

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**ON-LİNE HPLC-KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM TAYİN YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE PROTEİN KARIŞIMLARINDA UYGULANMASI**

DOKTORA TEZİ

Uğur KARDİL

**MART 2022
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

ON-LİNE HPLC-KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM TAYİN YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ VE PROTEİN KARIŞIMLARINDA UYGULANMASI

UĞUR KARDİL

ORCID

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21 / 01 / 2022

Tezin Savunma Tarihi : 02 / 03 / 2022

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
ORCID :

Trabzon 2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimde olduğu gibi doktora eğitimimde de danışmanlığımı üstlenen, kendisine ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp büyük bir ilgi ve sabırla faydalı olmak adına elinden geleni yapan, ne zaman bir sorunla karşılaşsam benden yardımını ve samimiyetini esirgemeyen, akademik çalışmalarımın yanı sıra birçok yönden de danıştığım, akademik donanımı ve kişiliğiyle her zaman örnek aldığım Sayın Hocam Prof. Dr. Murat Küçük' e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda, her türlü laboratuvar imkanlarından faydalandığım KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü' ne, katkısı olan bölüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca benden dualarını ve yardımlarını esirgemeyen ve bugünlere gelmemde büyük emeği olan canım aileme tüm samimiyetimle teşekkür ederim.

Son olarak hayatıma girdiği andan beri sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren sevgili eşim Sena Kardil' e ve çalışmalarım süresince enerjisiyle bana güç veren, yolunda gitmeyen çalışmalar ve karşılaşılan problemler karşısında moralli ve keyifli kalmamı sağlayan biricik kızım Zeynep Asya' ya teşekkür ederim.

Uğur KARDİL
Trabzon 2022

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “On-line HPLC-Karbonik Anhidraz Enzim Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Protein Karışımlarında Uygulanması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat Küçük’ ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 02/03/2022

Uğur KARDİL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ...	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	XI
SUMMARY	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIII
TABLolar DİZİNİ	XX
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XXI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Protein Yapısı	2
1.3. Protein Sınıfları	4
1.4. Protein Konsantrasyon Tayin Yöntemleri.....	5
1.4.1. Kjeldahl Yöntemi	5
1.4.2. Biüret Yöntemi	5
1.4.3. Warburg Yöntemi.....	6
1.4.4. Bradford (Boya Bağlama) Yöntemi	6
1.4.5. Lowry Yöntemi	6
1.4.6. BCA (Bisinkoninik Asit) Yöntemi.....	7
1.5. Protein Ayrımı	7
1.5.1. Çözünürlük Özelliklerine Göre Protein Ayrımı	7
1.5.2. Farklı Adsorpsiyon Kapasitelerine Göre Protein Ayrımı.....	8
1.5.3. Boyut Farklarına Göre Protein Ayrımı.....	9
1.5.4. Elektriksel Yük Esasına Göre Protein Ayrımı	10
1.6. Enzimler	10
1.6.1. Esterazlar	11
1.6.2. Enzim Kataliz Mekanizmaları.....	12
1.6.3. Karbonik Anhidraz (CA).....	13
1.6.3.1. CA Sınıfları	14
1.6.3.2. CA' ların Yapısı ve Fonksiyonu.....	14
1.6.3.3. CA' lar Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar	16

1.6.3.4.	CA Aktivite Tayin Yöntemleri.....	17
1.6.3.4.1.	Esteraz Aktivitesi	18
1.6.3.4.2.	Hidrataz Aktivitesi	18
1.7.	Kromatografi	19
1.8.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	19
1.8.1.	HPLC' nin Çalışma Prensipleri, Bileşenleri ve Temel Kavramlar.....	20
1.8.1.1.	Hareketli faz	21
1.8.1.2.	Gaz Giderici (Degasser)	21
1.8.1.3.	Pompa.....	22
1.8.1.4.	Enjeksiyon Ünitesi	22
1.8.1.5.	Kolon.....	22
1.8.1.6.	Dedektör	23
1.8.2.	HPLC' nin Kullanım Alanları	24
1.8.2.1.	Protein Ayırımında HPLC	25
1.8.2.1.1.	Protein Ayırımında Kullanılan Kolonlar	26
1.8.2.1.2.	Protein Ayırımında Kullanılan Dedektörler	27
1.8.3.	On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri (BCD).....	27
1.8.3.1.	On-line HPLC-BCD Sistemleri İçin Kurulum Şemaları.....	28
1.8.3.2.	Laboratuvarımızda Geliştirilen On-line HPLC Yöntemleri	31
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	34
2.1.	Materyal	34
2.1.1.	Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	34
2.1.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
2.2.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Çalışmalar	35
2.2.1.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Spektrofotometrik Denemeler	36
2.2.1.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi.....	36
2.2.1.2.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	37
2.2.2.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Kromatografik Denemeler	38
2.2.2.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	38
2.2.2.2.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	39

2.2.2.3.	BCA Enziminin Kromatografik Ayırımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	39
2.2.2.4.	BCA Enziminin Kromatografik Aktivite Tayininde Ölçüm Dalgaboyunun Araştırılması	39
2.2.2.5.	BSA Proteininin Kromatografik Ayırımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
2.2.2.6.	Sığır Karaciğer Ekstresinin Kromatografik Ayırımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	40
2.3.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Geliştirilmesi	40
2.3.1.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Koşulları	40
2.3.2.	On-line HPLC' ye Adaptasyon Öncesi Spektrofotometrik Denemeler	41
2.3.2.1.	KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	41
2.3.2.2.	Tampon Seçiminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Yöntemle Değerlendirilmesi	42
2.3.2.3.	pH' nın Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	43
2.3.3.	On-line HPLC' ye Adaptasyon Öncesi HPLC ile FIA Modunda Denemeler	44
2.3.3.1.	HPLC Hareketli Faz Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	45
2.3.3.2.	Şırınga Pompa Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	45
2.3.4.	On-line HPLC Sistemi ile Kromatografik Denemeler	45
2.3.4.1.	Tris ve Fosfat Tamponlarının Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	45
2.3.4.2.	Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması	46
2.3.4.3.	KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kromatografik Sistemde Belirlenmesi	46
2.3.4.4.	Akış Hızı ve Enzimatik Reaksiyonun Dedeksiyon Üzerine Etkisinin Araştırılması	47
2.3.5.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi	47
2.4.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Optimizasyonu	49
2.4.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine HPLC ve Şırınga Pompa Akış Hızlarının Etkisi	49
2.4.2.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Seçiminin Etkisi	49
2.4.3.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	50
2.4.4.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi	50
2.4.5.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi	50

2.4.6.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tübing Boyunun Etkisi	51
2.4.7.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	51
2.5.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Validasyonu.	51
2.5.1.	Doğrusallık	52
2.5.2.	Doğrusal Aralık	52
2.5.3.	Tespit (LOD) Sınırı	52
2.5.4.	Tayin (LOQ) Sınırı	53
2.5.5.	Kesinlik	53
2.5.6.	Sağlamlık	54
2.6.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Protein Karışımları ve Doğal Numunelere Uygulanması	54
2.6.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi ile Belirlenmesi	54
2.6.2.	Protein İçeriği Bilinen Standart Protein Karışımlarının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması	55
2.6.3.	Protein İçeriği Bilinmeyen Bitki ve Hayvan Dokularının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması	56
2.6.4.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Pik Alanları Üzerinden Verilen Esteraz Aktivite Değerlerinin Enzim Ünitesine Dönüştürülmesi	56
3.	BULGULAR	58
3.1.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntem Geliştirme Öncesi Yapılan Çalışmalar	58
3.1.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	58
3.1.2.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	59
3.1.3.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	60
3.1.4.	BCA Enziminin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	62
3.1.5.	BCA Enziminin Kromatografik Aktivite Tayininde Ölçüm Dalgaboyunun Araştırılması	64
3.1.6.	BSA Proteininin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	64
3.1.7.	Sığır Karaciğer Ekstresinin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi	65
3.2.	Geliştirilen On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi	66

3.2.1.	KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	66
3.2.2.	Tampon Seçiminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Yöntemle Değerlendirilmesi	68
3.2.3.	pH' nın Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi	69
3.2.4.	HPLC Hareketli Faz Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	72
3.2.5.	Şırınga Pompa Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi	73
3.2.6.	Tris ve Fosfat Tamponlarının Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırma	74
3.2.7.	Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisi	75
3.2.8.	KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kromatografik Sistemde Belirlenmesi	76
3.2.9.	Akış Hızı ve Enzimatik Reaksiyonun Dedeksiyon Üzerine Etkisinin Araştırılması	77
3.3.	Optimizasyonu Yapılan On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Bulguları	79
3.3.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine HPLC ve Şırınga Pompa Akış Hızlarının Etkisi	79
3.3.2.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Seçiminin Etkisi	82
3.3.3.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi	85
3.3.4.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi	87
3.3.5.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi	89
3.3.6.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tübing Boyunun Etkisi	92
3.3.7.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	94
3.4.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Validasyon Çalışmaları	97
3.4.1.	Doğrusallık	97
3.4.2.	Doğrusal Aralık	98
3.4.3.	Tespit (LOD) Sınırı	99
3.4.4.	Tayin (LOQ) Sınırı	100
3.4.5.	Kesinlik	101
3.4.6.	Sağlamlık	102
3.5.	Protein Karışımları ve Doğal Numunelere Uygulanan On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Bulguları	104

3.5.1.	BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC ₅₀ Değerinin On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi ile Belirlenmesi	104
3.5.2.	Protein İçeriği Bilinen Standart Protein Karışımlarının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması	106
3.5.3.	Protein İçeriği Bilinmeyen Bitki ve Hayvan Dokularının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması.	114
3.5.4.	On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Pik Alanları Üzerinden Verilen Esteraz Aktivite Değerlerinin Enzim Ünitesine Dönüştürülmesi	116
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	118
5.	ÖNERİLER	128
6.	KAYNAKLAR.....	129
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

ON-LİNE HPLC-KARBONİK ANHİDRAZ ENZİM TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE PROTEİN KARIŞIMLARINDA UYGULANMASI

Uğur KARDİL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2022, 133 Sayfa, 1 Sayfa Ek

Aktif proteinlerin karmaşık numunelerden saflaştırılıp ayrılması işlemi oldukça zahmetli ve zaman alan bir süreci içermektedir. Giderek yaygınlaşan on-line HPLC uygulamaları, doğal biyoaktif bileşenlerin tespiti için önemli avantajlar sunmaktadır. Bu çalışmada protein karışımlarında esteraz aktivitesi gösteren proteinlerin on-line olarak belirlenip eş zamanlı karbonik anhidraz enzim tayininin yapılabildiği on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntem, akış hızları, tampon çözelti seçimi, konsantrasyonu ve pH' sı, reaksiyon sıcaklığı, tübing boyu ve substrat konsantrasyonu parametreleri üzerinden optimize edilmiştir. pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu 0,5 mL/dk akış hızı ile, 5 mM *p*-nitrofenil asetat 0,3 mL/dk akış hızı ile sisteme gönderilip 210 nm' de protein ayrımı, 400 nm' de esteraz aktivitesi tespitinin 25 °C sıcaklıkta ve 3 m tübing boyunda yapılmasıyla optimum çalışma şartlarına ulaşılmıştır. Optimize edilmiş on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, doğrusalılık, doğrusal aralık, tespit (LOD) sınırı, tayin (LOQ) sınırı, kesinlik ve sağlamlık parametreleri üzerinden valide edilmiştir. Yöntemin, 5 mg/mL BCA seviyelerine kadar doğrusal seyrettiği, LOD' un 0,03 mg/mL ve LOQ' un 0,07 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bakımından %1 altındaki bağıl standart sapma yöntemin kesinliğini, akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve konsantrasyonunda yapılan küçük değişiklikler sonucunda %5 altındaki bağıl hata ise yöntemin sağlamlığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar, geliştirilen yöntemin protein içeriği bilinen ve bilinmeyen tüm çözeltilere rahatlıkla uygulanabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: On-line HPLC, CA, Esteraz aktivitesi, Sülfanilamid, Doku ekstresi

PhD. Thesis

SUMMARY

DEVELOPMENT OF ON-LINE HPLC-CARBONIC ANHYDRASE ENZYME DETERMINATION METHOD AND ITS APPLICATION IN PROTEIN MIXTURE

Uğur KARDİL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2022, 133 Pages, 1 Page Appendix

The purification and separation of active proteins from complex samples is a very laborious and time-consuming process. On-line HPLC applications becoming increasingly widespread offer significant advantages for the detection of natural bioactive compounds. In this study, an on-line HPLC-CA enzyme determination method was developed, which enables the on-line determination of proteins with esterase activity in protein mixtures and the simultaneous determination of carbonic anhydrase enzyme. The developed method was optimized over the parameters of flow rates, buffer solution selection, concentration and pH, reaction temperature, tubing length and substrate concentration. The optimum working conditions were obtained by pumping 0.15 M phosphate buffer with a pH of 8.2 to the system at a flow rate of 0.5 mL/min, and injecting 5 mM *p*-nitrophenyl acetate with a flow rate of 0.3 mL/min, to achieve protein separation detected at 210 nm and esterase activity at 400 nm at 25 °C with 3 m tubing length. The optimized on-line HPLC-CA enzyme determination method has been validated on linearity, linear range, LOD, LOQ, precision, and robustness. It was determined that the method was linear up to 5 mg/mL BCA levels, the LOD was 0.03 mg/mL, and the LOQ was 0.07 mg/mL. The relative standard deviation below 1% revealed the precision of the method, the relative error of less than 5% as a result of small changes in the flow rate, reaction temperature, pH and concentration of the mobile phase demonstrated the robustness of the method. Studies have shown that the developed method can be easily applied to all solutions with known and unknown protein content.

Key Words: On-line HPLC, CA, Esterase activity, Sulfanilamide, Tissue extract

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Temel esteraz hidroliz reaksiyonu	12
Şekil 2.	Farklı sınıf CA' ların aktif bölge yapıları	15
Şekil 3.	Esteraz aktivitesine sahip karbonik anhidraz enzimi aracılığıyla <i>p</i> -nitrofenil asetatın <i>p</i> -nitrofenole dönüşüm reaksiyonu	18
Şekil 4.	HPLC sisteminin şematik gösterimi	21
Şekil 5.	HPLC-BCD sistemleri için temel kurulum şeması	29
Şekil 6.	EAD ve RAD yöntemleri için homojen kurulum şeması	29
Şekil 7.	HPLC-BCD sistemleri için heterojen kurulum şeması	30
Şekil 8.	Metabolit görüntüleme yöntemlerinde kullanılan kurulum şeması	30
Şekil 9.	On-line HPLC-FRAP antioksidan aktivite tayin yöntemine ait kurulum şeması	31
Şekil 10.	HPLC ile proteinlerin ayrılmasında deteksiyon amaçlı geliştirilen on-line yönteme ait kurulum şeması	32
Şekil 11.	Geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemine (RP-HPLC-DAD-UV) ait kurulum şeması.....	33
Şekil 12.	Geliştirilen on-line HPLC-Karbonik anhidraz enzim tayin yöntemi sistemi.....	48
Şekil 13.	Bitki ve hayvan dokularının ekstraksiyon aşamaları	56
Şekil 14.	BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı sülfanilamid konsantrasyonu ile IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği	58
Şekil 15.	BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı asetazolamid konsantrasyonu ile IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği	59
Şekil 16.	Farklı konsantrasyonlardaki (2; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL) BCA enziminin HPLC ile akış enjeksiyon analizi (FIA) modunda 348 nm dalga boyunda verdiği kromatogram.....	60
Şekil 17.	1 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 348 nm dalga boyunda elde edilen üç paralel aktivite pikini gösteren kromatogram.....	61
Şekil 18.	1 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (2, 4, 6, 8, 10, 15 ve 20 µM sülfanilamid) inhibitör içeren substrat çözeltisiyle reaksiyonu sonucu 348 nm dalga boyunda elde edilen aktivite pikleri	61
Şekil 19.	HPLC ile akış enjeksiyon analizi (FIA) modunda 348 nm dalga boyunda esteraz aktivite tayin metoduyla CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC ₅₀ değerinin bulunması adına çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği.....	62

