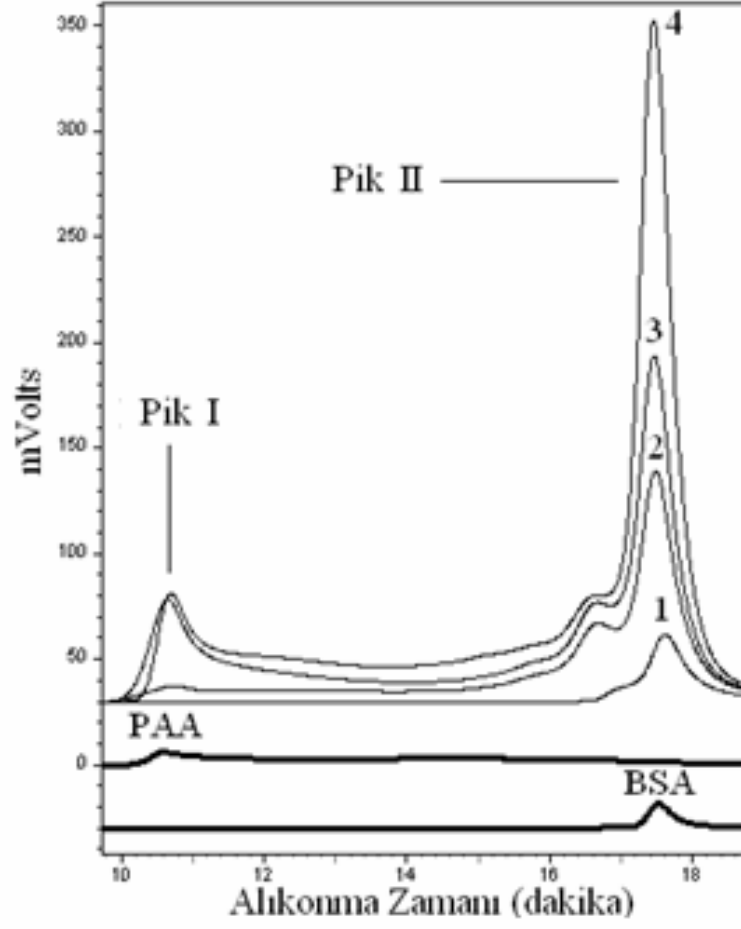
Şekil 6.12 Bileşenlerin farklı $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 7.5-50$ molar oranlarında polikompleksin bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı; pH 5.0.



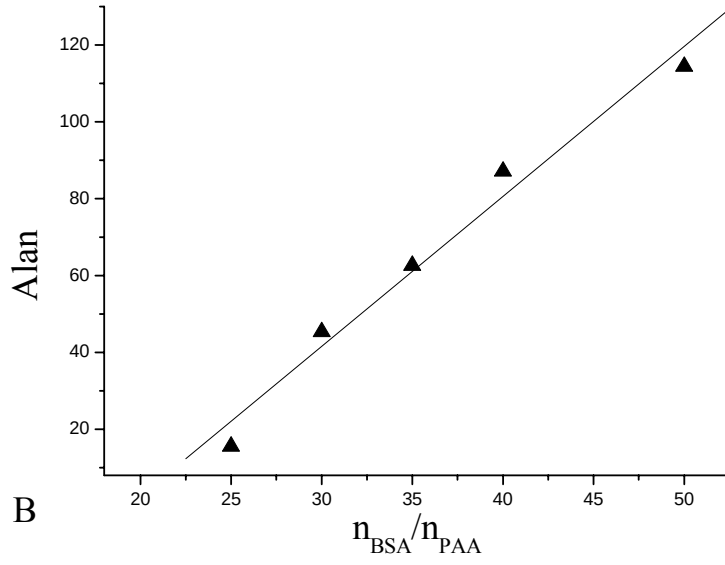
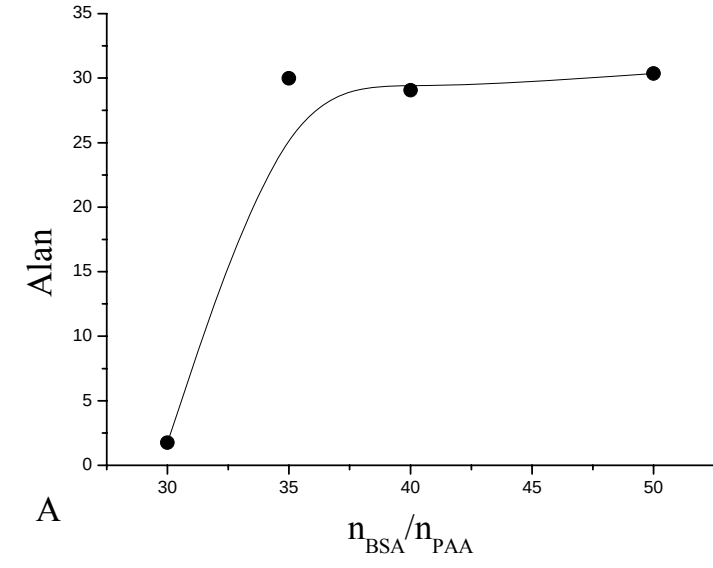
Şekil 6.13 Serbest PAA ve $n_{BSA}/n_{PAA}=0.5(1); 0.75(2); 1.0(3)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.



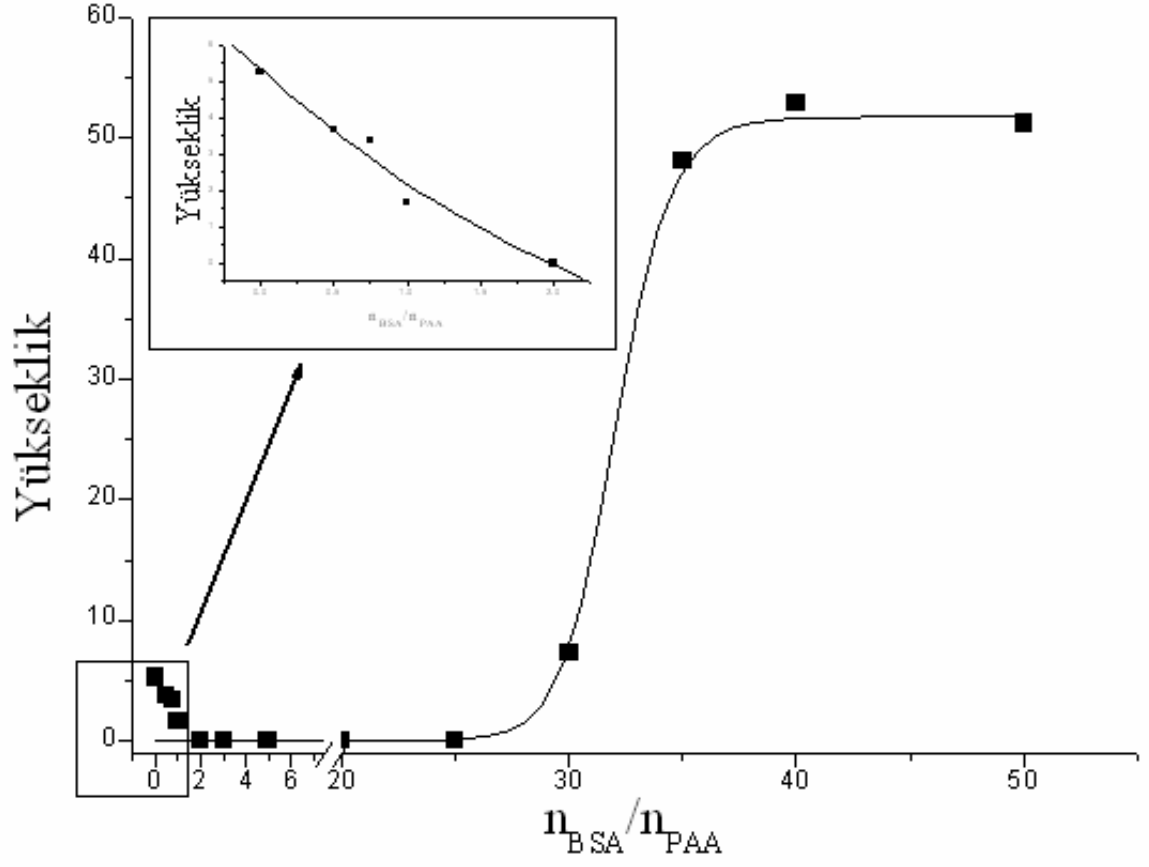
Şekil 6.14 Serbest BSA ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 2(1); 3(2); 5(3); 7.5(4)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.



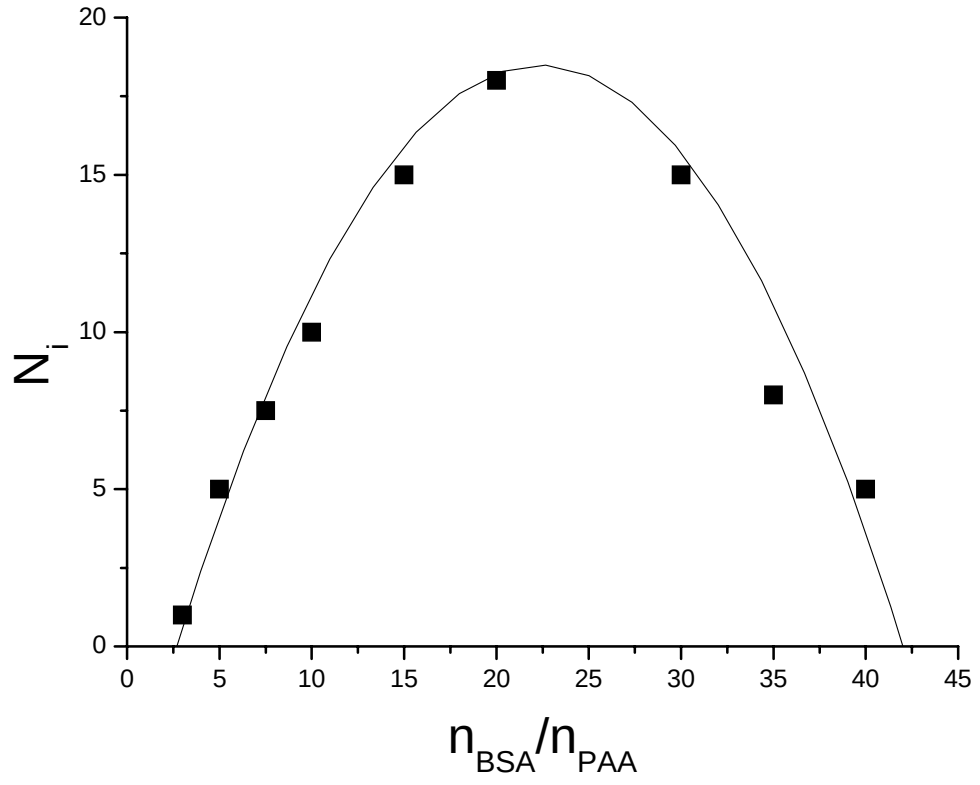
Şekil 6.15 Serbest BSA, PAA ve $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 25(1); 30(2); 35(3); 50(4)$ oranlarında hazırlanan BSA-PAA karışımlarının HPLC kromatogramları; pH 4.0.



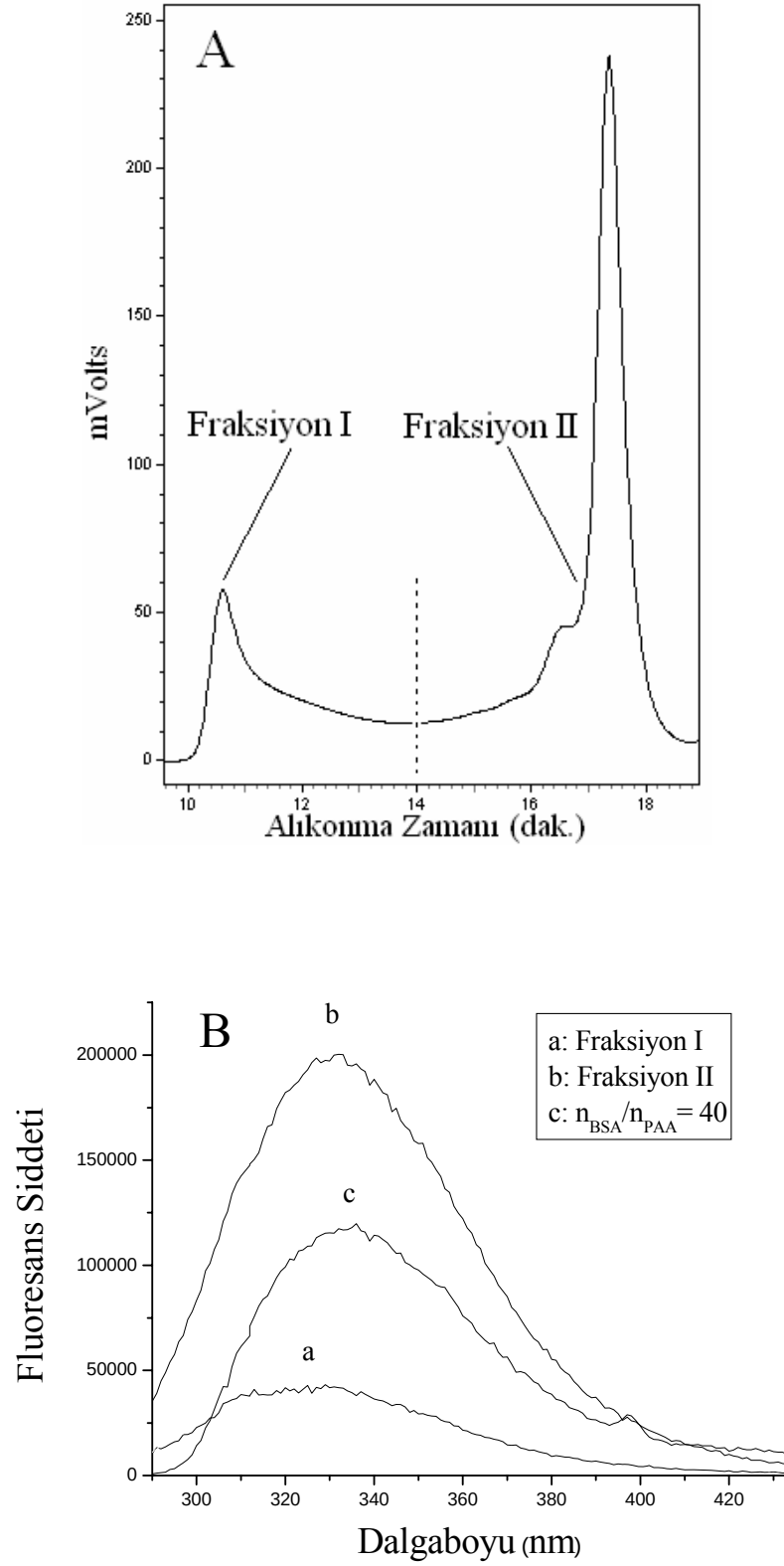
Şekil 6.16 $n_{BSA}/n_{PAA} = 25-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I (A) ve pik II (B)'e ait alan değişimi; pH 4.0.



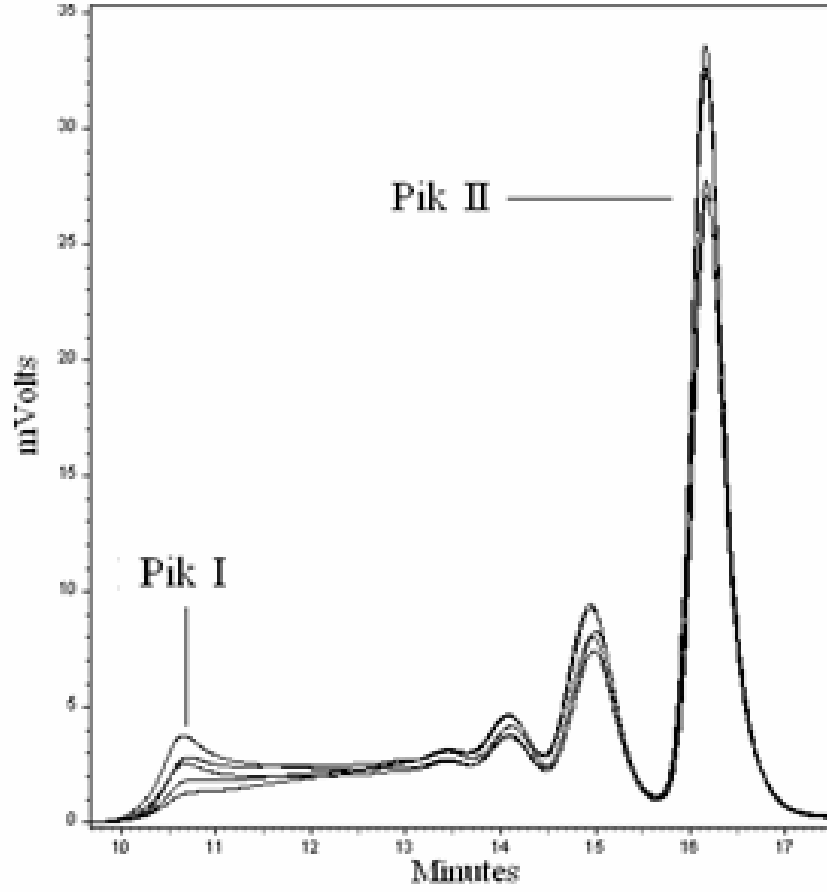
Şekil 6.17 $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.05-50$ oranlarına bağlı olarak, pik I'e ait yükseklik değişimi; pH 4.0.