Şekil 20. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile gönderilen substrat, saf su ve inhibitör içeren substrat çözeltilerinin 348 nm dalga boyunda verdiği aktivite piklerine ait kromatogramlar	63
Şekil 21. 5 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyundaki kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivite piki	63
Şekil 22. 5 mg/mL konsantrasyonlu BCA enziminin farklı dalga boylarında (348 ve 400 nm) verdiği esteraz aktivite pikleri	64
Şekil 23. 5 mg/mL BSA proteininin 230 nm dalga boyundaki kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivite kromatogramı	65
Şekil 24. Sığır karaciğer ekstresinin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivite tespiti	66
Şekil 25. Esteraz aktivite metodu ile çalışılan 5 farklı KCl konsantrasyonunda (0,40; 0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M) % Aktivite grafiği	67
Şekil 26. 0,2 M KCl' nin, pH' sı 7,4 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO ₄ ve fosfat tamponları ile spektrofotometrik olarak tespit edilen esteraz aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 27. 0,2 M KCl' nin, pH' sı 8,2 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO ₄ ve fosfat tamponları ile spektrofotometrik olarak tespit edilen esteraz aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 28. Farklı konsantrasyonlu (0,05; 0,10; 0,20 ve 0,30 M) farklı tamponların (Tris-SO ₄ , Fosfat, Asetat) esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerinin 348 nm dalga boyunda in vitro olarak spektrofotometrik sonuçları.....	69
Şekil 29. pH' sı 7,4 ve 8,2 olan 0,05 ve 0,1 M Tris ve fosfat tamponlarının esteraz aktivitesi üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak tespiti.....	70
Şekil 30. Esteraz aktivitesinde reaksiyon, pH' sı 7 olan 50 mM Tris-SO ₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH' sı 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan 0,5 M konsantrasyonlu ikinci bir Tris-SO ₄ tamponu ile ortam pH' sı değiştirilerek 348 ve 400 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri	71
Şekil 31. Esteraz aktivitesinde reaksiyon pH' sı 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 olan 20 mM Tris-SO ₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH' sı 8 olan 1 M konsantrasyonlu ikinci bir Tris-SO ₄ tamponu ile ortam pH' sı değiştirilerek 348 ve 400 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri	71
Şekil 32. FIA modunda 1 mg/mL BCA enzimi ile şırınga pompanın akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup HPLC pompa akış hızı arttırıldığında (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk) belirlenen esteraz aktivite piklerine ait kromatogram ve esteraz aktivitesine ait pik alanlarının korelasyon grafiği	72
Şekil 33. FIA modunda 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC pompa akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup şırınga pompanın akış hızı arttırıldığında (0,1; 0,2; 0,3 ve 0,4 mL/dk) belirlenen esteraz aktivite piklerine ait kromatogram ve esteraz aktivitesine ait pik alanlarının korelasyon grafiği	73
Şekil 34. pH' sı 8,3 olan 0,1 M Tris-SO ₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile ayrımı yapılan 5 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti	74

Şekil 35. pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile ayrımı yapılan 1 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti.....	75
Şekil 36. pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz sistemi ile ayrımı yapılan 1 mg/mL BCA enziminin 3 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat ve 5 mM <i>p</i> -nitrofenil asetat ile 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti.....	76
Şekil 37. Akış hızı 1 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,15 M Tris-SO ₄ tamponu ve aynı tamponun 0,1 M KCl içeren kompozisyonundan oluşan hareketli faz ile 5 mg/mL BCA enziminin esteraz aktivitesinin 348 nm dalga boyunda takibi.....	77
Şekil 38. Farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk), 400 nm dalda boyunda bozulmuş substratın verdiği pik alanları ve 1 mg/ml BCA enziminin verdiği aktivite piklerine ait pik alanları	79
Şekil 39. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği.....	80
Şekil 40. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	80
Şekil 41. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar	81
Şekil 42. 1 mg/mL BCA enzimi ile 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,4 mL/dk şırınga pompa akış hızında 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	81
Şekil 43. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tamponların farklı konsantrasyonlarında 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği.....	82
Şekil 44. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tamponların farklı konsantrasyonlarında 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	83
Şekil 45. Farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponu (0,05; 0,10; 0,15 ve 0,20 M) ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar.....	83
Şekil 46. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	84
Şekil 47. Farklı konsantrasyonlardaki Tris-SO ₄ tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar	84
Şekil 48. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,05 M Tris-SO ₄ tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm	

dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar.....	85
Şekil 49. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tampon konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği.....	86
Şekil 50. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tampon konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	86
Şekil 51. 1 mg/mL BCA enziminin farklı pH' ya sahip tampon çözeltileri kullanılarak 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği.....	87
Şekil 52. 1 mg/mL BCA enziminin farklı pH' ya sahip tampon çözeltileri kullanılarak 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	88
Şekil 53. Farklı pH değerlerine sahip 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar	88
Şekil 54. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	89
Şekil 55. 1 mg/ml BCA enziminin farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği.....	90
Şekil 56. 1 mg/ml BCA enziminin farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	90
Şekil 57. Farklı sıcaklık değerlerine sahip pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar.....	91
Şekil 58. 1 mg/mL BCA enzimi ile 45 °C sıcaklığında gerçekleşen reaksiyon sonucu 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	91
Şekil 59. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tübing boyunda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği	92
Şekil 60. 1 mg/mL BCA enzimi ile 45 °C sıcaklığında gerçekleşen reaksiyon sonucu 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	93
Şekil 61. Farklı tübing boylarında pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar.....	93

Şekil 62. 1 mg/mL BCA enzimi ile 2 m tübing boyu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	94
Şekil 63. 1 mg/mL BCA enziminin farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği	95
Şekil 64. 1 mg/mL BCA enziminin farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalda boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği	95
Şekil 65. Farklı substrat konsantrasyonunda pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar.....	96
Şekil 66. 1 mg/mL BCA enzimi ile 5 mM substrat konsantrasyonunda 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	96
Şekil 67. Farklı konsantrasyonlu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) BCA enzimi ile 5 mM konsantrasyonlu substratın 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar	97
Şekil 68. Farklı konsantrasyonlu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) BCA enzimi ile 5 mM konsantrasyonlu substrat çözeltisinin 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivitesinden sorumlu piklerin alanlarının verdiği korelasyon grafiği.....	98
Şekil 69. Çalışma aralığı, tespit (LOD) sınırı, tayin (LOQ) sınırı ve doğrusallık sınırının gösterildiği grafik	99
Şekil 70. 2 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (18,75; 9,37; 6; 3 ve 1 µM sülfanilamid) inhibitör çözeltisi içeren substratla reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen aktivite piklerine ait kromatogramlar.....	105
Şekil 71. On-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi ile 400 nm dalga boyunda CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC ₅₀ değerinin 2,1 µM bulunması adına çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği.....	105
Şekil 72. 2 mg/mL Esteraz X enziminin 210 nm de kromatografik ayırımı ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar	107
Şekil 73. 2 mg/mL BCA enziminin 210 nm de kromatografik ayırımı ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar.....	107
Şekil 74. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzim çözeltilerinin ve bu enzimlerin inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler	108

Şekil 75. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzim çözeltilerinin ve bu enzimlerin inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler	108
Şekil 76. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilerinin 210 nm de kromatografik ayırımı ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar ..	109
Şekil 77. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler	109
Şekil 78. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler	110
Şekil 79. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzimlerinin ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilisinin 210 nm de kromatografik ayırımı ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarının bireysel ve birlikte verdiği sinyaller	110
Şekil 80. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler.....	111
Şekil 81. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler.....	111
Şekil 82. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının ve bu karışımın inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler	112
Şekil 83. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzimlerinin ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilisinin 210 nm de kromatografik ayırımı ve inhibitör içermeyen substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarının bireysel ve birlikte verdiği sinyaller.....	112
Şekil 84. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilisinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler	113
Şekil 85. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilisinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler	113
Şekil 86. Ispanak ekstresinin 210 nm' de kromatografik ayırımı ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar	114

Şekil 87. Brokoli ekstresinin 210 nm’ de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar.....	115
Şekil 88. Kereviz ekstresinin 210 nm’ de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar.....	115
Şekil 89. Sığır karaciğer ekstresinin 210 nm’ de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar	115
Şekil 90. 0,2 mg/mL BCA enziminin 400 nm de spektrofotometrik ve kromatografik esteraz aktivitesinin zamana bağlı değişimini gösteren grafikler	117
Şekil 91. <i>p</i> -Nitrofenolün farklı pH değerlerindeki UV-Vis absorpsiyon spektrumu	121

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Enzim sınıfları.....	11
Tablo 2. CA' lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar	16
Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları	34
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları	35
Tablo 5. Esteraz aktivitesi tayini için 2 mL' lik kuvars küvetlerde kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin reaksiyon ortamına katılım sıraları	36
Tablo 6. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları	37
Tablo 7. Esteraz aktivitesi üzerine KCl inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları	42
Tablo 8. Tampon seçiminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları	42
Tablo 9. Esteraz aktivitesi üzerine reaksiyon sonrası pH değişim etkisinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler.....	44
Tablo 10. Esteraz aktivitesi üzerine reaksiyon sonrası pH değişim etkisinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler.....	44
Tablo 11. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine sülfanilamid inhibisyon etkisinin kromatografik olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve akış hızları	55
Tablo 12. 0,2 mg/mL BCA enzimi ile elde edilen LOD verileri.....	100
Tablo 13. 0,2 mg/mL BCA enzimi ile elde edilen LOQ verileri.....	101
Tablo 14. 0,2 ve 4 mg/mL BCA enzimlerinin aktivite pik alanları üzerinden tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) sonuçları	102
Tablo 15. 0,2 ve 4 mg/mL BCA enzimlerinin aktivite pik alanları üzerinden ara kesinlik (günler arası kesinlik) sonuçları	102
Tablo 16. Akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve hareketli fazın konsantrasyonu üzerindeki küçük değişimlerle elde edilen sağlamlık sonuçları.....	103

SEMBOLLER DİZİNİ

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
AChE	Asetilkolinesteraz
BCA	Sığır Karbonik Anhidraz
BCD	Biyokimyasal Deteksiyon
BSA	Sığır Serum Albümin
C ₁₈	Oktadesil
CA	Karbonik Anhidraz
Zn ⁺²	Çinko (II) iyonu
DAD	Çoklu Diyot Serili Dedektör (diode array dedector)
dk	Dakika
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EAD	Enzim Afinite Deteksiyonu
E.Ü.	Enzim Ünitesi
FIA	Akış Enjeksiyonu Analizi
FRAP	Demir (III) İndirgeme Antioksidan Güç
hCA-I	İnsan Karbonik Anhidraz-I
hCA-II	İnsan Karbonik Anhidraz-II
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
IC ₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
kDa	Kilodalton
M	Molar
MeOH	Metanol
m	Metre
MS	Kütle Spektrometri Dedektörü
Me ²⁺	Metal (II) iyonu
mg	Miligram

mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
p-	para (-R grubunun 1,4 bağlanma pozisyonu)
PDA	Fotodiyot Array Dedektör
RAD	Reseptör Afinite Deteksiyonu
RID	Refraktif İndeks Dedektör
RP	Ters faz (reverse phase)
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
TOF	Uçuş zamanlı (Time of Flight)
Tris	Trihidroksimetil amino metan
U	Enzim ünitesi
UV	Ultraviyole
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
vd.	ve diğerleri
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Karbonik anhidraz (CA, EC: 4.2.1.1), karbondioksit (CO_2) ve bikarbonat iyonu (HCO_3^-) arasındaki karşılıklı dönüşümü katalizleyen bir metaloenzimdir (Supuran ve Scozzafava, 2001).

Karbonik anhidrazlar, çeşitli nedenlerden dolayı kapsamlı olarak araştırılan birçok enzim arasında özel bir yere sahiptirler. Karbonik anhidrazlar;

- Arkea, bakteri ve ökaryot gibi üç yaşam alanının bütün gruplarında bulunmaktadır.
- Karbondioksit ve bikarbonat iyonu arasındaki karşılıklı dönüşümden oluşan fizyolojik reaksiyonu katalizlemektedirler. CA bulunan bütün organizmaların fizyolojik fonksiyonları için gerekli olan bu reaksiyon, CO_2 'nin dokular ve atılım bölgeleri arasında solunumu ve taşınması, çeşitli doku ve organlarda elektrolitlerin salgılanması, pH düzenlenmesi ve homeostaz, kalsifikasyon, kemik rezorpsiyonu, tümörijenite (omurgalılarda), CO_2 fiksasyonu (yosun ve yeşil bitkiler için) ve glukoneogenez, lipogenez, üregenez gibi çeşitli metabolik biyosentetik yollar için kritik öneme sahiptir.
- İnhibisyon ve aktivasyon mekanizmaları ile çeşitli bozuklukların tedavisinde veya önlenmesinde klinik olarak kullanılabilmektedirler (Pastarekova vd., 2004).

Yaşamın kilit bir unsuru olan karbon atomu, aynı zamanda tüm biyoorganik bileşiklerin temelini oluşturmaktadır. CA'ların geniş yayılımı da substratlarının karbon temelli olması sebebi ile açıklanmaktadır (Kupriyanova vd., 2017). Geniş yayılımına ve çeşitliliğine rağmen bütün CA'ların aynı reaksiyonunu ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ karşılıklı dönüşümü) katalizlemesi karbon temelli yaşamın evrensel bir enzimi olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda, bir hücre sistemi içinde bulunan çok sayıda bileşeni tanımlayabilen, miktarını belirleyebilen ve aktivite tespiti yapabilen teknolojiler geliştirmek için artan bir çaba oluşmuştur. Analiz edilen karışımların karmaşıklığı, etkili bir ayırma ve aktivite tespiti için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Yüksek performanslı

sıvı kromatografisi (HPLC) ve bağılı bulunduğu on-line sistemler ayırım ve eş zamanlı aktivite tespiti adına giderek daha da yaygınlaşmaktadır.

Aktif proteinlerin karmaşık numunelerden saflaştırılıp ayrılması işlemi klasik protein saflaştırma ve sonrası aktivite çalışmalarında oldukça zahmetli ve zaman alan bir süreci içermektedir. Karışımdaki bileşenlerin ayrılması işleminin oldukça hızlı ve kolay olması geliştirilen on-line HPLC-CA enzim tayin yönteminin en önemli avantajlarından bir tanesidir. Diğer kromatografik yöntemlerle uzun süren ayırıştırma ve aktivite belirleme işlemleri geliştirilen bu yöntemle birlikte çok kısa sürelerde tamamlanabilecektir. Yüksek çözünürlük, yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik, yüksek kesinlik ve otomasyon gibi özelliklere sahip olan bu yöntem ayrılmış olan proteinlerde esteraz aktivitesi üzerinden CA enziminin tespiti için önemli bir avantaj sağlayacaktır.

Yeni geliştirilen bu sistem protein içeriği bilinen standart protein karışımları veya protein içeriği bilinmeyen çeşitli bitki ve hayvan dokularına rahatlıkla uygulanabilecektir. Böylelikle tüm protein karışımlarında esteraz aktivitesi gösteren proteinlerin on-line olarak belirlenip eş zamanlı karbonik anhidraz enzim tayininin yapılabildiği bir metodoloji literatüre kazandırılmış olacaktır.

On-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi aynı zamanda bitki, hayvan, insan dokuları ve mikroorganizmalar gibi yaşam alanının bütün gruplarında CA tespitine hızlı ve kolay analiz imkanı veren önemli bir sistem olacaktır.

1.2. Protein Yapısı

Canlı sistemlerin en önemli bileşenlerinden olan proteinler hücre yapılarının da en bol bulunan organik bileşikleridir. Proteinler, bir amit bağı (peptit bağı) ile kovalent olarak bağlanmış monomerik birimlerden (L-amino asitler) oluşan biyopolimerler olup, içermiş oldukları peptit bağlarından dolayı polipeptitler olarak da adlandırılmaktadırlar.

Doğal olarak oluşan 20 α -amino asit proteinlerde ortak olarak bulunur. α -amino asitler, α karbon atomuna bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$), bir hidrojen atomu ($-\text{H}$) ve bir yan grubun ($-\text{R}$) bağlanmasıyla oluşan yapılardır. Amino asitlerin kimyasal özellikleri değişen yan zincirlerin yapısına göre farklılık gösterir.

Organizmanın temel parçası olan proteinler neredeyse bütün biyolojik süreçlere katılırlar. Taşıma ve depolama, mekanik hareket, mekanik destek, koruma, enzimatik katalizleme, sinir iletimi, hormonlar, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi birçok süreçte

yer alırlar. Proteinlerin bu biyolojik işlevlerini yerine getirebilmeleri, kararlı yapıyı oluşturan tüm etkileşimlerinin eksiksiz olmasına bağlıdır.

Proteinlerin birincil yapısı, polipeptit zincirini oluşturan amino asit kalıntılarının kovalent bağlarla birbirine bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Bu bağlanma bir polipeptidin amino ucundan karboksil ucuna doğru zinciri oluşturan amino asitlerin sırasıyla birbirine peptit bağları ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Proteinlerin birincil yapısı, peptit bağı başta olmak üzere polipeptitteki disülfür köprüleri de dahil bütün kovalent bağları kapsamaktadır. Amino asitlerin sırası, proteinlerin aktif yapı almak üzere katlanarak biyolojik işlevlerini yerine getirmesini sağladığından birincil yapı adına oldukça önemlidir.

Proteinlerin ikincil yapısı, düzenli katlanmayı kararlı kılmak üzere bir kalıntının karbonil oksijen atomu ile bir diğer kalıntının amino azot atomu arasında hidrojen bağı oluşturur. Protein omurgasında bulunan amino ve karboksil grupları arasındaki hidrojen bağlarının kalıpları ikincil yapıyı tanımlar. Bu yapı birimleri sarmal ve tabaka benzeri yapılar olup α -sarmal (α -heliks) ve β -tabaka olarak bilinirler. Bu yapılar proteinlerdeki en önemli ikincil yapı elemanlarıdır. α -sarmal yapıda polipeptit omurgası, sarmalın ortasında uçtan uca uzunlamasına çizilen hayali bir eksen etrafına sıkıca sarmalanmıştır ve amino asit kalıntılarının R grupları sarmal omurgasından dışarı doğru yönelmişlerdir. β -tabaka yapıda ise hidrojen bağı etkileşimleri karşılıklı olarak uzayan bir veya daha fazla polipeptit zinciri arasında gerçekleşmektedir.