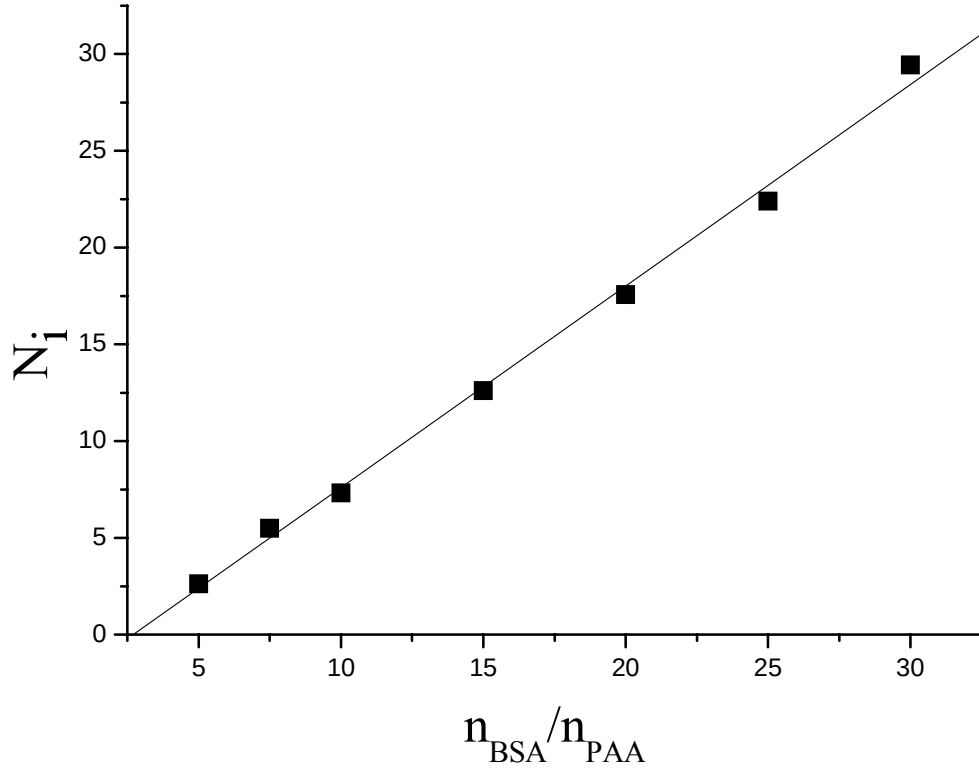
Şekil 6.18 $n_{BSA}/n_{PAA} = 2-40$ oranlarında çökelekteki polikompleks parçacıklarının bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı; pH 4.0.



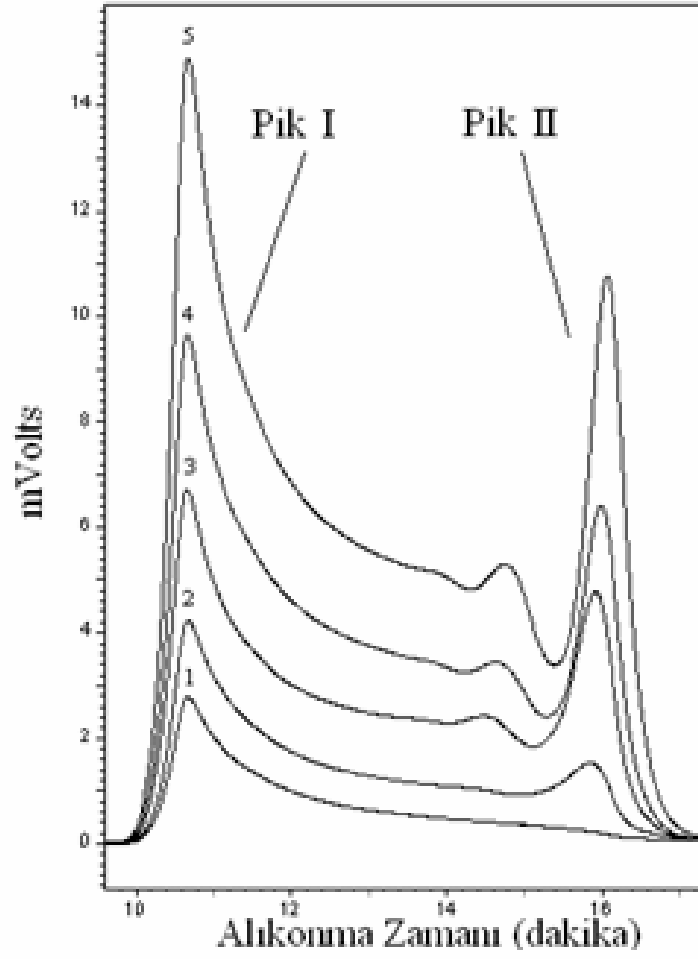
Şekil 6.19 $n_{BSA}/n_{PAA}=40$ kompleksinin supernatantı ve fraksiyonlarının HPLC kromatogramları (A); ve bunların 280 nm'deki fluorensans ölçümleri a: fraksiyon I, b: fraksiyon II ve c: $n_{BSA}/n_{PAA} = 40$ kompleksinin supernatantı; pH 4.0 (B) (B. Battal, 2006).



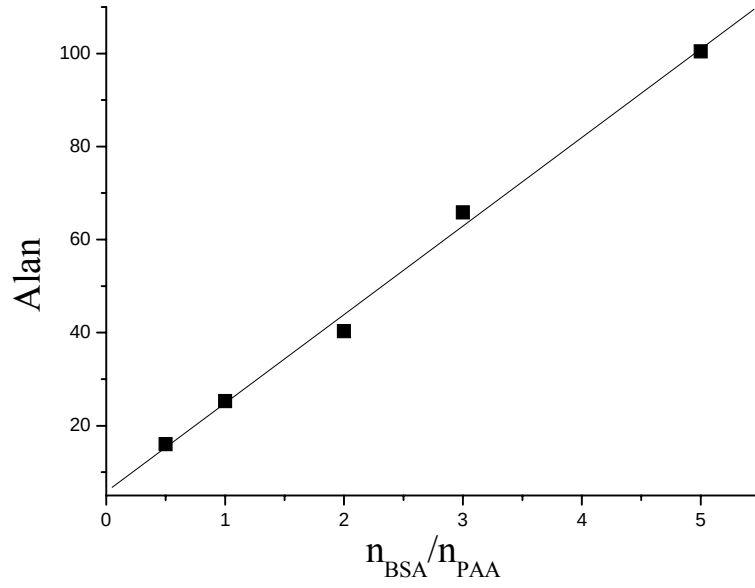
Şekil 6.20 $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} = 5-40$ oranlarında, $\text{pH} = 4.3$ 'deki BSA-PAA karışımlarının 3mg/ml konsantrasyonundaki çökeltilerinin $\text{pH} 7$ 'de tekrar çözünmüş hallerinin HPLC kromatogramları.



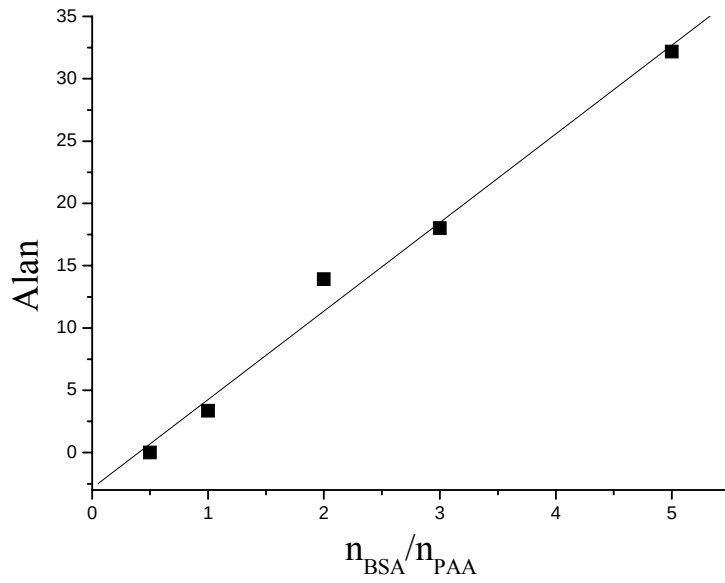
Şekil 6.21 $n_{BSA}/n_{PAA}= 5-30$ oranlarında, $pH = 4.3$ 'deki BSA-PAA karışımlarının çökeltilerinin $pH\ 7.0$ 'de tekrar çözündüğünde açığa çıkan komplekslerde, polikompleks parçacıklarının bileşimindeki protein moleküllerinin sayısı.



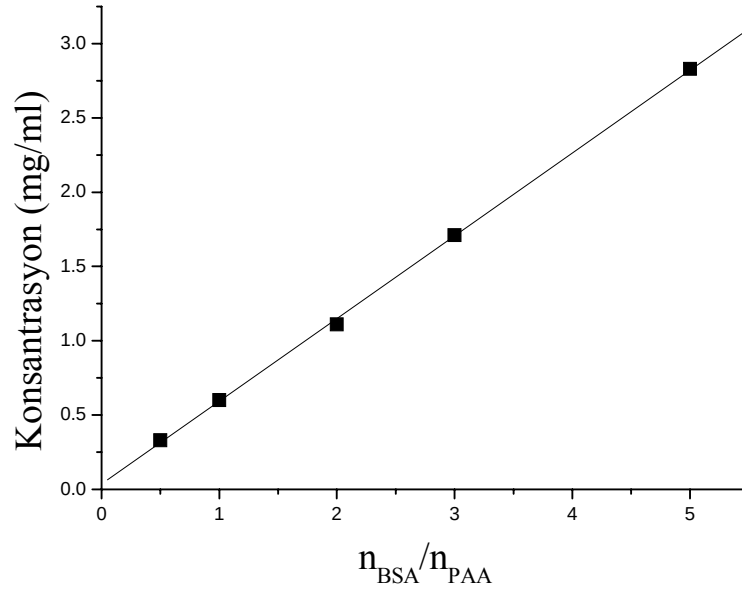
Şekil 6.22 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1)$, $1.0(2)$, $2.0(3)$, $3.0(4)$, $5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramları; pH 7.0; 25° C.



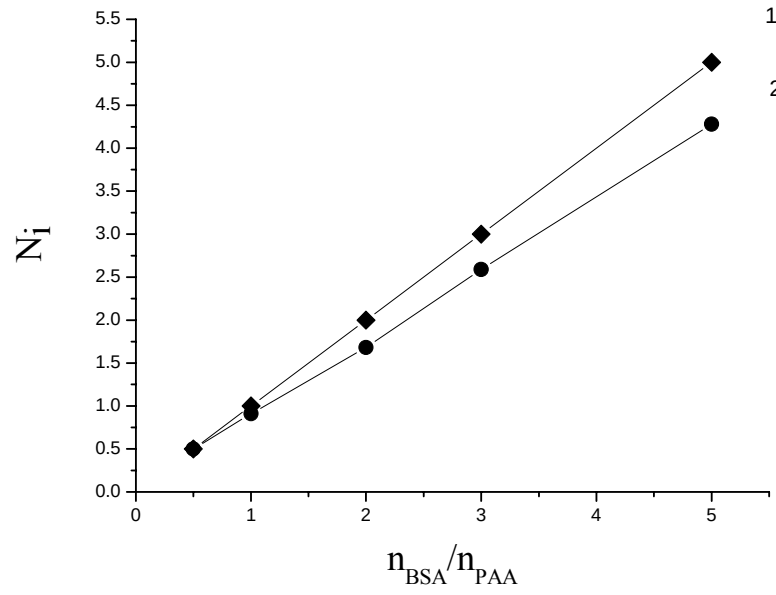
Şekil 6.23 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramlarındaki pik I' e ait alanlarındaki değişimi, pH 7.0.



Şekil 6.24 Bileşenlerin farklı molar oranlarında $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ hazırlanan BSA-PAA kovalent konjugatlarının HPLC kromatogramlarındaki pik II' ye ait alanlarındaki değişimi, pH 7.0.



Şekil 6.25 Bileşenlerin farklı $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ molar oranlarında kovalent konjugata bağlanan BSA konsantrasyonu.



Şekil 6.26 pH 5.0'deki polikomplekste (1) ve pH 7.0'deki kovalent biyokonjugatta (2), $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5(1), 1.0(2), 2.0(3), 3.0(4), 5.0(5)$ oranlarında polikomplekslerin/kovalent konjugatlarının bileşimindeki BSA moleküllerinin sayısı.

7. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

7.1 PAA'nın BSA ile Çökmesi

BSA tarafından PAA'nın pH etkisiyle çökeltilmesi Şekil 6.1'de gösterilmiştir. $n_{BSA}/n_{PAA}=15$ oranını sabit tutarak, çökeltme pH'ın bir fonksiyonu olarak çalışılmış ve çözünür BSA-PAA karışımlarında pH = 5.0 değerinden başlayan faz ayrılmalarıyla karakterize edilmiştir. pH 7.0'de hazırlanan çözünür PAA-BSA karışımlarının pH titrasyonu, pH 5'e kadar PAA-BSA karışımlarının çözeltilerinin homojen kaldığını göstermiştir ve ardıl olarak asid eklenmesi faz ayrılmasına neden olmuştur. Maksimum turbidite değerine pH 4.0'de ulaşılır ve pratik olarak bu değerin altında değişmez. Aynı zamanda, pH 4.0'de hazırlanan suda-çözünemeyen PAA-BSA karışımlarının titrasyonu, çökeltileri daha yüksek pH değerlerinde tekrar çözerek başarılmıştır. Bunlar, pH 4.0'de PAA-BSA çözeltisinin içindeki çözünemeyen polielektrolit-protein komplekslerinin oluşumu da olabilir.

Şekil 6.2A, PAA konsantrasyonunu sabit tutarak eklenen protein miktarı üzerinden PAA-BSA karışımının optiksel yoğunluğuna (OD_{500}) bağlı değişimi gösterir. Bu sonuçlara dayanarak karışımın çözünürlüğü n_{BSA}/n_{PAA} oranına ve çözelti pH'ına bağlı olduğu söylenebilir. pH 4.0-4.3'de, çok düşük oranlardan ($n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5$) başlayarak bir faz ayrılması meydana geldiği görülmüştür. Protein konsantrasyonu arttıkça OD_{500} değeride artmış ve n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı olarak bir maksimum değere ulaşmıştır. OD_{500} 'e benzer olarak, bileşendeki BSA oranı arttıkça çökeltinin miktarı da (m) arttı ve daha sonra Şekil 6.2B'de gösterildiği gibi bir limit değerine ulaştı.

Her iki durumda da numune belirgin bir şekilde n_{BSA}/n_{PAA} oranının artırılmasıyla değişmiştir. Karışımındaki protein konsantrasyonuna bağlı olarak, kısmi veya tamamen faz ayrılmasının önüne geçme meydana gelir. Sistemde sadece homojen karışımın var olduğu N_i noktasına uygun olarak, çökeltmeyi önlemek için sistemde ortaya çıkan proteinin minimum miktarı Şekil 6.2A'daki ok ile gösterilmiştir. Bu nedenle, BSA konsantrasyonuna bağlı olarak, pH 4.0-4.3 de çözünemeyen protein-PAA karışımının çözülür hale dönüşümü gerçekleşir. Bileşenlerin farklı molar oranlarında, UV-spektrometresi tarafından elde edilen üst faz içindeki BSA'nın çözünürlüğü Şekil 6.3A'da gösterilmiştir. Paralel olarak BSA'nın sabit konsantrasyonlarında eklenen PAA miktarına göre PAA-BSA karışımlarının OD_{500} değerleri UV-spektrometresiyle ölçülmüştür.

pH 5.0-7.0’de BSA-PAA karışımlarının analizinden, protein çözeltileriyle PAA’nın titrasyonu $pH < pI$ (BSA’nın izoelektrik noktası, $pI_{BSA} = 4.9$ (Neurath, 1953) değerlerinin aksine çok geniş bir aralıktaki n_{BSA}/n_{PAA} oranlarında karışımların çözünür kaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.3B). OD_{500} değerleri, sistemdeki çok geniş bir aralıktaki protein konsantrasyonuna bağlı olarak büyük bir değişiklik göstermedi. Bu sonuçlar PAA ile human serum albumin (HSA), hemoglobin, globin ve transferrinin karışımlarından elde edilen sonuçlar ile de uyumluluk gösterir. Bu karışımların çözünürlüğü protein moleküllerinin pI değerleriyle ilişkilidir ve karışımdaki bileşenlerin konsantrasyonlarına bağlıdır.