Proteinlerin üçüncül yapısı, yapıyı oluşturan bütün atomların aktif düzeninin yanı sıra amino asitlerin yan zincirlerindeki atomlar ve prostetik grup olarak adlandırılan kovalent bağlı yapılarda bulunan atomlar arasındaki etkileşimleri de içerir. Bu yapılar polipeptit zincirinde farklı bölgelerde bulunan amino asit birimlerinin yan zincirlerindeki gruplar arasındaki etkileşimlerle birlikte çeşitli ikincil yapıların katlanması sonucu ortaya çıkan üç boyutlu yapılardır. Proteinlerin üçüncül yapısında belli bir düzen ve şekil bulunmamaktadır.

Proteinlerin dördüncül yapısına, birden fazla polipeptit zincirine sahip proteinlerde rastlanmaktadır. Her birine alt birim adı verilen birden fazla polipeptit zincirine sahip çok sayıda protein bulunmaktadır. Birbirine benzeyen veya benzemeyen alt birimlere sahip polipeptit zincirleri birbirleriyle kovalent olmayan etkileşimler yaparak proteinlerin dördüncül yapılarını oluştururlar. Bu etkileşimlerin sonucu olarak dördüncül yapı bir proteinin herhangi bir bölgesinde meydana gelen yapısal değişimler farklı bir bölgenin özelliğinde de önemli bir değişikliğe sebep olabilmektedir. Bu durum da enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde yapısal bir düzen sağlamaktadır. Bu özelliği gösteren

proteinler allosterik olarak tanımlanmaktadır. Fakat dördüncül yapı tüm proteinlerin allosterizm göstermesi gibi bir kural da bulunmamaktadır.

1.3. Protein Sınıfları

Proteinler, aminoasitlerin peptit bağları ile oluşturduğu uzun zincirli polimerik yapılardır. Polipeptit zincirleri, her protein için amino asit sırasına göre katlanır ve kendi yapısına göre şekil alır. Bu katlanma sırasında polipeptidin şekli ve fiziksel özellikleri protein yapılarına belirli biyokimyasal özellikler kazandırır. Bu özellikler, protein yapılarının fonksiyonlarına, büyüklüklerine, konformasyonlarına ve bileşimlerine göre farklı sınıflara ayrılmasına sebep olur.

Proteinler, yapı, taşıma, depo, savunma, kataliz, kasılma, büyüme ve sinyal iletimi işlemleri gibi birçok fonksiyona sahiptir. Yapısal proteinler, hücre ve organlarda yapısal ve mekanik destek sağlar. Taşıyıcı proteinler, çok sayıda küçük molekül ve iyonun taşınmasında görev alır. Depo proteinleri, metabolitlerin taşınmasından sorumludur. Savunma proteinleri, organizmayı dış faktörlerden gelebilecek tehditlere karşı korur. Katalitik proteinler, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonların hızlanmasından sorumlu biyolojik katalizörlerdir. Kasılma proteinleri, hücrenin şeklinin değiştirilmesinde görev alır. Büyüme proteinleri, büyüme ve gelişme işlemlerinde rol alır. Sinyal iletim proteinleri ise sinir hücrelerinin belirli sinyallere karşı cevap vermesine yardımcı olurlar.

Proteinler, hacimlerine ve büyüklüklerine göre farklılık gösterirler. Hücrelerde farklı molekül ağırlığına sahip çeşitli protein yapıları mevcuttur. Polipeptit zincirinin uzaması ve sayısının artması protein yapısının yüksek molekül ağırlığına sahip olmasına sebep olur.

Konformasyonlarına göre proteinleri küresel ve lifli olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Küresel proteinler, polipeptit zincirinin üst üste katlanması sonucu oluşur. Organizmaların en bol proteinleri küresel yapılı olup hücre içerisinde birçok kimyasal süreçte katılırlar. Lifli proteinler, polipeptit zincirinin paralel düzenlenmesi sonucu oluşan uzun lif yapılarıdır. Bu proteinler, yapısal fonksiyonları sayesinde çeşitli lifli yapıları oluştururlar.

Kimyasal bileşenlerine göre proteinler basit ve bileşik olmak üzere iki gruba ayrılır. Basit yapılı proteinler, yapılarında sadece α -amino asitleri bulunduran proteinlerdir. Basit proteinler amino asitler dışında herhangi bir bileşene ihtiyaç duymazlar. Bileşik yapılı proteinlerin yapısında protein olmayan gruplar da bulunabilir. Protein yapısında olmayan bu

bileşenler, polipeptid zincirine kovalent bağ ile bağlı olup prostetik grup adını alırlar (Keha ve Küvrevioğlu, 2010).

1.4. Protein Konsantrasyon Tayin Yöntemleri

Toplam protein konsantrasyonunun belirlenmesi adına yaygın olarak kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Kjeldahl, Biüret, Warburg, Bradford (CBB G-250 boya bağlama), Lowry ve BCA (bisinkoninik asit) yöntemleri yaygın olarak kullanılırken, kantitatif amino analizi ve diğer çeşitli boya bağlama yöntemleri daha az tercih edilen yöntemlerdendir (Sapan ve Lundblad, 2015).

1.4.1. Kjeldahl Yöntemi

Kjeldahl yöntemi, azot ihtiva eden birçok biyomoleküle uygulanan bir yöntemdir. Biyomateryal yapısında bulunan azot, derişik sülfürik asit ve katalizörlerle reaksiyona sokularak amonyum sülfata dönüştürülür. Daha sonra eklenen sodyum hidroksit çözeltisiyle serbest hale geçen amonyak, ayarlı bir asit çözeltisi ile muamele edilir. Nötralleşme reaksiyonu sonucunda arta kalan asit, indikatör varlığında ayarlı NaOH ile titre edilerek proteinlerdeki azot oranından (% 16) hareketle protein miktarı belirlenir (Jung vd., 2003).

Bu yöntem toplam organik azot miktarını ölçen oldukça eski bir yöntemdir. Zamanla değişime uğrayarak daha kullanışlı duruma getirilen bu yöntem diğer yöntemler kadar hassas değildir. Protein dışında başka azot kaynağı bulunan ortamlarda proteinler çöktürüldükten sonra tayin yapılmalıdır. Ayrıca bu yöntem atık oluşturması, insan sağlığı için risk oluşturması, uzun analiz süresi ve yüksek hata kaynağına sahip olması gibi dezavantajlara sahiptir.

1.4.2. Biüret Yöntemi

Biüret yöntemi, reaksiyon ortamında mevcut olan bakır iyonlarının (Cu^{2+}) protein yapısında bulunan peptit azotları ile kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan mor renkli kompleks 540-560 nm dalga boylarında maksimum absorbands vermektedir.

Duyarlılığı düşük olan bu yöntem pratik olması sebebi ile yaygın olarak kullanılsa da, miktar tayini 0,25-200 mg aralığında protein içeriğine sahip örnekler üzerinde yapılabilir.

1.4.3. Warburg Yöntemi

Tirozinin yapısında bulunan fenolik grup, triptofanın yapısında bulunan indolik grup ve daha az miktarda fenilalanin ve sistin içeriğinin 280 nm dalga boyunda maksimum absorptans vermesi esastan yararlanılarak protein miktarı belirlenir. Hassasiyeti yüksek olmayan bu yöntem kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi sebebiyle sıklıkla tercih edilir (Warburg ve Christian, 1941). 260 nm dalga boyunda maksimum absorptans gösteren nükleik asitlerin proteinlerle girişim yapması bu yöntemin önemli dezavantajlarındanır. Protein çözeltisinin saflık derecesi arttıkça yöntemin verdiği sonuçların doğruluğu da artmaktadır.

1.4.4. Bradford (Boya Bağlama) Yöntemi

Yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlu protein çözeltilerinde farklı şiddette mavi renk oluşturması ve proteine bağlanma üzerinden metakromatik kayma oluşumu esasına dayanır (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının asidik ortamda proteine bağlanması sonucu maksimum absorptansı 465 nm' den 595 nm' ye kayar. Diğer yöntemlere göre oldukça duyarlı olan bu yöntem kısa sürede sonuç vermesi açısından da üstünlük sağlar.

1.4.5. Lowry Yöntemi

Lowry yöntemi, protein analizlerinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Yöntem, alkali koşullar altında bakır iyonlarının (Cu^{2+}) protein yapısındaki peptit bağları ile kompleks oluşturması ve daha sonra da proteinde mevcut olan tirozin ve triptofan birimlerinin folin reaktifini (fosfomolibtik-fosfotungustik reaktifi) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan mavi renkli kompleks 600-800 nm aralığında maksimum absorptans verir.

1.4.6. BCA (Bisinkoninik Asit) Yöntemi

Lowry yönteminden daha az karmaşık ve hassas olan BCA yönteminde reaktif olarak bisinkoninik asit (BCA) kullanılır. Yöntem, alkali koşullar altında proteinin Cu^{2+} iyonları ile reaksiyonu ile üretilen Cu^+ iyonlarının BCA ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleksin 562 nm' de spektrofotometrik ölçümü esasına dayanır. Lowry yöntemi ile benzer bir prensibi kullanan ve benzer bir lineer aralığa sahip olan BCA yöntemi protein kalitesine bağlı olarak biraz daha farklı sonuçlar verir.

1.5. Protein Ayrımı

1.5.1. Çözünürlük Özelliklerine Göre Protein Ayrımı

Proteinler, çözünürlüklerindeki farklılıklardan yararlanılarak ayrılabilir. Amino asit dizileri, proteinlerin boyutuna, şekline, hidrofobikliğine ve elektrik yüküne etki ettiği için çözünürlüğünü belirler. Proteinlerin çözünürlüğü, genel olarak pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu özellikler dikkate alınarak proteinlerin ayırma işlemleri gerçekleştirilebilir.

- İzoelektrik çökeltme: Bir proteinin izoelektrik noktası (pI), protein üzerindeki net yükün sıfır olduğu pH değeridir. İzoelektrik noktada, proteinleri ayrı tutan bir elektrostatik itme olmadığı için bir araya gelme ve çökeltme eğiliminde olurlar. Çoğu küresel proteinin çözünürlüğü pH tarafından etkilenir. Proteinler, farklı amino asit dizileri nedeniyle farklı izoelektrik noktalarına sahip oldukları için çözeltinin pH' ı ayarlanarak ayrımları gerçekleştirilir. pH, belirli bir proteinin izoelektrik noktasına ayarlandığında, o protein diğer proteinlerden ayrılarak çöker. Çöken proteinler konformasyonlarını koruyarak uygun pH değerli bir ortamda tekrardan çözelti ortamına alınır.

- Nötral tuzlarla çöktürme: Nötral tuzlar, düşük konsantrasyonlarda protein moleküllerinin çözünürlüğünü artırır. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve MgCl_2 gibi tuzlar suda çözünürlüğü yüksek olduğu için yaygın olarak kullanılsa da NaCl , NH_4Cl ve KCl gibi diğer nötral tuzlar da kullanılabilir. Fakat iki değerlikli iyonlu tuzlar tek değerlikli tuzlardan daha etkilidir. Nötral tuzların bu özellikleri onların iyon şiddetlerine bağlıdır. Tuz konsantrasyonu kritik bir seviyeyi aştığında proteinler sulu çözeltilerden çöktürülür, bu da salting-out olarak bilinir. Yüksek tuz konsantrasyonunda hidrasyon suyu protein moleküllerinden uzaklaştırarak

çözünürlüğü azaltır. Farklı proteinler farklı iyonik şiddetlerde çökelme gösterdiklerinden proteinlerin ayrımı bu yol kullanılarak gerçekleştirilebilir.

- Çözücülerle fraksiyonlama: Suda çözünebilir etanol veya aseton gibi nötral organik çözücüler çoğu küresel proteinlerin sudaki çözünürlüğünü azaltarak çökmelerine sebep olur. Bu etki, sabit pH ve sabit iyonik şiddette çözünürlüğün ortamın dielektrik sabitinin bir fonksiyonu olduğunu gösterir. Bir proteinin çözünürlüğü, onu çevreleyen çözeltinin dielektrik sabitine bağlıdır. Dielektrik sabiti, yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimlerin büyüklüğünü değiştirir. Bir çözeltinin dielektrik sabiti azaldıkça, yüklü türler arasındaki elektrostatik etkileşimlerin büyüklüğü artar. Bu durum daha az iyonize olan proteinlerin çözeltideki çözünürlüğünü azaltarak çökmelerine sebep olur. Çökelmeye neden olmak için gereken organik çözücü miktarı protein cinsine bağlıdır. Organik çözücülerin, yüksek sıcaklıklarda sebep olduğu protein denatürasyonunu önlemek için düşük sıcaklıklarda çalışılmalıdır.

- Sıcaklık: Sıcaklık, küresel proteinlerin çözünürlüğüne etki eden önemli faktörlerdendir. Proteinlerin çözünürlüğü 0-40 °C sıcaklık aralığında artarken, 40-50 °C sıcaklık değerlerinde azalmaya başlar ve bu sıcaklık değerlerinin üstünde birçok protein denatüre olur. Protein ayırma işlemleri daha çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilse de oda sıcaklığı veya hücrelerin üreme sıcaklığı bazı protein ayırımları için daha uygundur.

1.5.2. Farklı Adsorpsiyon Kapasitelerine Göre Protein Ayrımı

Proteinler, apolar veya polar materyallere molekül büyüklüklerine göre adsorbe olabilirler. Proteinlerin adsorpsiyonuna Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağlarının sebep olduğu düşünülmektedir.

Adsorpsiyon kromatografisi, ayrılması istenen molekülün, bir kolon içerisinde bulunan katı destek maddesine kovalent olarak bağlı bir liganda tersinir olarak bağlandığı bir tekniktir. Ayırma, katı destek maddesi için farklı proteinlerin farklı ilgilerine dayanır.

- Afinite kromatografisi: Bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup, bu teknikte proteinler kompleks bir karışımdan tek basamakta ayrılabilir. Ayırma, açık bir kolon veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Kolonda bulunan katı destek maddesi protein gibi bir makromoleküle bağlanan ligand adında kovalent bağlı bir kimyasal gruba sahiptir. Herhangi bir protein karışımı kolona

gönderildiğinde bu liganda afinitesi olan protein liganda bağlanır ve kolonda daha fazla tutunur. Liganda bağlanmayan proteinler ise kolondan uzaklaştırılır. Son olarak ise bağlanan protein ile ligand arasındaki etkileşim ortadan kaldırılarak bağlanan protein geri kazanılır.

1.5.3. Boyut Farklarına Göre Protein Ayrımı

Proteinleri, boyut farklarına göre diğer protein yapılarından ya da küçük moleküllerden ayırmak mümkündür. Diyaliz, ultrafiltrasyon, yoğunluk gradienti santrifügasyonu ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri proteinlerin molekül büyüklükleri esasına göre ayrılmasında kullanılan yöntemlerdir.

- Diyaliz: Protein çözeltisinde mevcut olan küçük molekül ağırlığına sahip maddeler basit diyaliz yoluyla ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu işlem, bir yarı geçirgen zar kullanılarak protein moleküllerinin tutulması, küçük moleküllerin su ile birlikte zarı geçmesi esasına dayanır.

- Ultrafiltrasyon: Basınç ya da santrifügasyon kuvveti yardımıyla su ve küçük çözünen moleküllerin süzgeç tabakasından geçmesi, proteinlerin ise geri tutulması esasına dayanır. Bu işlem, bir protein çözeltisinin konsantrasyonunu arttırmak ya da proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılabilir.

- Yoğunluk gradienti santrifügasyonu: Kuvvetli bir santrifügasyon işlemi uygulanarak çözünmüş olarak bulunan protein karışımlarını ayırmak mümkündür. Bu yöntem, sadece proteinlerin değil aynı zamanda diğer makromoleküllerin de ayrılması için kullanılır. Santrifüj tüpünün altından üstüne doğru yoğunluk azalacak şekilde genelde sakkarozdan bir gradiyent oluşturulur. Çözünmüş olan protein karışımı santrifüj tüpüne üstten uygulanarak tüp santrifüj edilir. Santrifüj sırasında protein molekülleri konsantrasyonlarına, büyüklüklerine ve şekillerine göre birbirinden ayrılır.

- Jel filtrasyon kromatografisi: Proteinleri molekül büyüklüklerine göre ayırmak adına kullanılmakta olan en etkili yöntem jel filtrasyon kromatografisidir. Protein çözeltisi, çapraz bağlı polimerik malzemeden yapılmış gözenekli boncuklarla dolu bir kolona uygulanır. Boncuklardaki gözeneklerden daha büyük moleküller kolon boyunca hızla hareket ederken, gözeneklere giren moleküllerin hareketleri geciktirilir. Böylelikle protein molekülleri, azalan boyut sırasına göre kolondan ayrılır. Bu yöntem diğer makromolekül karışımlarının ayrılması için de kullanılabilir.

1.5.4. Elektriksel Yük Esasına Göre Protein Ayrımı

Proteinlerin elektrik alanda ayrılması, polipeptit yapısını oluşturan iyonlaşabilen yan gruplarının sayısına ve cinsine bağlı olan asit-baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinlerin bu özellikleri dikkate alınarak elektroforez ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri geliştirilmiştir.

- Elektroforez: Bir elektrik alanın etkisi altında çözeltideki yüklü moleküllerin boyutlarına, şekillerine veya yüklerine göre ayrılması esasına dayanır. Proteinlerin ayrıştırılıp gözle görünür hale getirilmesi bu yöntemin en önemli avantajlarından. Elektroforez, aynı zamanda proteinlerin izoelektrik noktası ve yaklaşık molekül kütlesi hakkında da bilgi verir.