7.2 Suda-Çözünür Sistemlerin HPLC Yöntemi ile Analizi

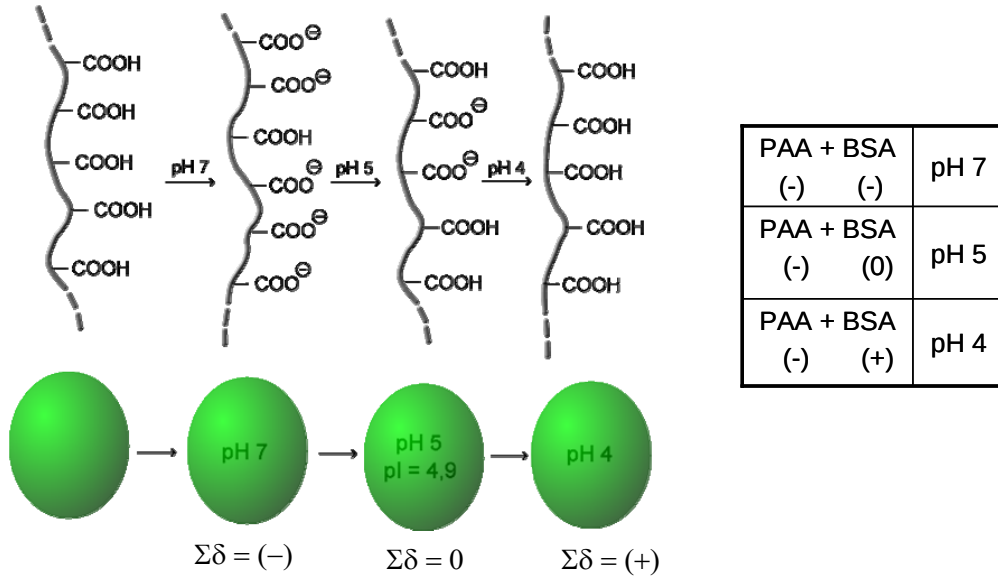
7.2.1 pH 5.0-7.0 Aralığında Kompleks Oluşumu

Suda-çözünür BSA-PAA karışımları, karışımın oldukça düşük konsantrasyonlarında fraksiyon kompozisyonlarının çalışılmasını olanaklı kılan spektrometrik ve HPLC yöntemleriyle, farklı deneysel koşullar altında analiz edilmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi, pH 7.0’de protein çözeltisinin eklenmesi belirli bir n_{BSA}/n_{PAA} değerleri içinde PAA’nın çözünürlüğünü etkilememiştir. Tipik olarak BSA’nın analizi ve farklı oranlardaki moleküler konsantrasyonlarında PAA ile olan çözünür karışımları Şekil 6.4A’da verilmiştir. PAA-BSA karışımları, BSA’nın serbest fraksiyonuna (BSA’nın fraksiyonları monomer, dimer ve trimer sırasıyla pik I, pik II, pik III ile gösterilmiştir.) ve PAA’ ya (pik IV) ait pikler tarafından kromatogramlarda karakterize edilmiştir. Karışımın fraksiyon bileşenlerinin alıkonma zamanları (RT) değişmedi ve serbest BSA ve PAA molekülleriyle aynı kaldı. Peak I (peak I, II ve III’ ün özeti) ve IV’ e ait, alana bağlı olarak değişen BSA-PAA karışımlarının n_{BSA}/n_{PAA} oranına bağlı grafiği şekil 6.4B’de gösterilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi pik alanlarındaki hafif değişmeden, pH 7.0’de BSA ve PAA arasındaki etkileşimin zayıf olduğu, dolayısıyla ihmal edilebilir olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar, PAA-BSA sistemlerinin sedimentasyon (Kabanov, 1978) ve HPLC analizlerinden elde edilen sonuçlarla uyumluluk gösterir. PAA ve protein molekülü arasında önceden var olan elektrostatik kuvvetler BSA’nın kararlı polielektrolit kompleksler oluşturmasını engeller.

pH 6.0’daki BSA-PAA karışımları, alıkonma zamanlarına göre, serbest polimer ve protein fraksiyon bileşenlerine ait kromatogramlarla karakterize edilmiştir (Şekil 6.5A). Ancak, PAA fraksiyonunu ait olan Pik IV’ ün optik yoğunluğu (OD_{280}) karışımdaki protein moleküllerinin konsantrasyonunun artmasıyla artmıştır. Bu durum, polimer-protein kompleksi içerisinde bir

parça PAA ve BSA moleküllerinin olabileceğini gösterir. Çözünabilir karışımda polimer sarmalları arasındaki protein moleküllerinin dağılımını analiz edemeyiz. Çünkü, reaksiyon koşullarında serbest PAA polimer-protein kompleksinden HPLC yöntemiyle ayıramaz. Sonuçta, pH 6.0'da zayıf polielektrolit komplekslerinin oluşumu ve serbest bileşenlerin çözeltideki varlığı çok geniş bir aralıktaki oranlardaki kromatogramlarda gösterilmiştir.



Şekil 7.1 Farklı pH değerlerinde (pH 4, pH 5, pH 7) PAA ve BSA'nın sahip olduğu yüklerin şematik gösterimi.

pH 6.0 ve 7.0 değerlerinde $pH > pI_{BSA}$ koşulu vardır (Şekil 7.1). BSA molekülleri ve PAA'nin poliyonları negatif olarak yüklenmişlerdir ve aralarında oluşan elektrostatik itme kuvvetlerinden dolayı kararlı polikompleks parçacıkları oluşamaz.

PAA-BSA karışımının pH değerinin düşürülmesi ile birlikte kararlı kompleks oluşumu gözlenmeye başlar. pH değerine bağlı olan kompleks oluşumunun derecesi, pH 5'de deneysel koşullar altında neredeyse niceldir. Şekil 7.1'de görüldüğü üzere, bu pH değerinde BSA globülleri zayıf olarak negatif yüklenmişlerdir. Sonuç olarak protein moleküllerinin negatif yüklü polianyonlarla bağlanması elektrostatik itme kuvvetlerine karşı meydana gelir. BSA moleküllerinin farklı konsantrasyonlarıyla yapılan PAA çözeltilerinin titrasyonunun pH 5'deki HPLC sonuçları Şekil 6.6-6.8'de gösterilmiştir. Reaksiyon karışım bileşenlerini üç bölgeye ayırmak mümkündür. I. bölgede ($n_{BSA}/n_{PAA}=0.05-1.0$), BSA-PAA çözeltileri kromatogramlarda sadece 1 pik ile karakterize edilmiştir. Bu pikin alıkonma zamanı (RT) değişmez ve serbest PAA pikiyle aynı yerdedir. Üstelik, BSA'nın varlığı karışımın optik yoğunluğunda (piklerin alanı) bir artışa neden olur. Bundan dolayı, Şekil 6.6A'daki HPLC sonuçlarından da görüldüğü üzere PAA-BSA karışımlarında serbest BSA molekülleri yoktur.

Şekil 6.6B'deki karışımın çözeltilerinin alanlarındaki artış, polielektrolit komplekslerinin BSA içerdiğini gösterir.

II. Bölgede, $n_{BSA}/n_{PAA} \geq 5$ de elde edilen kromatogramlarda iki pik olduğu görülmüştür (Şekil 6.7). Alıkonma zamanı yaklaşık 16 dakika olan yavaş hareket eden parçacıklar (pik II), aslında serbest BSA molekülüne ait olan RT'den farklıdır ve serbest PAA polimerine ait olan alıkonma zamanıyla karakterize edilen hızlı hareket eden parçacıkların alanı (Şekil 6.9) çözeltilerin titrasyonu ile birlikte $n_{BSA}/n_{PAA}=20$ oranına kadar artmış ve daha büyük oranlarda değişmemiştir. Şekil 6.10'da yavaş pike ait olan (Pik II) kromatogramların alan grafiği üzerinde korelasyon eğrisi yapılmış ve lineer bir artış gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki serbest BSA moleküllerine ait hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile komplekse katılan BSA konsantrasyonu (Şekil 6.11) ve her bir PAA zincirine bağlanan BSA moleküllerinin sayısı (Şekil 6.12) hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, ilk defa $n_{BSA}/n_{PAA} = 5.0$ oranında farklı bileşimlere sahip BSA-PAA kompleks parçacıkları oluşmuştur.

Ardışık oranlarda BSA' nın eklenmesiyle ($n_{BSA}/n_{PAA}=7.5-50$ -bölüm III) “yavaş” pikin alanında büyüme oranı artarken, “hızlı” pikin alanında gözle görülür büyük bir değişiklik gözlenmemiştir. Buradaki “yavaş” piklerin alıkonma zamanı serbest BSA' nın RT'sine yaklaşmıştır. Buna göre, bu bölgeyi göz önüne alarak çözünür BSA-PAA komplekslerinin serbest BSA molekülleri ile aynı anda varolduğu söylenebilir (Şekil 6.8).

7.3 pH 4.0-4.3 Aralığında Kompleks Oluşumu

pH 4.0 ve pH 4.3'deki bir PAA çözeltisiyle bir BSA çözeltisinin turbidimetrik titrasyon eğrileri Şekil 6.2A'da gösterilmiştir. Buna göre reaksiyon karışım bileşimlerini üç bölüme ayırmak mümkündür. Suda-çözünmeyen BSA-PAA karışımlarının supernatantlarının (üst faz) analizi HPLC-jel filtrasyon ve spektrometrik yöntemlerle incelenmiştir. I. bölgede ($n_{BSA}/n_{PAA}=0.05-1.0$) matriks çözeltiler homojen kalırlar. Kromatogramlarda RT=10.3 dak. ve RT=15.5 dak. olmak üzere iki pik gözlenmiştir (Şekil 6.13). Pik I'in OD₂₈₀ değeri aslında protein konsantrasyonuna bağlıdır ve n_{BSA}/n_{PAA} oranının artmasıyla birlikte azalmıştır. Protein/polimer oranının artmasıyla birlikte bulanıklıkta da bir artış görülmüştür. Pik I'in, serbest PAA'nın fraksiyonu ile uyumluluk gösterdiği farzedilebilir. Supernatantların kromatogramlardaki alıkonma zamanıyla serbest BSA'ya ait olan RT uygunluk göstermez, dolayısıyla pik II'nin serbest BSA'ya ait olmadığı söylenebilir. Üstelik, supernatantların UV analizlerinde de protein fraksiyonlarının varolduğu görülmüştür (Şekil 6.3A). Bu nedenle,

“yavaş” olan II. Pik çözünür protein-polimer komplekslerine ait olabilir.

Çökelti uzaklaştırıldıktan sonra, $5 < n_{BSA}/n_{PAA} < 20$ aralığındaki karışımların kromatogramlarına göre, çözeltide polimerik bir bileşen (protein, polianyon veya suda-çözünür BSA-PAA kompleksleri) görülmemiştir (Şekil 6.14). Bu bölgede, çözünemeyen komplekslerin fraksiyonları içindeki bütün protein ve polimer molekülleri çökeltiye gitmiştir.

Bu oranların üzerinde proteinin eklenmesiyle aynı zamanda çözeltinin turbiditesinde bir azalma meydana gelmiştir ve $n_{BSA}/n_{PAA}=20$ oranında sistem tekrar homojen hale geçmiştir (bölüm III). $20 < n_{BSA}/n_{PAA} < 50$ aralığında elde edilen çözeltilerin (supernatantlar) kromatogramlarında iki pik gözlenmiştir (Şekil 6.15). Serbest BSA’nın alıkonma zamanıyla uyum gösteren yavaş elue edilen parçacıklar $RT=17.5$ dak. ile karakterize edilirken, $RT=10.3$ dak. alıkonma zamanına sahip hızlı elue edilen parçacıklar ise hemen hemen serbest PAA’nın alıkonma zamanıyla uyum gösterirler. Şekil 6.16A ve 6.16B’de “yavaş” ve “hızlı” piklerin karışım bileşimindeki n_{BSA}/n_{PAA} oranlarına bağlı alan grafiği gösterilmiştir. $n_{BSA}/n_{PAA}=35$ değerine kadar BSA eklenmesi, aynı anda her iki pikin alanında uyumlu bir artışa neden olmuştur ve “yavaş” pikin alanı “hızlı” pikin alanından daha büyüktür. Bunun anlamı, $n_{BSA}/n_{PAA} = 30$ oranında serbest protein, yeni bir biçimde oluşan suda-çözünen (pik I) ve çözünemeyen BSA-PAA kompleks parçacıkları ile birlikte aynı anda varolur. BSA’nın ardıl eklenmesi “hızlı” pikin alanında gözle görülür büyük bir değişikliğe neden olmazken “yavaş” pikin alanının büyüme oranı artmıştır. Serbest BSA molekülleri sadece çözünür BSA-PAA kompleksleri ile birarada bulunurlar.

I. bölgede pik I’e ait kromatogramların yüksekliklerindeki azalmadan, bu bölgede çok az miktarda kompleks oluşumunun gözlemlendiği söylenebilir. Ancak $5 < n_{BSA}/n_{PAA} < 20$ aralığındaki oranlarda herhangi bir kromatogram gözlenmediğinden, protein ve kompleksler çökeleğin içindedir. Daha büyük oranlarda ($n_{BSA}/n_{PAA} > 20$), tekrar serbest protein varlığı ortaya çıkmıştır (Şekil 6.17).

$n_{BSA}/n_{PAA}=40$ oranının kromatogramındaki pik I ve II fraksiyonlarına ayrılmış ve bu piklere ait çözeltiler floresans spektroskopisi ile ölçülmüştür. BSA-PAA karışımının ve bu karışım çözeltilerinin I. (pik I) ve II. (pik II) fraksiyonlarının floresans spektrumu şekil 6.19’da gösterilmiştir. Proteinlerin triptofan (Trp) floresansı maksimum emisyon (λ_{max}), kuantum kazancı, yarıömür gibi floresans parametrelerindeki değişimlerin sonucunda oluşan konformasyonel yapıya göre değişir. Şekil 6.19B’de görülebileceği gibi, pH 4’deki BSA-PAA karışımının maksimum emisyonu, çözeltideki saf BSA’nın emisyonuyla ($\lambda_{max} = 340$ nm) hemen hemen aynıdır. Bu, karışımda büyük oranda serbest BSA bulunduğunu kanıtlar. Bu

örnek I. fraksiyonun çözeltisinde oldukça büyük bir farklılık gösterir: maksimum floresans şiddeti mavi bölgeye doğru öteleme verir ($\lambda_{\max}=330\text{nm}$). BSA, iki triptofan içerir. Bunlardan biri (Burstein tarafından spektral sınıf 2, $\lambda_{\max}=340-342\text{ nm}$) BSA'nın hidrofobik kısmının altında konumlanmıştır. Düşük kuantum kazancına sahip sınıf 3 ikinci Trp ($\lambda_{\max}=350-352\text{ nm}$) yüzeydedir ve tamamiyle suyla etkileşebilir. Bizim örneklerimizden elde edilen, oldukça büyük olan mavi öteleme ($\sim 10\text{ nm}$) BSA triptofanillerinin suyla daha az etkileşebildiğini, bu da protein ile polimerin artarak daha da sıkı bağlandığını gösterir. Sonuç olarak, serbest protein molekülleriyle aynı anda ortaya çıkan pik I'in, protein-polimer komplekslerinin piki olduğu ispatlanmıştır.

7.4 Suda-Çözünmeyen Polikomplekslerin Fraksiyon Bileşenleri

Çözünemeyen polikompleks parçacıklarının davranışının analizi için pH 4.0-4.3'deki PAA-BSA karışımının çökeltisi ayrıldıktan sonra titrasyon ile pH 7.0'de tekrar çözündürülmüş ve HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Çözünmeyen komplekslerden tekrar çözünerek elde edilmiş, BSA-PAA'in çözünür karışımları için bileşenlerin farklı oranlarında ve pH 7.0'de hazırlanmış HPLC örneği Şekil 6.20'de gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, BSA-PAA çözeltileri, eklenen BSA miktarının artmasıyla birlikte sistemde çok geniş bir aralıktaki protein konsantrasyonunun oranına ($5 < n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}} < 40$) bağlı olarak, iki pik ile karakterize edilirler. Pik I ve pik II'nin alıkonma zamanları, benzer olarak 10.5 ve 17. dakikalardır. Bundan dolayı, pik I ve pik II sırasıyla çözünür PAA-BSA kompleksleri ve serbest BSA fraksiyonları olabilir (HPLC ile pH 7.0'de serbest PAA, UV detektörü tarafından görülmez.).