- İyon değişim kromatografisi: Çözeltideki iyonların yüklü bir kolon matriksine tersinir bağlanmasına dayanır. Bağlı anyonik grupları içeren kolonlara katyon değiştiriciler, bağlı katyonik grupları içeren kolonlara anyon değiştiriciler denir. Bu yöntem, herhangi bir pH’ da proteinlerin net elektrik yükünün işareti ve büyüklüğünden faydalanır. Ayrıca, protein ayrımı için yaygın olarak kullanılan kromatografik tekniklerden biridir.

1.6. Enzimler

Enzimler, bütün hücre fonksiyonlarının gerçekleştirilmesi için gerekli olan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir.

Canlılığın devamı için kimyasal tepkimelerin özgün ve etkili bir şekilde katalizlenmesi gerekir. Canlı yapılarında meydana gelen çok sayıdaki biyokimyasal reaksiyon enzimler yardımıyla gerçekleşir. Enzimlerin katalitik aktivitelerini yerine getirebilmesi protein konformasyonunun bütünlüğüne bağlıdır. Bazı enzimlerin aktiviteleri için protein yapısını oluşturan amino asit kalıntılarından başka kimyasal gruplara ihtiyaç yokken, bazı enzimler ise aktivitelerini kofaktör olarak adlandırılan ilave kimyasal bileşiklere borçludur. Eğer kofaktör enzime kovalent olmayan bağlarla bağlıysa buna koenzim, eğer kofaktör enzime sıkı, hatta kovalent olarak bağlıysa buna prostetik grup denir.

Enzimler, genel olarak katalitik etki gösterdikleri substratların sonuna “-az” eki ilave edilerek isimlendirilirler. Substrat hakkında bilgi veren enzimler olduğu gibi, bu konuda hiçbir bilgi ifade etmeyen enzim isimleri de vardır. Bazı enzimler elde edildiği kaynaklara göre isimlendirilirken bazı enzimler ise onları keşfedenler tarafından geniş bir işlev aralığı

için isimlendirilmiştir. Enzimlerin keşfinin giderek artması, etki ettikleri substratlarının birden fazla olması ve reaksiyon türünün çeşitliliği enzimlerin sınıflandırılmasını zorunlu kılmıştır.

Enzimler, katalizledikleri tepkimenin türüne göre altı ana sınıfa ayrılırlar (Tablo 1). Her bir enzimin resmi bir enzim kod (E.C.) numarası ve adı vardır. Bu numara, E.C. harflerini takiben enzimin kimyasal yapısı ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi veren dört sayıdan oluşur. Bu kodlamada, ilk sayı enzimin sınıfını, ikinci sayı enzimin alt sınıfını, üçüncü sayı hangi türden substrat kullandığını ve son sayı ise enzimin aynı üç rakama sahip enzimler arasındaki sırasını verir.

Enzim sınıflarından oksidoredüktazlar, indirgenme-yükseltgenme (elektron transfer) reaksiyonlarını katalizlerler. Transferazlar, grup aktarım tepkimelerini katalizlerler. Hidrolazlar, hidroliz reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Liyazlar, grupların çift bağlara katılması veya grupların uzaklaştırılmasıyla çift bağ oluşumunu katalizlerler. İzomerazlar, molekül içi grupların aktarımı ile izomerik yapıların oluşumunu katalizlerler. Ligazlar ise ATP veya benzeri yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla bağ oluşumunu katalizlerler.

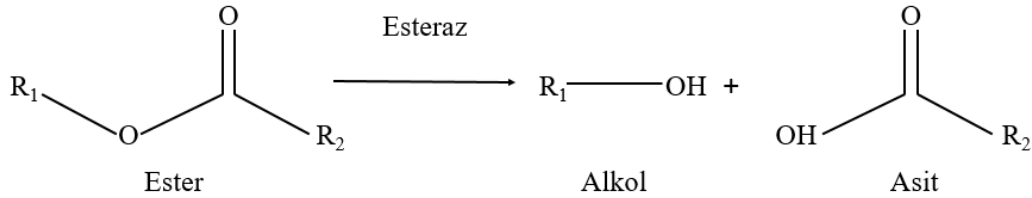
Tablo 1. Enzim sınıfları

Sınıf Numarası	Sınıf Adı	Katalizlediği tepkime türü
1	Oksidoredüktazlar	Elektron aktarım tepkimeleri
2	Transferazlar	Grup aktarım tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
4	Liyazlar	Grupların çift bağlara katılması veya çift bağ oluşumu
5	İzomerazlar	İzomerik yapıların oluşumu
6	Ligazlar	C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşumu

1.6.1. Esterazlar

Esterazlar, ürün olarak bir asit ve bir alkol oluşturmak üzere çok çeşitli substratların ester bağlarının parçalanmasını katalize eden hidrolitik enzimlerdir (Şekil 1). Substrat

özgünlüğü, inhibitör duyarlılığı, protein yapısı ve biyolojik fonksiyon farklılıkları gibi özellikler esterazların farklı gruplarda sınıflandırılmasına sebep olmuştur. Kolinesterazlar, tiyoesterazlar, fosfatazlar, eksonükleazlar, fosfoesterazlar ve karboksilesterazlar esteraz grubuna ait bilinen en önemli enzim gruplarıdır (Manco vd., 2009).



Şekil 1. Temel esteraz hidroliz reaksiyonu

Asetilkolinesterazlar (AChE), kolinesteraz ailesinin en çok bilinen ve çalışılan üyesidir. AChE, asetilkolin molekülünü hidrolize eden ve sinapslarda asetilkolin aracılı sinir iletimini sonlandıran enzim olarak bilinmektedir. Nörotransmisyondaki kritik rolü nedeniyle hassas bir hedef olan AChE sayısız araştırmaya da konu olmuştur.

Serum kolinesteraz veya psödo-kolinesteraz olarak da bilinen butirilkolinesteraz (BChE), AChE ile benzer moleküler yapısına sahip olan kolinesteraz ailesinin diğer bir üyesidir. AChE'ye göre farklı bir doku dağılımı olan BChE, esteraz, aril açılımidaz ve peptidaz olmak üzere üç farklı enzimatik aktiviteye sahiptir.

Karboksilesterazlar, karboksilik esterlerin alkol ve karboksilata hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Bu enzimler, yüksek oranda korunmuş serin, glutamat (veya aspartat), histidin üçlüsünün kovalent reaksiyon ara maddesinin oluşumuna dayanan serin-hidrolaz mekanizması sunmaktadır (Manco vd., 2009).

1.6.2. Enzim Kataliz Mekanizmaları

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir. Enzim yokluğunda çok küçük olan reaksiyon hız sabiti, enzim varlığında 10^8 - 10^{20} kat artmaktadır. Enzimler, kimyasal dengeye ulaşma hızını arttırarak reaksiyonların çok kısa sürelerde gerçekleşmesini sağlayan kataliz gücüne sahiptirler. Bu olağanüstü kataliz gücünde etkili olan önemli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar;

- Enzimler, etki ettiği moleküle bağlanarak parçalanacak bağın aktif merkezde bulunan katalitik gruba yakın durmasını ve ara ürünün kolayca oluşmasını sağlar.
- Bazı enzimler, substratla geçici kovalent etkileşimler yaparak zayıf kovalent ara ürünler oluştururlar ve böylelikle reaksiyonun kolaylaşmasını sağlarlar.
- Enzimler, protein verici veya protein alıcı olarak fonksiyon gören bazı fonksiyonel gruplar vasıtasıyla asit veya baz katalizini gerçekleştirebilirler.
- Enzimler, substrat molekülündeki parçalanacak olan bağa etki ederek bağın yıkılmasını kolaylaştırır (Keha ve Kürevioğlu, 2010).

1.6.3. Karbonik Anhidraz (CA)

Karbonik anhidrazlar, (CA, karbonat dehidrataz, karbonat hidrolizaz, EC: 4.2.1.1), CO₂ ve HCO₃⁻ arasındaki karşılıklı dönüşümü katalize eden bir metalloenzim süper ailesidir. Aktif bölgesinde çinko (Zn²⁺) bulunan bu enzim aşağıda verilen tersinir reaksiyonu katalizler. Katalizör olmadan da gerçekleşebilen bu reaksiyon katalizör yokluğunda oldukça yavaş ilerler (Supuran, 2016).



CA, memelilerden izole edilen ve önemli fizyolojik görevleri olan 16 farklı izoforma sahiptir. Bu izoformlar çok farklı lokalizasyon ve doku dağılımlarına sahiptir. Bu izozimlerin bazıları sitozolik (CA I, CA II, CA III, CA VII ve CA XIII), bazıları membrana bağlı (CA IV, CA IX, CA XII ve CA XIV), ikisi mitokondriyal (CA VA ve CA VB) ve biri tükürükte salgılanır (CA VI). CA-XV insanlarda eksprese olmazken kemirgen ve diğer yüksek omurgalılarda bol miktarda bulunur (Hilvo vd., 2005). Ayrıca CA ilişkili proteinler olarak bilinen ve katalitik olmayan üç farklı formu da (CARP-VIII, CARP-X ve CARP-XI) vardır (Supuran ve Scozzafava, 2007).

Canlı organizmaların bütün gruplarında bulunan CA' lar amino asit dizileri ve aktif bölge yapılarında çeşitli farklılıklar göstermelerine rağmen aynı reaksiyonu katalizler (Liljas and Laurberg 2000).

1.6.3.1. CA Sınıfları

Günümüzde, amino asit dizisi, üç boyutlu yapısı, aktif bölge yapısı ve katalitik özellikleri gibi konularda detaylı çalışmalar yapılarak yapı fonksiyon ilişkisinin derinlemesine araştırıldığı altı farklı CA sınıfı (α , β , γ , δ , ζ ve η) vardır (Supuran, 2016).

α -Sınıfı CA' lar omurgalılarda, protozoalarda, alglerde, yeşil bitkilerin sitoplazmasında ve birçok gram negatif bakteride bulunur. İlk tanımlanan CA sınıfı olan α -CA' lar yaklaşık olarak 30 kDa molekül kütesine sahiptir.

β -sınıfı CA' lar ökaryotlar, bakteriler ve arkelerde bulunmaktadır. β -CA' lar katalitik olarak aktif bir dimer, tetramer ve oktamer ile molekül kütleleri 45-200 kDa arasında değişen kuaterner yapıları bakımından çeşitlilik gösterir (Rowlett, 2014).

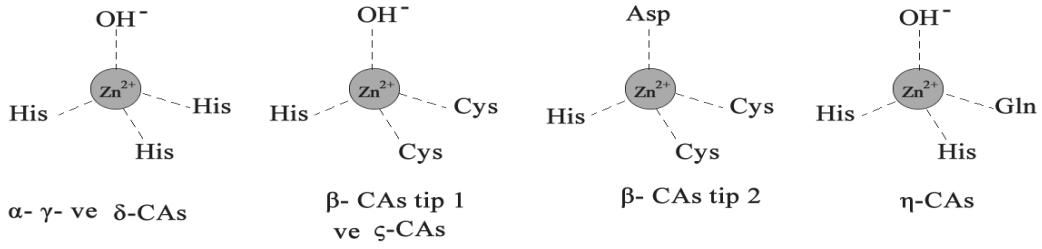
γ -sınıf CA' lar çoğunlukla bakteri ve arkelerde bulunmaktadır. Metanojenik anaerobik arke *Methanosarcina thermophila*' dan izole edilen CA aktivitesine sahip Cam proteini, CA' ların γ -sınıfının arke tipi haline gelmiştir (Alber ve Ferry 1994). Cam' ın aktif formu, sol el β -sarmal motifli yaklaşık olarak 23 kDa molekül ağırlığına sahip monomerli bir homotrimerdir (Ferry, 2010).

δ ve ζ CA' lar sadece deniz diatomlarında bulunurken, η CA' lar protozoalarda bulunur (Supuran, 2016).

1.6.3.2. CA' ların Yapısı ve Fonksiyonu

Tüm CA' lar, bir protein alt birimi ve her bir alt birimin aktif merkezinde +2 yüklü metal iyonu (Me^{2+}) taşıyan enzimlerdir. Katalitik aktivitelerini sürdürebilmek adına tüm CA sınıfları metal iyonu olarak Zn^{2+} kullanabilir. ζ -sınıfı CA' larda Zn^{2+} , Cd^{2+} ile yer değiştirebilir. γ -Sınıfı CA' lar, anaerobik koşullar altında Fe^{2+} kullanabilir ve aktivitesini Co^{2+} ile sürdürebilir. Ayrıca birçok α -Sınıfı CA' da, Zn^{2+} ile Co^{2+} yer değişimi katalitik aktivitede önemli bir kayba sebep olmaz (Kupriyanova vd., 2017).

Kristalografi çalışmaları, CA' ların aktif bölgesinin genellikle, Me^{2+} için koordine edici ligandlar olarak görev yapan üç amino asit kalıntısı ve bir protonsız su molekülü (hidroksit iyonu) tarafından oluşturulan tetrahedral geometrinin bir boşluğu olduğunu gösterir (Şekil 2). Sonucu molekül, hidrojen bağlarıyla aktif bölgeyi çevreleyen amino asitlere bağlanır (Kupriyanova vd., 2017).



Şekil 2. Farklı sınıf CA' ların aktif bölge yapıları (Alkan Türkuçar, 2018).

CA' nın fonksiyonel rolleri, karbondioksitin tersinir hidrasyonunun kataliziyle belirlenir. CA' ların dahil olduğu birçok biyolojik süreç olup, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ karşılıklı dönüşümünün hızlandığı her yerde mevcuttur. Hücresel zarlar boyunca taşıma için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ iletimi, enzimler için $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ substratlarının teslimi, diğer enzimatik reaksiyonların ürünleri olan $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ uzaklaştırılması, CA lokalizasyon yerlerinde H^+ konsantrasyonundaki değişiklikler ve belirli hücresel bölmelerde veya dokularda inorganik karbon formlarındaki değişiklikler enzimin var olan rollerindendir (Smith ve Ferry, 2000; Kupriyanova vd., 2017).

CA' nın fizyolojik rolleri, fonksiyonel rollerini yerine getirerek canlı organizmaların belirli hayati süreçlerine enzim katılımını sağlar. Tüm CA' ların $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ interkonversiyonu olan evrensel işlevine rağmen, enzimin organizma düzeyindeki önemi, bireysel organizmanın metabolik özellikleri ve inorganik karbon değişim sisteminin özellikleri tarafından belirlenir. CA, genellikle hücre altı lokalizasyonuna bağlı olarak solunum, fotosentez, pH, iyon taşıma/homeostaz, biyosentetik reaksiyonlar, kalsifikasyon ve osteogenez gibi birçok fizyolojik süreçte yer alır (Kupriyanova vd., 2017).

Fizyolojik işlevlerin yanı sıra, CA' ların aşırı aktivitesi glokom, ateroskleroz, tümörlerin görünümü ve obezite gibi bir dizi insan hastalığına katkıda bulunurken (Supuran ve Scozzafava 2007), CA' ların etkinliğinin olmaması, öğrenme ve bellekte ihlallere yol açarak Alzheimer hastalığı veya yaşlanmaya sebep olur (Alterio vd., 2012). Bu nedenle, CA' ların temel çalışmaları yanında ilaç tasarımı ile aktivasyon/inhibisyon çalışmaları da hızla gelişmektedir.

1.6.3.3. CA' lar Tarafından Katalizlenen Reaksiyonlar

CO₂ hidrasyon/ HCO₃⁻ dehidrasyon işlemlerine ek olarak, bazı CA sınıfları, COS, CS₂ ve siyanamid gibi CO₂' ye benzer küçük molekülleri hidratlama olasılığı ile çeşitli başka reaksiyonları da katalize ederler (Supuran, 2016). Ayrıca aldehytlerin gem diollere hidrate oldukları da görülmüştür. Karboksilik asit esterleri, sülfonik asit esterleri, fosfat esterleri ve tiyoesterler hidrolize uğrayan moleküllerdendir. α-CA' lar için daha az araştırılan farklı hidrolitik işlemler olmasına rağmen, CO₂ hidrasyonu/bikarbonat dehidrasyonu dışındaki bu reaksiyonların çoğunun fizyolojik önemi bilinmemektedir (Tablo 2).

Bitkilerde ve hayvanlarda sadece Tablo 2' de verilen ilk reaksiyon fizyolojik fonksiyonlara sahipken, bazı bakterilerin hayatta kalması için ikinci ve üçüncü reaksiyonlar gereklidir. Tablo 2' de verilen diğer reaksiyonlara ise daha az rastlanmıştır.

Tablo 2. CA' lar tarafından katalizlenen reaksiyonlar

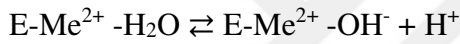
Reaksiyon Numarası	Katalizlenen Reaksiyon
1	$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$
2	$\text{COS} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2$
3	$\text{CS}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2 \text{H}_2\text{S} + \text{CO}_2$
4	$\text{CH}_2\text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCONH}_2$
5	$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH(OH)}_2$
6	$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
7	$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$
8	$\text{ArOPO}_3\text{H}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ArOH} + \text{H}_3\text{PO}_4$
9	$\text{R}_2\text{NCSSR}' + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{R}_2\text{NH} + \text{R}'\text{SH} + \text{COS}$
10	$\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
11	$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$

CA' ların katalitik mekanizması ilk olarak insan α -CA II formu için tanımlanmıştır (Silverman ve Lindskog, 1988). Açık kataliz mekanizması, hCA II' nin katalitik olarak aktif grubunun Zn' ye bağlı bir hidroksit iyonu olması sebebiyle 'Zn-hidroksit' olarak adlandırılmıştır. Metal iyonu tek başına katalizör görevi görece kadar nükleofilik değildir. Daha sonradan, tüm CA sınıflarının, iki değerlikli katalitik aktif metal hidroksit türevlerini kullanarak metal-hidroksit mekanizması kullandığı bulunmuştur (Supuran, 2016).