7.5 PAA'nın BSA ile Suda Çözünür Kovalent Konjugasyonu

Çözeltideki makromoleküler konsantrasyonlarına göre farklı $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında sentezlenen biyokonjugatların HPLC kromatogramları Şekil 6.22'de gösterilmiştir.

Bu şekilden de görüldüğü gibi, $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=1.0$ oranına kadar kromatogramlarda elue edilen bileşenler bir pik ile karakterize edilir. Bu piklerin alıkonma zamanları (RT), serbest PAA'nın RT'si ile uygunluk gösterir. Piklerin alanları, sabit PAA konsantrasyonunda, eklenen BSA miktarına göre orantılı olarak arttı. $n_{\text{BSA}}/n_{\text{PAA}}=1.0$ oranında elde edilen sonuçlar, proteinin PAA tarafından bağlandığını ve reaksiyon ürünlerinde saf BSA'nın bulunmadığını gösterir. Bu nedenle, HPLC kromatogramlarında sadece bir pik çözünür PAA-BSA kovalent konjugatını olabilir. Çözünür karışımlarda polimer sarmalları arasındaki protein

moleküllerinin dağılımını analiz edemeyiz. Çünkü serbest PAA, HPLC’de polimer-protein komplekslerinden ayrılmaz.

$n_{BSA}/n_{PAA} > 1.0$ oranlarında BSA-EDC-PAA’in reaksiyon ürünleri elue edilen bileşenlerin bimodal dağılımıyla karakterize edilirler. Reaksiyon karışımlarının çözeltilerindeki pik I ve pik II’ye ait alıkonma zamanlarının, ayrı ayrı bileşenlerin RT’si ile karşılaştırılmasından, yavaş elue edilen örneğin (pik II) serbest BSA’ya, pik I’in ise daha önce de ifade edildiği gibi polimer-protein konjugatına ait olduğu anlaşılır. Şekil 6.23 ve 6.24’den de görüldüğü gibi, bu piklere ait alanlar n_{BSA}/n_{PAA} moleküler oranlarının arttırılmasıyla birlikte artmıştır.

Serbest BSA’ya ait kalibrasyon eğrisini kullanarak ve HPLC piklerinin alanlarından konjugatın bileşimindeki protein moleküllerinin konsantrasyonu (Şekil 6.25) ve miktarı (Şekil 6.26) hesaplandı. Konjugat moleküllerinin karakteristik bileşimi ve bir polimer makromolekülüne bağlanan protein molekülü sayısı N_i ile gösterilir. Ortalama N_i değerlerine bağlı, $n_{BSA}/n_{PAA} = 0.5-5$ oranlarındaki BSA-PAA karışım bileşenlerine ait grafikteki 1. eğri (kompleks) ve 2. eğrinin (kovalent konjugasyon) karşılaştırılması Şekil 6.26’dadır. Protein-polimer karışımlarındaki BSA içeriğindeki artış sonucunda, bileşenlerin hem kovalent konjugasyonunda hem de kompleks oluşumunda, bir polimer makromolekülüne bağlanan protein molekülü sayısında lineer bir artış gözlenir. Polikomplekslerin HPLC alanlarından elde edilen ortalama N_i değeri $n_{BSA}/n_{PAA} = 1.0$ oranına kadar biyokonjugat analizlerinden elde edilen N değeriyle uyumluluk gösterir. Bu sonuçları temel alarak, elektrostatik (ve hidrofobik) interpolimer-protein komplekslerinin en hızlı meydana gelen proses olarak oluşumunun, biyokonjugat moleküllerinin yapısının organizasyonu için çok önemli olduğu söylenebilir. Şekil 6.26’daki grafikten bakarak, $n_{BSA}/n_{PAA} > 1.0$ olduğunda iki eğri arasında bazı ıraksamalar görülür (orana bağlı olarak %5-10). Sonuçta, kompleks parçacıklarının kompaktlığı, kondensleşme reaksiyonlarından sonra artmıştır ve belirli oranlarda biyokonjugat molekülleri protein moleküllerinin bir kısmını kaybetmiştir.

KAYNAKLAR

- Abuchouwski, A., Es, T. van, Palezul, N.C., Davis, F.F., (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 3578-81.
- Bae, Y.H., Okano, T., Hsu, R., Kim, S.W., (1987), "Thermo-sensitive polymers as on-off switches for drug release", *Macromol. Chem. Rapid Commun.*, 8, 481-5.
- Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M.I., Bermek, E., (2000), *Hybridoma*, Vol.19, 6, 19, 495-499,
- Başalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M.I., (2002), "Cu²⁺ Induced Biopolymer Systems Comprising a Steroid Hormone, protein antigen and synhetic polyelectrolytes", *Hybridoma and Hybridomics*, 21, 1, 45-51.
- Battal, B.Y. (2006), "Anyonik Polielektrotların Sığır Serum Albumin ile Etkileşimlerinin Floresans Yöntemiyle İncelenmesi", Yükseklik lisans tezi (yayınlanmamış).
- Berdick, M. ve Morawetz, H., (1954), "The interaction of catalase with synthetic polyelectrolytes", *J. Biol. Chem.*, 206, 959.
- Bloomfield, V., (1966), "The Structure of Bovine Serum albumin at Low pH", *Biochemistry* 5; 684-689.
- Burgess, D.J., Carlesa, J.E., (1984), *J. Colloid Interface Sci.*, 98, 1,.
- Carter, D. C., Ho, J. X. (1994), "Structure of serum albumin", *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203.
- Commandur, B., Arneodo, C., Benoit, J. P., Thies, C. (1989), "A study of the viscosity of gelatin-based complex coacervates", *Controlled Release of Bioactive Materials*, Chicago, Abstract 132, 89.
- Connell, N.D. (1999), *Surfaces of Nanoparticles and Porous Materials*, Marcel Dekker Incorporated, New York, NY.
- Çimen, N. (2006), "Proteinlerin Poliakrilik asit ile Suda Çözünmeyen Kompleksleri", Yükseklik lisans tezi.
- Dellacherie, E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 602.
- Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., Mustafaev, M., (2001), "Water soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly-(N-isopropylacrylamide) and their immunogenecity", *Biomaterials*, 22, 2383-2392.
- Dincer, B., Mustafaev, M.I., Bayulken, S., (1997), "High Performance Liquid Chromatography Study of Water-Soluble Ternary Polyacrylamide-Metal-Protein Complexes", *J Appl Polym Sci* 65: 37-40,
- Dubin, P., Ross, T.D., Sharma, I., Yegerlehner, B., (1987), in *Ordered Media in Chemical Separations*, W.L. Hinze, D.W. Armstrong, eds., American Chemical Society: Washington, DC; Chapter 8.
- Dubin, P.L.; Cooper, C.L., Kayitmazer, A.B., Turksen, S. (2005), "Polyelectrolyte-protein complexes", *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 10, 52-78.
- Dautzenberg, H., Jaeger, W., Kötzt, J. (1994), *Polyelectrolytes: formation, characterization, and application*, Hanser Publishers, Munich.
- Gooding, M.K. (2002), *Size Exctusion Chromatography, HPLC of Biological*

Macromolecules (Chromatographic Science), Marcel Dekker Inc.

Hatano, T., Hori, M., Hemingway, R., Yoshida, T., (2003), "Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes", *Phytochemistry* 63 817-823.

Higgs, P.G., Joanny, J.F. (1991), "Theory of polyampholyte solutions", *J. Chem. Phys.*, 94, 2, 1543.

Hughes, W. L. (1954). In "The Proteins" (H. Neurath and K. Biley, eds.), Vol. 2b, pp. 663-755. Academic Press, New York.

Kabanov, V.A., Evdakov, V.P., Mustafaev, M.I., Antipina, A.D., (1977), "Cooperative interaction of serum albumin with quaternized poly-4-vinylpyridine and structure of the complexes", *Mol. Biol. (Moscow)*, 11, 582.

Kabanov, V. A., Mustafaev, M. I., Belova, V. V., Evdakov, V. P., (1978), "2 types of soluble complexes of bovine serum albumin with polyelectrolytes", *Biophysics (Moscow)*, 23, 789.

Kabanov, V.A., Zezin, A.B., Mustafaev, M.I., Kasaikin, V.A., (1980), "Polymeric Amines and Ammonium Salts", Goethals, E. J., Ed., Pergamon Press, Oxford, 173.

Kabanov, V.A., Skobeleva, V.B., Rogacheva, V.B., Zezin, A.B. (2004), "Sorption of proteins by slightly cross-linked polyelectrolyte hydrogels: Kinetics and mechanism", *J. Phys. Chem., B* 108, 1485-1490.

Koetz, J., Linow, K. J., Burkart, P., Li Ping, H. (1986), "Effects of charge density and structure of side-chain branching on the composition of polyanion-polycation complexes", *Polymer*, 27, 10, 1574.

Kokufuta, E., Shimizu, H., Nakamura, I. (1981), "Salt linkage formation of poly(diallyldimethylammonium chloride) with acidic groups in the polyion complex between human carboxyhemoglobin and potassium poly(vinyl alcohol) sulfate", *Macromolecules*, 14, 1178.

Xia, J., Dubin ve P.L., (1994), "Protein-polyelectrolyte complexes", in: *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, P. Dubin, J. Bock, R. Davis, D.N. Schulz, C. Thies, (Eds.), Springer-Verlag, London, , 247-272.

Lee, W.Y. ve Schon, H., (1977), "Abrogation of reaginic antibodies with modified allergens", *Nature*, 267, 618-9.

Lenk, T., Thies, C. (1987), In *Coulombic Interactions In Macromolecular Systems*, Eisenberg, A., Bailey, F. E., Eds., American Chemical Society, Washington, DC, 1987, Böl. 8.

Lough, W.J. ve Wainer, I.W. (1996), *High Performance Liquid Chromatography Fundemantal and Practice*, Blackie Academic & Professional, UK.

Matsudo, T., Ogawa, K., Kokufuta, E. (2003), "Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers", *Biomacromolecules*, 4, 1794-1799.

Mattison, K.W., Dubin, P.L., Brittain, I.J., (1998), "Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: effects of polymer charge density", *J. Phys. Chem.*, 102, 3830-3836.

Merle, Y. (1987), "Synthetic polyampholytes. 5. Influence of nearest-neighbor interactions on potentiometric curves", *J. Phys. Chem.*, 91, 3092-3098.

Monji, N. ve Hoffman, A.S., (1987), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14, 107. [also US patent 4780 409. October 25, 1989].

Morawetz, H.ve Hughes W.L. (1952), "The Interaction of Proteins with Synthetic

Polyelectrolytes. I. Complexing of Bovine Serum Albumin", Jr., J. Phys. Chem., 56, 64.

Mustafaev, M.I., Goncarov, V.V., Evdakov, V.P., Kabanov, V.A., (1975), "Complex formation of copolymers of 4-vinylpyridine and 4-vinyl-N-cetylpyridinium bromide copolymers with serum albumin", Dokl. Acad. Nauk SSSR, 225, 721.

Mustafaev M. I., Kabanov, V. A., Belova, V. V., Evdakov, V. P., (1978), "Soluble complexes of bovine serum albumin with linear polyelectrolytes", Mol. Biol. (Moscow), 12, 1264.

Mustafaev, M. I. ve Kabanov, V. A., (1981), "Effect of ionic strength and pH on the behaviour of bovine serum albumin complexes with poly-4-ethylpyridinium bromide in aqueous solutions", Vysokomol. Soedin. Ser. A., 23A, 2271.

Mustafaev, M.I., Babakhin, A.A., Popov, A.N., Litvinov, I.S., Merkushev, A.V., Gushin, I.S., (1990), "The effect of structural-chemical characteristics of water-soluble polyelectrolyte complexes of ovalbumin on their immunological properties", Molek. Biol. (Moscow), 24, 358.

Mustafaev, M.I. ve Saraç, A.S., (1996a), "Polyelectrolyte complexes (in immunology)" in: J. Solomone, editor. The polymeric materials encyclopedia: synthesis. properties and application. Boca Raton. FL: CRC Press Inc., p. 5771-7.

Mustafaev, M., Çirakoğlu, B., Saraç, S., Öztürk, S., Yücel, F., Bermek, E., (1996b), J. Appl. Polym. Sci., 62, 99-109.

Mustafaev, M.I., Yücel, F., Öztürk, S., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996c), "Cu²⁺ - mediated complex formation between polyacrylic acid (PAA) and Bovine serum albumin", J. Immunol. Methods, 197, 31-37.

Mustafaev, M.I., Yücel, F., Çirakoğlu, B., Bermek, E., (1996d), "Immune response to progesterone involved in Cu²⁺ - mediated polyanion-protein complex-Antigen specificity and affinity of hybridoma clones", Immunol. Lett., 52, 63-68.

Mustafaev, M. I. (1996e), Biyopolimerler, TÜBİTAK-MAM, Gebze.

Mustafaev, M.I., Mustafaeva, Z., Bermek, E., Osada, Y., J. (1998), "New Amphiphilic Immunogens by Cu²⁺ - mediated complexes of water-born Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) and Bovine Serum Albumin", Bioact. Compat. Polymers, 13, 33-49.

Mustafaev, M.I., Bayulken, S., Ergen, E., Erkol, A., Ardagil, N., (2001), "Radiation-induced formation of polyacrylic acid protein covalent conjugates", Radiation Physics and Chemistry 60 567-575.

Nguyen, T.Q. (1986), "Interactions of human hemoglobin with high-molecular-weight dextran sulfate and diethylaminoethyl dextran", Makromol. Chem., 187, 11, 2567-2578.

Park, J.M., Muhoberac, B.B., Dubin, P.L., Xia J., (1992), "Effects of Protein Charge Heterogeneity in Protein-Polyelectrolyte Complexation", Macromolecules, 25, 290-295.

Pasch, H. ve Trathnigg, B., (1999), HPLC of Polymers, Springer.

Peters, T., Jr. (1985), "Serum Albumin", Adv. Protein Chem., 37, 161-245.

Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov, A.Sh., Eivazova, E.S., (1990), "Immunogenicity and protective activity of water-soluble polymer-metal complexes of protein antigens", Dokl. Akad. Nauk SSSR (Moscow), 312, 2, 505-509.

Petrov, R. V., Mustafaev, M. I., Norimov, A. Sh., (1992) "Physicochemical Criteria for the Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes", Sov. Med. Rev. D. Immunol., Harwood Academic Publishers

GmbH, UK, pp. 1–113.

Putnam, D. ve Kopecek, J., (1995), “Polymer conjugates with anticancer activity.” in: N.A. Peppas, R.S. Langer, editors. Biopolymer II. Berlin: Springer, p. 57-123.

Radeva, T. (2001), Physical Chemistry of Polyelectrolytes, Marcel Dekker Inc., New York.

Sacco, D., Bonneaux, F., Dellacherie, E. (1988), “Interaction of haemoglobin with dextran sulphates and the oxygen-binding properties of the covalent conjugates”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 10, 305.

Selzer, T., Albeck, S., Schreiber, G. (2000), “Rational design of faster associating and tighter binding protein complexes”, *Nat. Struct. Biol.*, 7, 537-541.

Seyrek, E., Dubin, P.L., Tribet, C., Gamble, E.A., (2003), “Ionic strength dependence of protein-polyelectrolyte interactions”, *Biomacromolecules*, 4, 273-282.

Shieh, J., Glatz, C.E. (1991), *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 606.

Squire, P.G., Moser, P., O’Konski, C. T. (1968). “The hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin monomer and Dimer”, *Biochemistry* 7; 4261-4272.

Tasdelen B. ve Bayulken S., (2004), “HPLC investigation of water soluble polyacrylic acid- Cu^{2+} -protein complexes”, *Polym. Adv. Technol.*; 15: 716-719.

Thies, C. vd. (1994), *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Chapter 16.

Wright, A. K., ve Thompson, M. R., (1975), “Hydrodynamic structure of Bovine Serum Albumin determined by Transient Electric Birefringence”, *Biophys. J.* 15; 137-141

Weis, A., (1991), “Complex Coacervates Involving Protein Biopolymer Pairs”, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*, 32, 1, 596.

Yücel, F., Çırakoğlu, B., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M., (2001), “Immune response to progesterone immobilizing on Cu-induced polymer protein complexes”, *Hybridoma*, 20, 1, 11-15.

İNTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyelectrolyte>

[2] <http://www.pslc.ws/macrog/electro.htm>

[3] <http://www.friedli.com/research/PhD/bsa>

[4] www.resonancepub.com

[5] <http://www.polymersnetbase.com/pme>

[6] infohost.nmt.edu/~revans/chromatography.htm

[7] www.postech.ac.kr/chem/poly/research.htm

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 16.02.1979

Doğum yeri İstanbul

Lise 1997-1993

Bakırköy Hasan Polatkan Yabancı Dil Ağırlıklı Lise

Lisans 1998-2003

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak.
Fizik Bölümü

Yüksek Lisans 2004-2006

Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fak.
Biyomühendislik Bölümü