İki aşamada gerçekleşen katalizin ilk aşamasında, CO_2 ' nin HCO_3^- a dönüşümü gerçekleşir. Enzimin (E) aktif bölgesinde bulunan metal hidroksit türevi, güçlü bir nükleofil olarak CO_2 ' ye saldırır. Me^{2+} ye bağlı HCO_3^- iyonu oluşumuna yol açan bu basamak sonrasında, HCO_3^- iyonu su molekülü ile yer değiştirerek çözeltiye bırakılır. Böylece, Me^{2+} ye koordine su ile, enzimin aktif olmayan bir asit formu oluşturulur (Kupriyanova vd., 2017).

$$\text{E-Me}^{2+} \text{-OH}^- + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{E-Me}^{2+} \text{-HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{E-Me}^{2+} \text{-H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$$

İkinci aşamada, metalle ilişkili su molekülünün iyonlaşması ve aktif bölgeden bir protonun dış tampona çıkarılmasıyla enzimin aktif bazik formu yeniden oluşturulur.



Bir protonun aktif bölgeden uzaklaştırılması ve enzimin metal hidroksit türlerinin geri kazanılması, katalitik işlemin hız sınırlayıcı adımıdır.

CA' ların inhibitörleri (CAI), enzimin katalitik işlevini kısmen veya tamamen yerine getirmesine izin vermeyen maddelerdir. Farklı mekanizmalarda çalışan oldukça fazla sayıda CAI bilinmektedir. Ayrıca, etki mekanizmaları henüz bilinmeyen çok sayıda CAI da vardır.

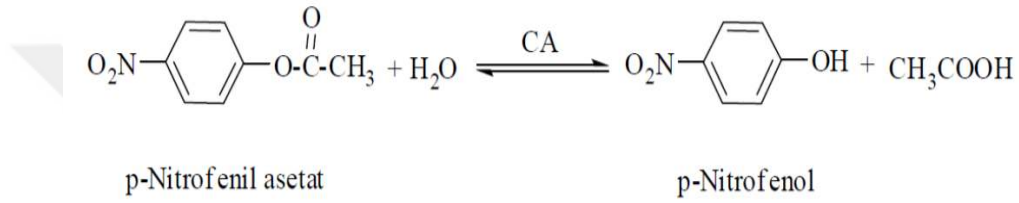
CA' ların aktivatörleri, katalizin hız sınırlayıcı adımının geçişini hızlandıran maddelerdir. Bu tür maddeler, aktif bölgenin girişine yakın bir yerde enzime bağlanarak aktif bölge ile reaksiyon ortamı arasında proton transfer işlemlerini kolaylaştıran bir kompleks oluşturur. Böylelikle enzimin aktif bölgesinde metal hidroksit türevinin geri kazanılması çok daha hızlı olur ve enzimin devir hızı artar (Kupriyanova vd., 2017).

1.6.3.4. CA Aktivite Tayin Yöntemleri

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi, in vitro koşullarda gerçekleştirilip spektrofotometrik olarak takip edilebilen esteraz aktivitesi ve CA enziminin fizyolojik aktivitesi olan CO_2 -hidrataz aktivitesi olmak üzere iki şekilde ölçülebilmektedir.

1.6.3.4.1. Esteraz Aktivitesi

Esteraz aktivitesi yöntemi, karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesi göstermesi esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, esteraz aktivite tayin yönteminde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm dalga boyunda absorbands veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat' a hidroliz etmektedir (Şekil 3). *p*-nitrofenol ve *p*-nitrofenolat ürünlerinin her ikisi de 348 nm dalga boyunda aynı absorbandsı verdiğiinden dolayı fenolik OH⁻ grubundaki H⁺ iyonunun durumu ölçümü etkilememektedir (Kandel vd., 1970).



Şekil 3. Esteraz aktivitesine sahip karbonik anhidraz enzimi aracılığıyla *p*-nitrofenil asetatın *p*-nitrofenole dönüşüm reaksiyonu

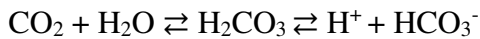
1.6.3.4.2. Hidrataz Aktivitesi

Hidrataz aktivitesi yönteminde, enzim aktivitesi 0 °C sıcaklıkta pH düşüşünün takibine bağlı olarak potansiyometrik metotla ölçülmektedir. Metodun prensibi, enzimli ve enzimsiz reaksiyon ortamında substrat olarak kullanılan karbondioksitin (CO₂) hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺' nın ortamın pH' sını 8,8' den 7,0' a düşürmesi için geçen sürenin kayıt altına alınmasına dayanmakta olup (Wilbur ve Anderson, 1948) sonuçlar enzim birimi olarak ifade edilmektedir.

Enzim birimi ise; enzim bulunmayan reaksiyon için CO₂ hidratasyon süresi (t₀) ile enzim bulunan reaksiyon süresi (t_e) arasındaki farkın, t_e' ye bölünmesiyle belirlenmiştir.

$$((t_0 - t_e) / t_e)$$

Esteraz aktivitesine sahip karbonik anhidraz enzimi aracılığıyla karbondioksitin (CO₂) hidratasyon reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



1.7. Kromatografi

Kromatografi, her türden molekülün kompleks karışımlarının hareketli ve sabit faz olmak üzere iki farklı faz arasında dağılması esasına dayanarak gerçekleştirilen etkili bir ayırma ve saflaştırma tekniğidir. Hareketli faz gaz, sıvı veya süperkritik bir akışkan olabilirken sabit faz ise kolon içerisine doldurulmuş veya düz bir zemine yayılmış herhangi bir katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı olabilir. Hareketli faz, sabit faz üzerinde hareket ettirilirken ayrımı yapılan örnek bileşenleri hareketli ve sabit faz üzerinde farklı derecelerde tutulurlar. Bu bileşenler sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulmuş ise hareketli fazın akışıyla yavaşça hareket ederler. Fakat bileşenler sabit faz tarafından zayıf bir şekilde tutulmuş ise hareketli faz akışı ile hızlıca hareket ederler. Bu farklı hareketliliğin sonucu olarak örnek bileşenleri bantlar halinde ayrılıp kalitatif veya kantitatif olarak analiz edilirler.

Kromatografik yöntemler, sabit fazın tutturulduğu konuma göre kolon ve düzlem olmak üzere iki farklı sınıfa ayrılır. Kolon kromatografisinde, sabit faz dar bir tüp içerisinde olup hareketli faz basınç veya yer çekimi kuvveti ile sabit faz içerisinden geçirilir. Düzlem kromatografisinde, sabit faz düz bir plaka üzerinde ya da bir kağıdın boşluklarında tutturulmuş olup hareketli faz yer çekiminin etkisi altında ya da kapiler olarak sabit faz üzerinde hareket eder.

Kromatografik yöntemler, hareketli fazın yapısına göre gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi (LC) ve süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) olmak üzere üç farklı sınıfa ayrılır. Gaz kromatografisinde hareketli faz gaz olup, karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaşabilen bileşenlerin ayrılmasında kullanılır. Sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvıdır. Süperkritik akışkan kromatografisinde ise hareketli faz süperkritik sıvı olup ayırma kritik sıcaklığının üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılıp basınç ile sıvılaştırılan gazlar ile gerçekleştirilir.

1.8. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

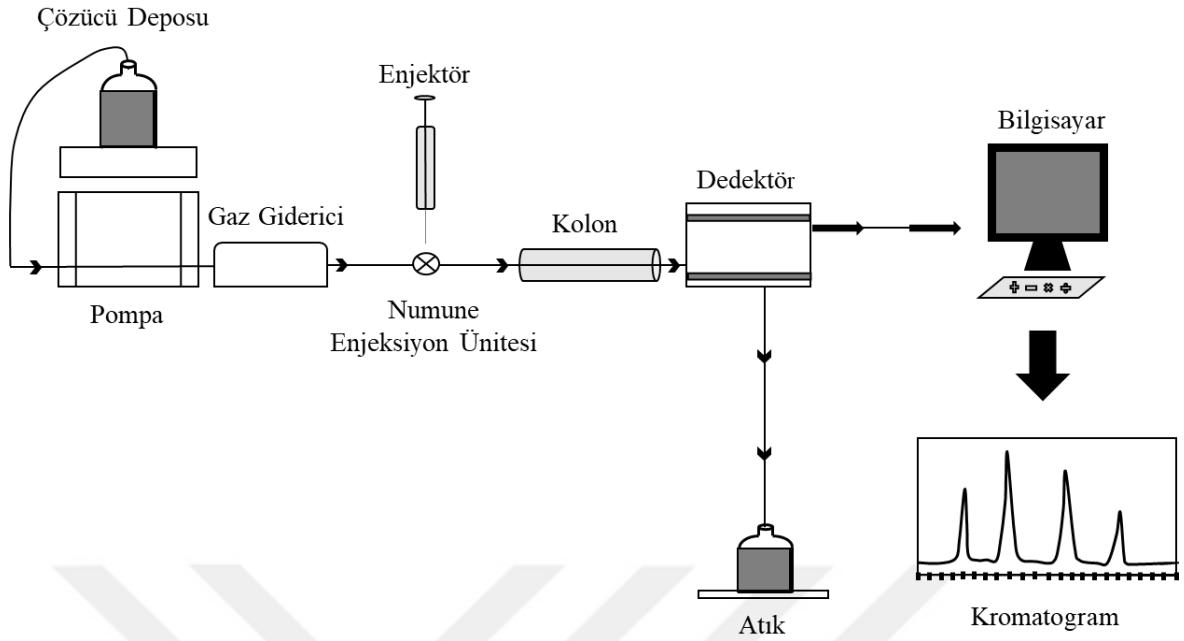
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), yaygın olarak kullanılmakta olan bir kolon kromatografisi tekniğidir. Sıvı bir hareketli faz ve kolon içerisinde bulunan sabit bir faz arasında numune bileşenlerinin çeşitli etkileşimleri sonucu ayırma gerçekleşmektedir. Bileşenlerin birbirinden ayrılmasında, numunenin yapısı, sabit ve hareketli fazın yapısı ve kompozisyonu oldukça önemli bir role sahiptir.

HPLC’ de sabit fazı oluşturan bileşenler, çok küçük çaplı küreciklerin yüzeyine tutturulmuş yapılar olduğu için etkileşimin yüzey alanı genişleyerek ayırma performansı artmaktadır. Fakat bu durum hareketli fazın akışını zorlayacağından yüksek basınç uygulanarak hareketli faz istenen akış hızında kolondan geçirilmektedir.

1.8.1.HPLC’ nin Çalışma Prensipleri, Bileşenleri ve Temel Kavramlar

HPLC’ de, karışımındaki bileşenlerin birbirinden ayrılması için, analit yüksek basınç altında hareketli faz yardımı ile kolondan geçirilir. Kolona ulaşan analit kolona sabitlenmiş olan sabit faz ile farklı oranlarda etkileşime girer. Sabit faz ve hareketli faz arasındaki farklı oranlardaki etkileşimler, bileşenlerin farklı hızlarda ilerleyerek birbirinden ayrılmasına ve kolonu farklı zaman dilimlerinde terk etmelerine sebep olur. Kolon çıkışında bulunan dedektör yardımıyla bileşenlerin derişimleri zamanın bir fonksiyonu veya kullanılan hareketli faz hacminin bir fonksiyonu olarak sinyale dönüştürülür ve kromatogramlar elde edilir. Kromatogramlarda bulunan piklerin yerleri kimlikleri hakkında, alanları ve yükseklikleri ise miktarları hakkında bilgi verir.

Bir HPLC sistemi genel olarak, hareketli fazın bulunduğu çözücü deposu (rezervuar), hareketli fazda çözünmüş olarak bulunan gazı uzaklaştıran gaz giderici (degazer), hareketli fazı taşıyan HPLC pompası, numunenin sisteme gönderildiği enjeksiyon ünitesi, numunenin sisteme girişini sağlayan enjektör, ayırmanın gerçekleştiği kolon, ayrılan bileşenlerin derişimine cevap veren detektör ve verilerin kaydedildiği bir bilgisayardan oluşmaktadır. Şekil 4’ te HPLC sistemine ait şematik gösterim bulunmaktadır.



Şekil 4. HPLC sisteminin şematik gösterimi

1.8.1.1. Hareketli Faz

Hareketli faz, bileşenlerine ayrılmak üzere analiti sabit fazın bulunduğu kolona taşıyan farklı özelliklere sahip çözelti veya çözücü karışımlarından oluşur. Hareketli faz, cam veya paslanmaz çelikten yapılan bir veya birden fazla rezervuarda bulunabilir. HPLC sisteminde ayırım, hareketli fazın bileşimine göre izokratik ya da gradient olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir.

İzokratik elusyonda, hareketli faz olarak tek bir çözücü ya da çoklu bileşenden oluşan homojen bir karışım kullanılıp ayırma boyunca hareketli fazın bileşimi ve oranı değiştirilmez.

Gradyent elusyonda, daha kısa sürede çok daha iyi bir ayırım elde etmek adına farklı polaritelere sahip iki veya daha fazla çözücü farklı oranlarda karıştırılarak analiz süresi boyunca sisteme kademeli olarak gönderilir.

1.8.1.2. Gaz Giderici (Degazer)

Hareketli fazı oluşturan çözücü sistemlerinde, çözücülerin karıştırılması ve vakumu esnasında hava kabarcıkları oluşabilmektedir. Bu hava kabarcıkları kromatografik ayırım

üzerinde gürültü, akış hızı dengesizliği ve değişken kolon performansı gibi olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Hareketli faz depolarından taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesi adına HPLC sistemine degazer (gaz giderici) ünitesi eklenir.

1.8.1.3. Pompa

HPLC sisteminde sabit fazı oluşturan bileşenler çok küçük çaplı küreciklerin yüzeyine tutturulmuş yapılar olup, hareketli fazın istenen akış hızında kolondan geçirip analitin kolon içerisindeki sabit faz ile etkileşime girmesi için yüksek basınçlar uygulamak gerekmektedir. Yüksek basınç uygulama yeteneğine sahip pompalama sistemleri, akış hızına, pompanın yapımında kullanılan malzemelere, pompanın çalışma mekanizmasına ve tipine göre değişik şekillerde olabilmektedir.

1.8.1.4. Enjeksiyon Ünitesi

Enjeksiyon ünitesi, analitlerin 500 µL hacim seviyelerine kadar kolon ve sonrasında detektöre gönderilmesi adına HPLC sistemine girişini sağlar. Analitlerin HPLC sistemine gönderilmesinde manuel veya otomatik enjeksiyon sistemleri kullanılabilir. Manuel sistemlerde, enjeksiyon ünitesi yükleme pozisyonuna getirilir ve analit bir şırınga yardımıyla sisteme gönderilir. Otomatik enjeksiyon sistemlerinde ise bu işlemler cihaz tarafından otomatik olarak yapılır.

1.8.1.5. Kolon

Kolon, analit bileşenlerinin etkileşime girerek belirli zaman dilimlerinde birbirinden ayrıldığı sabit faz olarak tanımlanabilir. Kolonların dolgu materyalleri çoğunlukla alümina ve silika esaslı olup yapımında ise genellikle paslanmaz çelik, teflon veya cam gibi malzemeler kullanılmaktadır. Kolonların ayırma gücü sabit fazı oluşturan maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. HPLC sisteminde kullanılan kolonların iç çapları 4-10 mm aralığında, paketlerin yaygın parçacık büyüklüğü 3-10 µm aralığında ve kolon boyları ise genellikle 10-30 cm aralığında değişkenlik göstermektedir.

Sabit fazın polaritesine göre ters faz ve normal faz olmak üzere iki çeşit kolon bulunmaktadır. Ters faz kolonlarda, sabit faz apolar, hareketli faz polar yapıdadır. Normal faz kolonlarda ise sabit faz polar, hareketli faz apolar yapıdadır.

1.8.1.6. Dedektör

Dedektörler, HPLC sisteminde kolondan ayrılarak çıkan bileşenlerin kalitatif veya kantitatif analizlerini yapmakla görevlidir. Ayrılan bileşenlerin sinyalleri, bir kaydedici yardımıyla kaydedilerek zamana karşı dedektör cevabının kromatogramlar üzerinde pik olarak ifade edildiği grafikler oluşturur. İyi bir dedektör çok düşük gürültü oluşturarak ayrılan bileşenlerin küçük miktarlarını bile analiz edebilmelidir. HPLC sisteminde çok çeşitli dedektörler kullanılarak farklı yapı ve özellikteki moleküller analiz edilebilmektedir. Ultraviyole-görünür bölge dedektörü (UV/VIS), diyot serili dedektör (PDA), floresans dedektörü (FLD), iletkenlik dedektörü (CDD), kırılma indisi dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör (ECD), kütle dedektörü (MS) gibi çeşitli dedektörler geliştirilmiştir.

İlgilenilen birçok bileşik ultraviyole-görünür bölgede (190-600 nm) absorbands verdiği için ultraviyole-görünür bölge (UV/VIS) dedektörleri günümüzde yaygın olarak kullanılan HPLC detektörleridir. Peptid bağı 210-230 nm' de amino asit kompozisyonundan etkilenmeden ışığı absorbe ettiği için protein ayırımında en yaygın olarak uygulanan tespit yöntemidir. Duyarlılık, yalnızca aromatik yapıli amino asitlerin absorbe ettiği 250-280 nm seviyelerinde 10-20 kat daha yüksektir (Seipke vd., 1986).

Diyot serili dedektörler (PDA) de spektrofotometrik ölçüm temeli ile çalışmaktadırlar. Bu dedektörün avantajı, farklı dalga boylarındaki absorbandsları eş zamanlı olarak ölçebilmesidir. Mevcut spektrumların çeşitli noktalarda hızlıca taranabilmesi, piklerin nitel olarak analizine olanak sağlar (Swartz, 2010).

UV dedektörlerle kıyaslandığında çok daha yüksek hassasiyete sahip olan floresans dedektörleri (FLD), floresan özellik gösteren veya türevlendirilerek floresans hale getirilen bileşiklerin analizlerinde kullanılmaktadır.

Daha çok elektrolit analizlerinde kullanılan iletkenlik dedektörleri (CDD), kolondan ayrılan iyonik bileşiklerin tespitini yapmaktadır.

Kırılma indisi dedektörü (RID), hareketli faz ile numune arasındaki optik kırılma indeksindeki farkı ölçer. Çözünen molekül üzerinde hiçbir kromofor gruba ihtiyaç

duymayan bu detektörlerle şekerlerin, trigliseritlerin ve organik asitlerin analizi başarılı bir şekilde yapılmaktadır. Ayrım, hareketli faz bileşimine duyarlı olduğu için gradiyent elusyon için uygun değildir.

Elektrokimyasal dedektörler (ECD), indirgenebilen veya yükseltgenebilen bileşikler için mevcut olan en hassas ve seçici HPLC dedektörleridir. Elektrokimyasal dedektörlerin çalışma prensibi, elektrokimyasal reaksiyondan kaynaklanan yükseltilmiş akımın ölçülmesi esasına dayanır.

Kütle dedektörü (MS), HPLC sisteminde ayrılan bileşenlerin iyonlarını oluşturarak kütle/yük (m/z) oranının bir fonksiyonu olan iyon sinyallerinin verilmesi esasına dayanmaktadır. Bu dedektörler sayesinde peptitler ve diğer kimyasal bileşiklerin iyonları üzerinden kalitatif ve kantitatif analizler sıklıkla yapılmaktadır.

1.8.2. HPLC' nin Kullanım Alanları

HPLC, moleküllerin ayrılmasında, tanımlanmasında, karakterizasyonunda ve saflaştırılmasında sıklıkla tercih edilen bir kolon kromatografisi tekniği olup amino asitler, peptidler, proteinler, karbohidratlar, nükleik asitler ve lipidler gibi farklı gruptaki moleküllerin analizinde yaygın olarak kullanılır. Yüksek çözünürlük sağlaması, yüksek duyarlılıkta olması, geri kazanımının yüksek olması, tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar vermesi yaygın olarak kullanılmasının sebepleri arasında gösterilebilir. Bileşen ayrımının hızlı olması HPLC tekniğinin en büyük avantajıdır.

HPLC' de moleküllerin ayrımı için kullanılan dört temel kromatografik teknik bulunmaktadır. Ayırma mekanizmasına göre bu teknikler, dağılım (partisyon) kromatografisi, boyut dışlama (jel filtrasyon) kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve adsorpsiyon kromatografisi şeklinde sınıflandırılmaktadır. Molekül ağırlığı büyük olan moleküllerin ayrımında daha çok boyut dışlama (jel filtrasyon) kromatografisi kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı iyonik türlerin ayrımında iyon değişim kromatografisi, küçük molekül ağırlıklı iyonik yapılmayan polar türlerin ayrımında dağılım (partisyon) kromatografisi ve küçük molekül ağırlıklı apolar türlerin ayrımında ise adsorpsiyon kromatografisi kullanılmaktadır (Skoog ve Leary, 1992).

1.8.2.1. Protein Ayırımında HPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, keşfinden sonra en önemli biyokimyasal ayırma yöntemlerinden biri haline gelmiş olup protein ve peptit analizleri için tercih edilen yöntem olmaya devam etmiştir. Moleküler boyut, iyonik özellikler, çözünürlük, polarite ve diğer moleküllerle yapılan spesifik etkileşimlerden faydalanılarak sabit ve hareketli faz arasında farklı bir dağılımı sonucu biyomoleküllerin ayrımı gerçekleşmektedir (Seipke vd., 1986).

- Jel Filtrasyon Kromatografisi: Kromatografik ayırma yöntemleri arasında özel bir yere sahip olup boyut dışlama kromatografisi olarak da bilinmektedir. Ayırım, numune, sabit faz ve hareketli faz arasındaki etkileşim temelinde gerçekleşmeyip, moleküllerin boyutlarına göre gerçekleşmektedir. İdeal boyut dışlama kromatografisinde ayırım, sadece boyuta dayalı gerçekleşip numunenin kolon dolgu malzemesi ile etkileşimi olmayacak şekilde yapılmalıdır. Jel filtrasyon kromatografisi ile birlikte protein, polisakkarit, nükleik asit ve benzer biyomoleküllerin ayrımı yapılabilmektedir. Numune jel filtrasyon kolonuna ulaştığında kolon dolgu malzemesinin jel taneciklerinden daha büyük bileşenler jel boncuk gözeneklerine giremeyeceklerinden hızlıca elüsyona uğrayıp kolondan en hızlı şekilde ayrılırlar. Küçük moleküller ise gözeneklere girerler ve kolonda daha yavaş hareket edip en büyük gecikmeye maruz kalırlar. Böylelikle karışımı oluşturan moleküller büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmış olurlar.

- İyon-Değişimi Kromatografisi: Proteinler, amfoterik karakteri nedeniyle pH'ya bağlı olarak katyonik veya anyonik formda bulunabilirler. Bu nedenle, proteinlerin karakteristik bir parametresi, proteinin net yükünün sıfır olduğu izoelektrik noktasıdır. İzelektrik nokta, ortamın pH'ı ve iyon değiştirici tipinin seçimini belirlemektedir (Seipke vd., 1986). Bağlanmanın gücü, protein üzerindeki iyonik grupların sayısı, iyon değiştiricinin yük yoğunluğu ve iyonik güç ile belirlenebildiği için proteinlerin elusyonu artan iyonik kuvvet gradiyenti, bir pH gradiyenti veya her ikisinin bileşkesi ile gerçekleştirilebilir. İyon değişim kromatografisinde kullanılan kolon, bağlı yüklü gruptan oluşan bir sentetik polimerdir. İyon değiştiriciler, katyonik ve anyonik olmak üzere iki farklı grupta incelenebilirler. Bağlı anyonik gruplara sahip kolonlara katyon değiştiriciler, bağlı katyonik gruplara sahip kolonlara anyon değiştiriciler denir.

- Ters Faz (Reverse Phase (RP)) Kromatografisi: Peptit ve protein ayırımında yaygın olarak kullanılan sıvı kromatografisi olan ters faz kromatografisinde (RPC) sabit faz apolar,

hareketli faz ise polar karakterlidir. Bağlanma, proteinin polar olmayan bir yüzeyi ile sabit faz arasında gerçekleşmektedir. Birçok bağlanma bölgesi ile bir protein sabit faz ile etkileşime girebilir. Bu durum sabit ve hareketli faz arasındaki bir dağılımdan ziyade adsorpsiyon şeklinde gerçekleşmektedir. Gradyent elusyon sırasında, nispeten daha zayıf bağlanan çözücü molekülleri önce kolon üzerinde bulunan serbest temas bölgelerini ve bağlanmaya dahil olmayan protein yüzeylerini işgal eder. Çözücü molekülleri belirli bir konsantrasyona ulaştığında, protein aniden kolon yüzeyinden ayrılır. Polaritesi yüksek analit kolondan erken ayrılırken, polaritesi düşük analit kolonda daha fazla tutunur. Protein ayrımı, kullanılan 300 Å por boyutlu silika temelli C₁₈ kolonlar ve ters fazlı gözeneksiz silika kolonları ile kısa sürelerde gerçekleşmektedir (Larive vd., 1999).

- **Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi (HIC):** Hidrofobik etkileşim kromatografisi, karmaşık protein karışımlarının saflaştırılması ve ayrılması için güçlü ve çok umut verici bir tekniktir. Proteinlerin hidrofobikliğinden yararlanan HIC tekniği, kolona sabitlenmiş hidrofobik ligandlar ile proteinlerin yüzeyindeki polar olmayan bölgeler arasındaki hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır. Bu kromatografi tekniği, laboratuvar ve endüstri ölçeğinde protein ayırma ve saflaştırmalarında güçlü biyoayırma tekniği olarak başarıyla değerlendirilmektedir (Careri ve Mangia, 2003).

1.8.2.1.1. Protein Ayrımında Kullanılan Kolonlar

Peptit ve protein izolasyonu ve ayrımı için en yaygın kullanılan teknikler ters fazlı sıvı kromatografisi (RP-LC), iyon değişim kromatografisi (IEC) ve boyut dışlama kromatografisidir (SEC). Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC) de peptit ve protein izolasyonu ve ayrımı adına yaygın hale gelmiştir (Careri ve Mangia, 2003).

HPLC' deki kolon dolgu malzemesi, ayrımı yapılacak olan numune karışımının kimyasal (hidrofobik, hidrofilik, iyonik) veya fiziksel (boyut) özelliklerine göre belirlenmektedir. Paketleme malzemesinin partikül boyutu, kolonun verimliliğine ve karışımın çözünürlüğüne ekli ekmektedir. Parçacık boyutu ne kadar küçük olursa, artan yüzey alanı nedeniyle verim o kadar yüksek olmakta ve daha iyi bir ayırma gerçekleşmektedir (Issaq, 2001).

Ters faz HPLC' de silika temelli 150 ya da 300 Å por boyutlu C₁₈ ya da C₈ kolonlar kullanılmaktadır. RP-HPLC' de silikaya bağlı alifatik zincirin alkil zincir uzunluğu, bir protein ve peptit karışımını ayırırken dikkat edilmesi gereken önemli bir parametredir. Alkil

zinciri ne kadar uzun olursa kolonun özellikleri de o kadar hidrofobik olmaktadır. Farklı alkil zincir uzunluklarına sahip kolonlar kullanıldığında farklı seçicilikler elde edilebilmektedir.

Proteinlerin ayrılması için kolon paketleme teknolojisine son dönemlerde monolitik kolonlar eklenmiştir. Mikro-HPLC için kullanılan ayırma kolonları genellikle 50-320 µm silika parçacıklarının paketlenmesiyle hazırlanmaktadır. Monolitik kılcal kolonlar, peptitlerin ve proteinlerin ayrılmasına başarıyla uygulanmaktadır (Issaq vd., 2003).

Protein ve peptit ayrımı için alkil türevli silikalar dışındaki paketleme malzemelerini kullanan farklı kromatografik teknikler de bulunmaktadır. İyon değişimi, boyut dışlama, afinite ve hidrofobik etkileşim kromatografisi bu tekniklere örnek olarak verilebilmektedir.

1.8.2.1.2. Protein Ayrımında Kullanılan Dedektörler

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, proteinler ve peptitler gibi büyük biyomoleküllerin ayrılması için kullanılan iyi bir tekniktir. Proteinlerin tespiti ve miktarının belirlenmesi adına çeşitli dedektörler kullanılmaktadır. Protein ve peptitler UV, floresan ve MS dedektörleri kullanılarak on-line olarak tespit edilebilmektedir.

HPLC-UV dedeksiyon sistemi proteinlerin ve peptitlerin ayrılması adına sıklıkla kullanılmaktadır. 185-220 nm dalga boyları bölgesinde peptit bağının güçlü absorpsiyonu, proteinlerin saptanmasına izin vermektedir. Yapılarında aromatik bir amino asit kalıntısı içeren proteinler ve peptitler, 275-280 nm' de UV absorpsiyonu ve 200-300 nm' de floresan ışıması ile tespit edilebilmektedir. MS dedektör sistemleri, evrenselliği, duyarlılığı ve seçiciliği nedeniyle peptitler ve proteinler için ideal bir dedeksiyon tekniğidir. Proteinler ve peptitler için MS, sürekli akışlı hızlı atom bombardımanı (FAB), elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve TOF kütle analizörü ile MALDI-MS gibi farklı dedeksiyon teknikleri ile son zamanlarda ön plana çıkmaktadır. Bu üç MS tekniği, peptidler ve proteinler gibi polar ve uçucu olmayan bileşiklerin kütle spektrometresi kaynağına giriş problemini çözmüştür (Issaq, 2001).

1.8.3. On-line HPLC-Biyokimyasal Dedeksiyon Sistemleri (BCD)

Karmaşık karışımlardan biyoaktif bileşiklerin taranması ve tanımlanması oldukça zahmetli, maliyetli ve zaman alıcı süreçleri uygulamayı gerektirmektedir. On-line HPLC-

biyokimyasal dedeksiyon sistemlerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), on-line olarak kolon sonrası testler ve paralel kimyasal analizlerle birleştirilmiştir. Bu sistemler, karmaşık karışımlarda bulunan biyoaktif bileşikleri zahmetli saflaştırma ve sonrasındaki ayırma işlemlerine gerek kalmadan taramak ve tanımlamak için geliştirilmiştir. Bu sistemlerdeki standart prosedür, HPLC’ de karmaşık karışımların ayrılması, kolon sonrası biyokimyasal analizler ve numune karışımlarında bulunan her bir bileşik için ayrı ayrı aktivite tespiti şeklinde uygulama bulmaktadır. Kromatografik ayırım ve takibindeki kombine analiz yöntemleri (HPLC-DAD, HPLC-MS, HPLC-NMR, vb.) sayesinde aktif bileşiklerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi eş zamanlı olarak yapılabilmektedir.

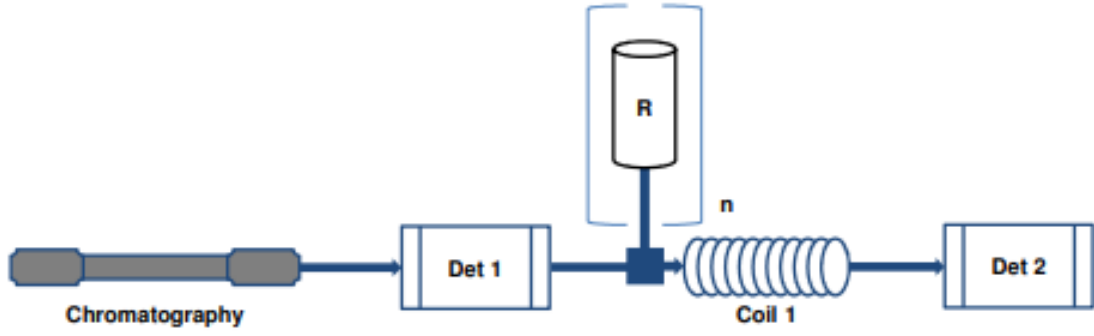
On-line HPLC-biyokimyasal dedeksiyon sistemlerinin geliştirilmesinin, doğal ürün bazlı ilaç keşfi için güçlü bir yöntem sağlamak amacıyla karışımlardaki bireysel aktif bileşenlerin hızlı bir şekilde profillenmesi ve tanımlanması adına oldukça faydalı olduğu kanıtlanmıştır (Shu-Yun vd., 2009).

1.8.3.1. On-line HPLC-BCD Sistemleri İçin Kurulum Şemaları

Biyokimyasal dedeksiyon yöntemleri, biyokimyasal reaksiyonlar neticesinde biyoaktif maddelerin tespiti olarak tanımlanabilir. Bu yöntemler, ekstrakt veya karışımlarda bulunan biyoaktif maddelerin uzun süren ayırma ve izolasyon prosedürlerine gerek kalmadan hızlı bir şekilde tanımlanması için kullanılır. Bitki ekstraktlarındaki biyoaktif maddeleri tanımlamaya yönelik olarak enzim aktivitesi/afinite tespiti (EAD), reseptör afinite tespiti (RAD), metabolit profillemeye sistemleri ve antioksidan aktivite tayini dahil olmak üzere afinite/aktiviteye dayalı çeşitli BCD yöntemleri bulunmaktadır (Malherbe vd., 2012).

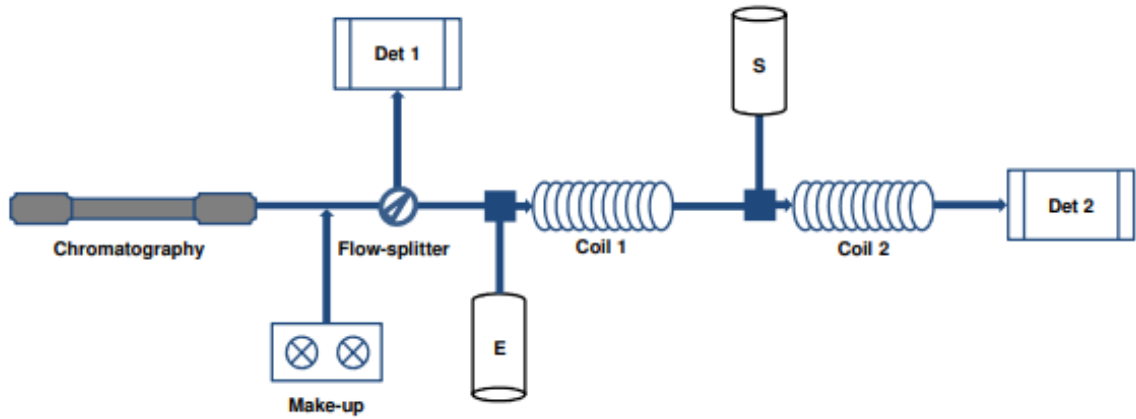
HPLC-BCD cihaz kurulumları, belirli amaçlara yönelik optimizasyona veya ilgili araştırma grubunun tercihiyle bağlı olarak değişiklik gösterse de temel olarak benzer çalışma prensibine sahiptirler (Şekil 5-8).

HPLC-BCD şemalarının birçoğu on-line antioksidan analizi için kullanılan en basit kurulumlardan oluşur (Şekil 5). Bu kurulumda HPLC hareketli faz akışı bölünmez ve reaksiyon tek bir sarmalda gerçekleşir.



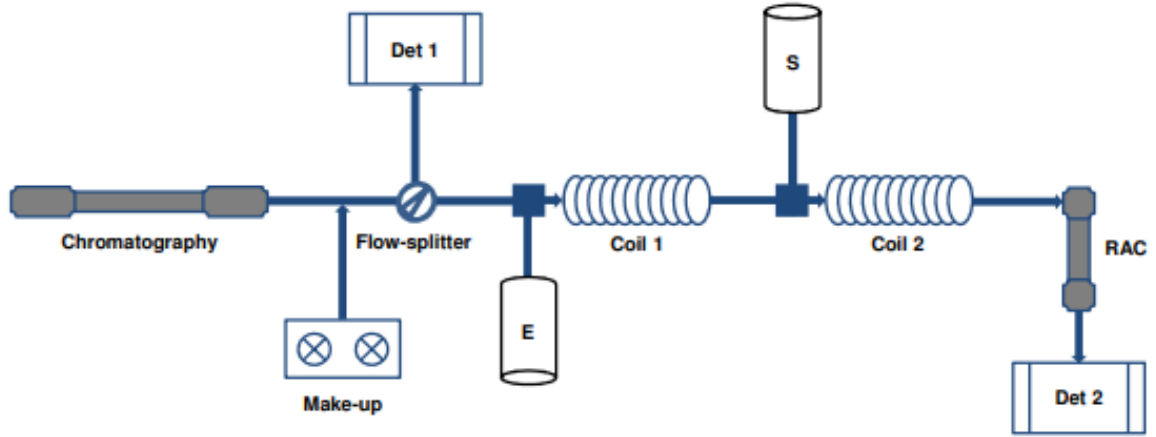
Şekil 5. HPLC-BCD sistemleri için temel kurulum şeması (Malherbe vd., 2012).

Çoğu EAD ve RAD analizlerine ek olarak bazı on-line antioksidan tayin yöntemleri de hareketli faz akışını bölmek için akış ayırıcıları kullanır. Akışın bir kısmı BCD analizine yönlendirilirken, diğer kısım bileşik tanımlama için kullanılan dedektörlere gönderilir. Bu tür analizler ayrıca, substratın eklenmesinden önce inkübe edilmiş bir sarmalda reseptörler veya enzimler ile HPLC eluentinin ön inkübasyonunu ve ardından ikinci bir reaksiyon sarmalını içerebilir. EAD ve RAD yöntemlerinde bağlı ve bağlı olmayan ligandlardan elde edilen sinyal yoğunluğunda belirgin bir farkın olduğu homojen kurulum şemaları bulunur (Şekil 6).



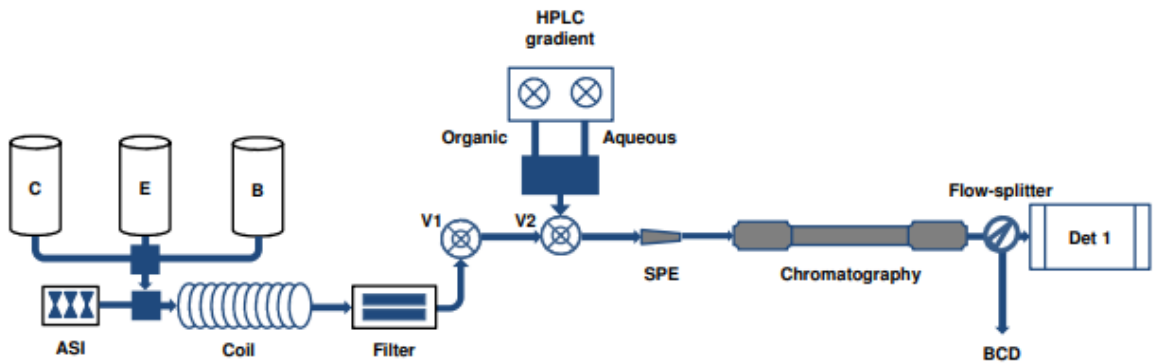
Şekil 6. EAD ve RAD yöntemleri için homojen kurulum şeması (Malherbe vd., 2012).

Ayrıca, EAD ve RAD analizlerinde bağlı ve bağlı olmayan ligandları ayırt etmek için başka bir ayırma adımının gerekli olduğu heterojen kurulum şemaları da bulunmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. HPLC-BCD sistemleri için heterojen kurulum şeması (Malherbe vd., 2012).

Metabolit görüntüleme analizlerinde, otomatik numune enjektörü ile HPLC gradiyent pompası arasında bir metabolizma sisteminin yerleştirildiği bir kurulum kullanılır. BCD sistemleriyle birleştirilebilen bu sistem, reaktiflerin eklenmesi için ilave pompalar ve reaksiyon sarmalından oluşur. Numune, enzim kaynağı ve kofaktörler ile reaksiyona girdikten sonra çapraz akışlı bir filtrasyon cihazı kullanılarak filtreden geçirilir. Reaksiyon karışımı daha sonra HPLC ayırımından önce bir katı fazlı ekstraksiyon (SPE) kolonu üzerinde tutulur (Şekil 8).

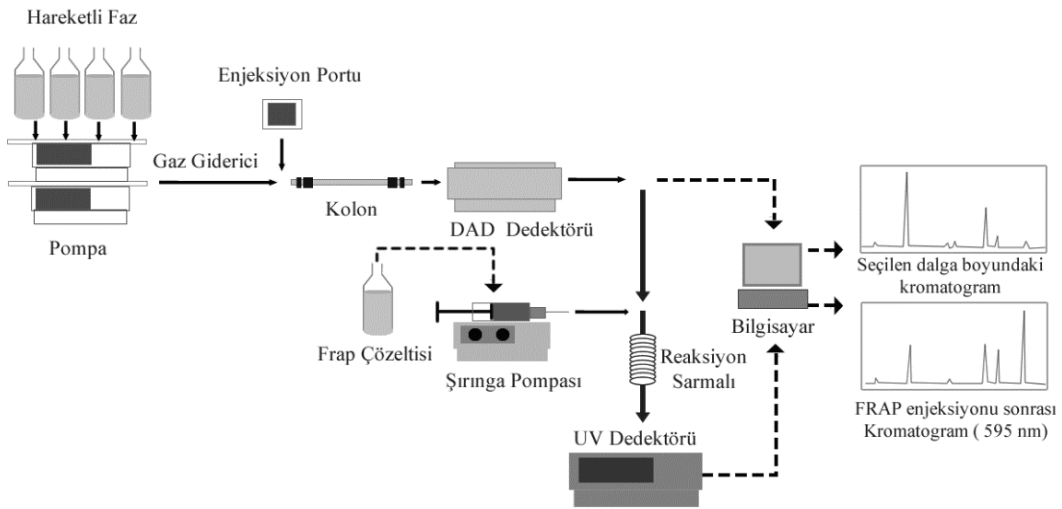


Şekil 8. Metabolit görüntüleme yöntemlerinde kullanılan kurulum şeması (Malherbe vd., 2012).

Farklı kurulum şemalarına rağmen, yukarıda belirtilen HPLC-BCD analizlerinin herhangi birinin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için gerekli olan bazı genel hususlar ve gereksinimler bulunmaktadır (Malherbe vd., 2012).

1.8.3.2. Laboratuvarımızda Geliştirilen On-line HPLC Yöntemleri

Çalışma grubumuz tarafından laboratuvarımızda geliştirilmiş olan çeşitli on-line HPLC-BCD yöntemleri bulunmaktadır. Geliştirilen yöntemlerden bir tanesi olan on-line HPLC-FRAP antioksidan aktivite tayin yönteminin bitki numunelerindeki bileşenlerin miktar ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi adına oldukça uygun olduğu görülmüştür (Arslan Burnaz vd., 2017). Geliştirilen bu yöntemin yüksek antioksidan cevap ve düşük gürültü vermesi literatürde var olan on-line DPPH ve ABTS yöntemlerinden daha üstün olduğunu göstermiştir. Antioksidan bileşiklerin ve aktivitelerinin eşzamanlı olarak belirlenmesine imkan sağlayan bu on-line HPLC antioksidan aktivite tayin yöntemi Şekil 9’ da verilen kurulum şeması ile literatüre kazandırılmıştır.

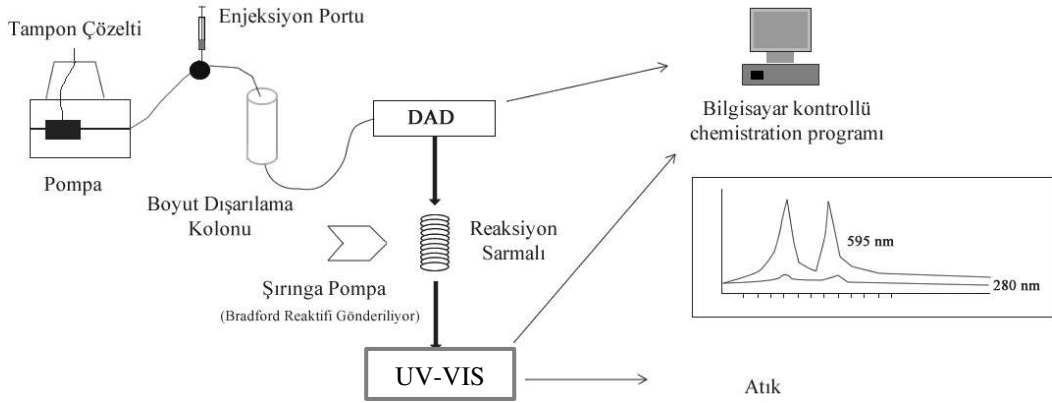


Şekil 9. On-line HPLC-FRAP antioksidan aktivite tayin yöntemine ait kurulum şeması (Arslan-Burnaz vd., 2017).

Laboratuvarımızda geliştirilen yöntemlerden bir diğeri ise on-line HPLC indikatör tayin yöntemi geliştirilmesi ve mor lahana ekstraktına uygulanması adlı çalışmadır. Bu yöntemle karışımlarda bulunan indikatör özelliğine sahip bileşenlerin tespit edilmesi

amaçlanmıştır. On-line olarak HPLC sistemine kombine edilmiş pompa ve dedektör yardımıyla, fenol kırmızısı ve bromotimol mavisi indikatörleri standart olarak kullanılarak yöntem geliştirilmiş ve mor lahananın sulu ekstraktına uygulanmıştır. Literatüre ilk defa kazandırılan bu on-line HPLC-indikatör tayin yöntemi sayesinde mor lahana kromatogramlarının karşılaştırılması sonucu indikatör olabilecek en az üç bileşene sahip olduğu görülmüştür. Geliştirilen bu on-line HPLC yöntemiyle birlikte doğal pH indikatörlerinin çok daha kısa sürelerde tespit edilebilmesi sağlanmıştır (Doğan, 2015).

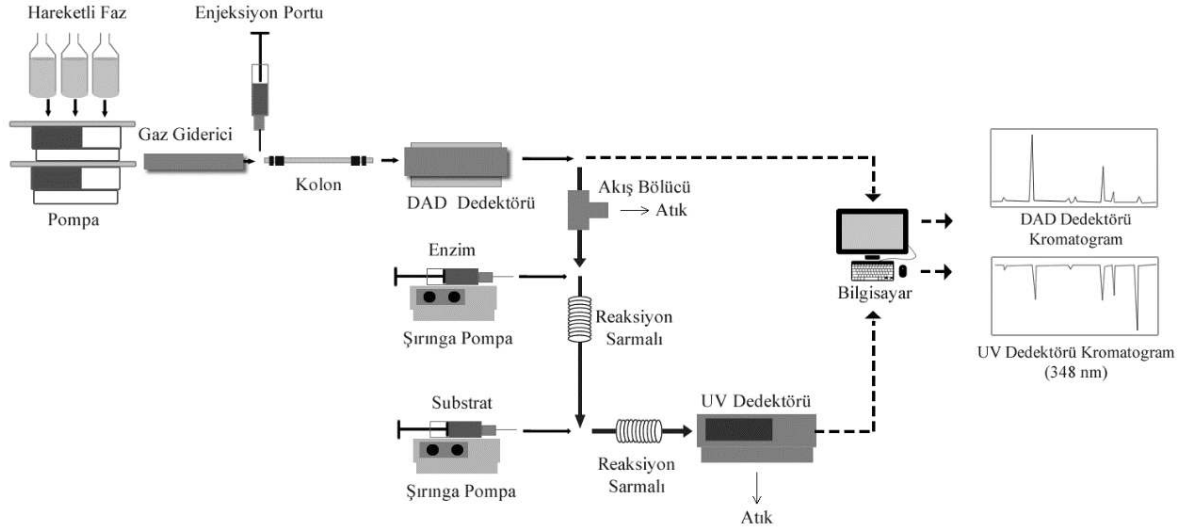
Laboratuvarımızda geliştirilen yöntemlerden bir diğeri ise HPLC ile proteinlerin ayrılmasında dedeksiyon amaçlı yeni bir on-line yöntem geliştirilerek gıda ve ilaç analizlerinde uygulanması amaçlanmıştır. Bu yöntem geliştirilirken UV-VIS spektrofotometrik protein tayin yöntemleri taranıp, üstün validasyon özelliklerine sahip olanlar HPLC sistemine uyarlanmıştır. Sisteme ayırım sonrası şırınga pompa ile reaktif gönderilerek kantitatif protein tayininin yapılabileceği on-line HPLC-Bradford protein tayin yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 10). Protein ayrımının boyut dışlama kolonu ile yapıldığı bu yöntem, gıda (jelatin proteini) ve biyofarmasötik ilaç (insülin, immünglobulin G proteinleri) numunelerine uygulanmıştır (Eyupoğlu, 2017).



Şekil 10. HPLC ile proteinlerin ayrılmasında deteksiyon amaçlı geliştirilen on-line yönteme ait kurulum şeması (Eyupoğlu, 2017).

Laboratuvarımızda geliştirilen yöntemlerden bir diğeri ise, yeni bir on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesi ve biyoaktif bitki ekstraktlarına uygulanması adlı çalışmadır. CA' nın standart inhibitörleri olan sülfanilamid ve asetazolamid kullanılarak on-line HPLC-DAD-CAI yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 11). Bu yöntemle birlikte

konsantrasyonu bilinen bileşimin tek konsantrasyonda uygulanmasıyla IC_{50} değerinin belirlenebileceği gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem, yüksek aktiviteye sahip, IC_{50} değeri 50 μM ' in altında olan bileşiklerin tespitinde kullanılmıştır (Alkan Türkuçar, 2018).



Şekil 11. Geliştirilen on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yöntemine (RP-HPLC-DAD-UV) ait kurulum şeması (Alkan Türkuçar, 2018).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Yapılan çalışmalarda kullanılan cihazlar ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarlarından temin edilmiştir. Kullanılan cihaz, alet ve malzemelerin satın alındıkları firmalara ait bilgiler Tablo 3’ te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmalarda kullanılan cihazlar, malzemeler ve markaları

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Marka
Buzdolabı (4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-18 °C)	Vestel
Etüv	Binder ve Nüve FN 120
Hassas Terazı	Mettler Toledo MS204
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standard
Mikropipet	Gilson (10-100 µL) & (100-1000 µL)
Öğütücü (Blender)	Waring Commercial Blender
pH metre	InoLab pH/ION/Cond 750
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Vorteks karıştırıcı	IKA® Vortex Genius 3
UV-VIS Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Şırınga	Hsw Norm-Ject 2-Part (50 mL)
Şırınga pompası	Goldman syringe pump
PTFE (Poly Tetra Fluoro Ethylene) Tubing	Supelco
Kolon	Zorbax GF-450, 6 µm, 9.4 x 250 mm
HPLC Sistemi	Agilent 1100 Series Degasser Agilent 1100 Series Quad Pump Agilent Agilent 1100 Series VWD Dedector Agilent 1200 Series DAD Dedector

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin üretici firmaları Tablo 4’ te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmaları

Kimyasal adı	Üretici firma
Asetazolamid	Sigma-Aldrich
Aseton	Merck
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Emsure [®] , Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Metanol (HPLC grade)	LiChrosolv [®] , Merck
Potasyum Klorür (KCl)	Merck
Sığır Karbonik Anhidraz (BCA)	Sigma
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	Merck
Sülfanilamid	Sigma-Aldrich
Sülfürik Asit (H_2SO_4)	Carlo Erba
Tris (hidroksimetil)-aminometan	Sigma

2.2. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Çalışmalar

Yöntem geliştirme öncesinde çok sayıda spektrofotometrik ve kromatografik çalışma yapılarak, bu çalışmalar HPLC sistemine uyarlanmıştır.

2.2.1. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Spektrofotometrik Denemeler

Yöntem geliştirme öncesinde BCA enziminin esteraz aktivitesi ve BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren asetazolamid ve sülfanilamidin IC₅₀ değerleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

2.2.1.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Yapılan spektrofotometrik çalışmalarda kullanılan *p*-nitrofenil asetat (substrat) çözeltisi, günlük taze olarak hazırlanmıştır. Literatür taraması sonucu substrat çözeltisinin yüksek konsantrasyonlarda kararsız olduğu ve çözünürlük problemleri nedeniyle kristal oluşumuna sebep olduğu belirlenmiştir. Enzim üzerinde düşük inhibisyon etkisi olduğundan çözücü olarak aseton tercih edildiği ve daha çok 3 mM konsantrasyonunda hazırlandığı tespit edilmiştir (Verpoorte vd., 1967).

Enzim çözeltisinin tamponlanması Tris-SO₄ tamponu ile sağlanmıştır. Esteraz aktivite ölçümü üzerinden belirlenen enzim aktivitesi, 2 mL' lik küvetler kullanılarak spektrofotometre cihazı yardımıyla belirlenmiştir. Her bir reaksiyon iki paralel çalışılıp 20 dk inkübasyon sonrası 348 nm' de okunan absorbans ortalamaları üzerinden aktivite belirlenmiştir. Aktivite tayini için, reaksiyon karışımını oluşturan çözeltiler ve bu çözeltilerin ortama katılım sıraları Tablo 5' te olduğu gibi uygulanmıştır.

Tablo 5. Esteraz aktivitesi tayini için 2 mL' lik kuvars küvetlerde kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin reaksiyon ortamına katılım sıraları

İşlem Sırası	Kullanılan Maddeler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
1	Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH 7,4)	500	500
2	Enzim çözeltisi	-	150
3	Enzim çözücüsü	150	-
4	Saf su	100	100
5	<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi (3 mM)	750	750
Toplam hacim		1500	1500

2.2.1.2. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Esteraz aktivite tayin yöntemiyle CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi spektrofotometrik olarak araştırılmıştır. Her bir standart inhibitör için Aktivite (%) - [I] grafikleri çizilip, bu grafiklerden %50 inhibisyona karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplanmıştır.

Tablo 6. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine inhibitörlerin inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Numune (µL)	Numune Körü (µL)	Kontrol (µL)	Kontrol Körü (µL)
Tris-SO ₄ (0,05 M; pH 7,4)	550	550	550	550
Enzim çözeltisi	150	-	150	-
Saf su	-	150	-	150
İnhibitör çözeltisi	50	50	-	-
İnhibitör çözücüsü	-	-	50	50
<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi	750	750	750	750
Toplam hacim	1500	1500	1500	1500

Tablo 6' da bulunan çözeltiler belirtilen hacimlerde sırasıyla pipetlenerek reaksiyona sokulmuştur. Her bir reaksiyon iki paralel çalışılıp, 4 dk inkübasyon sonrası 348 nm' de okunan absorbans ortalaması kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerindeki % inhibisyonu hesaplanırken kör çıkarılmış değerler kullanılmış olup aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (((KK-K) - (NK-N)) / (KK-K)) \times 100$$

Numune = N

Numune Körü = NK

Kontrol = K

Kontrol Körü = KK

Kullanılan Çözeltiler:

3 mM *p*-nitrofenil asetat (substrat): 27 mg *p*-nitrofenil asetat 1 mL aseton ile çözülüp, magnetik karıştırıcı üzerinde yüksek rpm' de dönen 49 mL saf suya yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlanmıştır.

0,05 M Tris-SO₄ Tamponu (pH:7,4): 6,05 g tris (hidroksimetil)-aminometan 900 mL saf suda çözülüp, çözeltinin pH' sı 1 M H₂SO₄ ile 7,4' e ayarlandıktan sonra toplam hacim saf su ile 1 L' ye tamamlanmıştır.

BCA enzim çözeltisi (1 mg/mL): 1 mg BCA, 1 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

0,025 M Sülfanilamid çözeltisi: 215 mg sülfanilamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok sülfanilamid çözeltisinden 10, 8, 6 ve 4 µM sülfanilamid çözeltileri seri olarak stoktan seyreltilerek hazırlanmıştır.

0,005 M Asetazolamid çözeltisi: 55 mg asetazolamid 50 mL asetonitrilde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan stok asetazolamid çözeltisinden 200, 100, 80 ve 40 nM sülfanilamid çözeltileri stoktan seyreltilerek hazırlanmıştır.

2.2.2. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Geliştirme Öncesi Yapılan Kromatografik Denemeler

Yöntem geliştirme öncesinde BCA enziminin esteraz aktivitesi ve BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sülfanilamidin IC₅₀ değeri HPLC ile akış enjeksiyon analizi (FIA) modunda belirlenmiştir.

BCA enziminin, kromatografik ayrımı ve esteraz aktivitesinin tespiti, esteraz aktivitesi üzerine dalga boyunun etkisi, esteraz aktivitesi göstermeyen BSA proteininin ayrımı ve esteraz aktivitesinin tespiti (kör deneme), doğal numunelerde (sığır karaciğer ekstresi) protein ayrımı ve esteraz aktivitesi tespiti çalışmaları kolon varlığında kromatografik olarak yapılmıştır.

2.2.2.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC sisteminde, FIA modunda hareketli faz olarak pH' sı 7,4 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu kullanılmıştır. Kolonsuz HPLC sistemine şırınga pompa ile substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilip enjeksiyon noktasından BCA enzimi enjekte edilerek esteraz

aktivitesi UV dedektör aracılığı ile 348 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek pik boyutu üzerinden belirlenmiştir.

2.2.2.2. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC ile FIA modunda esteraz aktivite tayin metoduyla CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC₅₀ değerini belirleyebilmek adına farklı konsantrasyonlardaki sülfanilamid çözeltileri substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) çözeltisiyle belirli oranlarda karıştırılarak şırınga pompa ile HPLC sistemine gönderilmiştir. Ayrıca inhibitörsüz substrat çözeltisi de şırınga pompa ile HPLC sistemine gönderilmiştir. HPLC sisteminde hareketli faz olarak Tris-SO₄ tamponu kullanılıp enjeksiyon noktasından sisteme BCA enzimi enjekte edilerek değişen inhibitör konsantrasyonlarına göre değişen aktivite pik boyutlarından sülfanilamid için IC₅₀ değeri belirlenmiştir.

2.2.2.3. BCA Enziminin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Esteraz aktivitesine sahip olan karbonik anhidraz enzimi substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm' de absorbans veren *p*-nitrofenol veya *p*-nitrofenolat' a hidroliz etmektedir. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesinden faydalananarak HPLC sisteminde kromatografik ayrımı ve sonrasında aktivite tespiti gerçekleştirilmiştir. Boyut dışlama kolonu ve 230 nm absorbans kaydı ile kromatografik ayrımı gerçekleştirilen karbonik anhidraz enziminin ayırım sonrası ikinci bir pompa ile sisteme substrat gönderilerek 348 nm dalga boyunda esteraz aktivitesi gösterip göstermediği araştırılmıştır.

2.2.2.4. BCA Enziminin Kromatografik Aktivite Tayininde Ölçüm Dalgaboyunun Araştırılması

BCA enziminin ayrımı, izokratik elüsyon modunda Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile boyut dışlama kolonunda kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına ayırım sonrası şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. Esteraz

aktivitesinden sorumlu piklerin durumu Farklı dalga boylarında (348 ve 400 nm) değerlendirilmiştir.

2.2.2.5. BSA Proteininin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

BSA proteininin ayrımı, izokratik elüsyon modunda Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm’ de absorbans takip edilerek kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda BSA proteininin esteraz aktivitesini belirlemek adına şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. 400 nm’ de BSA proteininin esteraz aktivitesinden sorumlu aktivite pikinin durumu değerlendirilmiştir.

2.2.2.6. Sığır Karaciğer Ekstresinin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Sığır karaciğer ekstresinin protein ayrımı, izokratik elüsyon modunda Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm’ de kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda sığır karaciğer ekstresinin esteraz aktivitesini belirlemek adına şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. 400 nm’ de sığır karaciğer ekstresinde ayrılan her bir proteinin esteraz aktivitesinden sorumlu olduğu aktivite piklerinin durumu değerlendirilmiştir.

Yöntem geliştirme öncesinde yapılan spektrofotometrik ve kromatografik çalışmalar, kromatografik ayırım ve esteraz aktivitesi tespiti noktasında boyut dışlama (SEC) kolonu bulunan kombine HPLC sistemine uyarlanarak yöntem geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

2.3. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Geliştirilmesi

2.3.1. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi Koşulları

HPLC-DAD-UV analizleri, Agilent (Waldbronn, Almanya) 1100 serisine ait pompa, gaz giderici (degasser), ultra viyole dedektör (UV) ve 1200 serisine ait diyot serili dedektör (DAD) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Enstrüman Chem Station programı ile (Agilent)

kontrol edilmiştir. Numune enjeksiyonu 25 µL hacim kapasiteli Hamilton şırınga kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerde Zorbax GF-450 kolonu (6 µm, 9.4 x 250 mm) kullanılmıştır. HPLC sisteminde hareketli faz olarak konsantrasyonu 150 mM, pH' sı 8,2 olan fosfat tamponu kullanılmıştır ve akış izokratik programla uygulanmıştır. Hareketli faz çözeltisi iki kez destillenmiş deiyonize ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

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

BCA enziminin kromatografik koşullara adaptasyonunu sağlayarak ayrımını ve esteraz aktivitesini belirleyebilmek adına boyut dışlama kolonuyla protein ayrımlarında sık kullanılan KCl' nin, tampon çözelti seçiminin ve pH' nın esteraz aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

2.3.2.1. KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Protein ayrımları ve moleküler ağırlık analizleri için HPLC çalışmalarında sıklıkla kullanılan boyut dışlama kolonlarında (SEC) düşük iyonik şiddet (< 0,05 M) ayırım üzerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bu olumsuz etkiler iyonik şiddetin artırılmasıyla ortadan kaldırılabilir. Bu amaçla elektrostatik etkileşimleri en aza indirmek adına protein ayrımlarında kullanılan tampon çözeltilere farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,4 M) tuz çözeltileri ilave edilmektedir. Fakat protein ayırımından ziyade protein aktivitelerinin önemli olduğu çalışmalarda eklenen tuz çözeltilerinin aktivite üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

Yapılan çalışmada, iyonik şiddet sorununun ortadan kaldırılması adına tampon çözeltilerde sıklıkla tercih edilen KCl' nin esteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Tablo 7' de bulunan çözeltiler belirtilen hacimlerde pipetlenerek reaksiyona sokulmuştur. Her bir reaksiyon iki paralel çalışılıp, ortalama absorbans değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

Tablo 7. Esteraz aktivitesi üzerine KCl inhibisyon etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH 8,3) ve KCl çözeltisi (0,40; 0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M) içeren Tris-SO ₄ tamponu (0,05 M; pH 8,3)	750	750
Enzim çözeltisi (0,1 mg/mL)	-	100
Saf su	100	-
<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi (3 mM)	450	450
Toplam hacim	1300	1300

2.3.2.2. Tampon Seçiminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Yöntemle Değerlendirilmesi

Boyut dışlama kolonları (SEC), protein ayırmaları için HPLC çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Protein ayırımı için literatürde hareketli faz olarak çeşitli tampon sistemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu SEC kolonları ile protein ayırımı için daha çok fosfat, Tris ve asetat tamponlarının kullanıldığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, fosfat, Tris ve asetat tamponları kullanılmış, tampon seçiminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi spektrofotometrik olarak araştırılmıştır. Tablo 8’ de bulunan çözeltiler belirtilen hacimlerde pipetlenerek reaksiyona sokulmuştur. Her bir reaksiyon iki paralel çalışılıp, ortalama absorbans değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

Tablo 8. Tampon seçiminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve miktarları

Kullanılan Maddeler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Tris-SO ₄ tamponu (0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M; pH 7,4)	750	750
Fosfat tamponu (0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M; pH 7)		
Asetat tamponu (0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M; pH 5,5)		
Enzim çözeltisi (0,1 mg/mL)	-	150
Saf su	150	-
<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi (3 mM)	600	600
Toplam hacim	1500	1500

2.3.2.3. pH' nın Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Protein ayrımı adına kullanılmakta olan boyut dışlama kolonları (SEC) HPLC çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılarında negatif yükler içermekte olan bu kolonlarla protein ayrımı çalışmaları yapılırken peptit yapılarının pozitif yüklü yan grupları ile istenmeyen elektrostatik etkileşimler oluşabilmektedir. Bu etkileşimlerin ortadan kaldırılması hem kolon performansı hem de biyolojik aktivitenin gözlenebilmesi adına oldukça önemlidir. Biyomoleküllerin ayrımında, pH seviyesi 5-8,5 ve konsantrasyonu 0,1-0,5 M aralığında olan tampon çözeltiler hareketli faz olarak tercih edilmektedir. Düşük pH (< 4) ayırım üzerine olumsuz etki etmekte, pH' nın artırılmasıyla bu olumsuz etki ortadan kaldırılabilir.

Yapılan çalışmalarda, pH değişiminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ortam pH' sı, hem enzimatik reaksiyon sırasında hem de enzimatik reaksiyon tamamlandıktan sonra farklılaştırılarak spektrofotometrik aktivite takibi yapılmıştır.

Esteraz aktivitesi reaksiyonu, sabit pH' lı tamponda (Tris-SO₄; 0,05 M; pH 7) gerçekleştirilip reaksiyon tamamlandıktan sonra ortam yüksek konsantrasyona sahip farklı pH' lara sahip tamponlarla (Tris-SO₄; 0,5 M; pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ayarlanarak 348 ve 400 nm' de spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Tablo 9' da bulunan çözeltiler verilen hacimlerde pipetlenerek reaksiyon sonrası pH değişiminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Esteraz aktivitesi reaksiyonu, farklı pH' lara sahip tamponlarda (Tris-SO₄; 20 mM; pH 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 ve 9) gerçekleştirilip reaksiyon tamamlandıktan sonra ortam yüksek konsantrasyona sahip sabit pH' lı tamponla (Tris-SO₄; 1 M; pH 8) ayarlanarak 348 ve 400 nm' de spektrofotometrik okuma yapılmıştır. Tablo 10' da bulunan çözeltiler verilen hacimlerde pipetlenerek reaksiyon sırasında pH değişiminin esteraz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her bir reaksiyon iki paralel çalışılıp, ortalama absorbans değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

Tablo 9. Esteraz aktivitesi üzerine reaksiyon sonrası pH değişim etkisinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler

Kullanılan Çözeltiler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Reaksiyon Tamponu (Tris-SO ₄ ; 0,05 M; pH 7)	2500	2500
Enzim çözeltisi	-	100
Saf su	100	-
<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi	1500	1500
pH Ayarlama Tamponu (Tris-SO ₄ ; 0,5 M; pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10)	1500	1500
Toplam hacim	5600	5600

Tablo 10. Esteraz aktivitesi üzerine reaksiyon sırası pH değişim etkisinin in vitro olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler

Kullanılan Çözeltiler	Kontrol (µL)	Numune (µL)
Reaksiyon Tamponu (Tris-SO ₄ ; 20 mM; pH 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 ve 9)	2500	2500
Enzim çözeltisi	-	100
Saf su	100	-
<i>p</i> -nitrofenil asetat çözeltisi	1500	1500
pH Ayarlama Tamponu (Tris-SO ₄ ; 1 M; pH 8)	1500	1500
Toplam hacim	5600	5600

2.3.3. On-line HPLC' ye Adaptasyon Öncesi HPLC ile FIA Modunda Denemeler

Esteraz aktivite ölçüm yöntemi, HPLC' ye adapte edilmeden önce HPLC ile FIA modunda BCA standart proteini kullanılarak kromatografik ayırım üzerine akış hızlarının etkisi araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar, FIA modu ile ulaşılan verilere on-line HPLC sistemi ile de ulaşmanın mümkün olduğunu göstermiştir.

2.3.3.1. HPLC Hareketli Faz Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

FIA modunda esteraz aktivite ölçümü üzerine HPLC hareketli faz akış hızının etkisini görebilmek için şırınga pompanın akış hızı sabit tutulup, HPLC hareketli faz akış hızı belirli oranlarda farklılaştırılmıştır. HPLC ile FIA modunda CA' nın esteraz aktivitesinin belirlenmesi adına BCA enzimi sisteme enjekte edilerek iki paralel olacak şekilde akış hızı aktivite ilişkisi araştırılmıştır.

2.3.3.2. Şırınga Pompa Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

FIA modunda esteraz aktivite ölçümü üzerine şırınga pompa akış hızının etkisini görebilmek için HPLC hareketli faz akış hızı sabit tutulup, şırınga pompa akış hızı belirli oranlarda farklılaştırılmıştır. HPLC ile FIA modunda CA' nın esteraz aktivitesinin belirlenmesi adına BCA enzimi sisteme enjekte edilerek iki paralel olacak şekilde akış hızı aktivite ilişkisi araştırılmıştır.

2.3.4. On-line HPLC Sistemi ile Kromatografik Denemeler

2.3.4.1. Tris ve Fosfat Tamponlarının Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

BCA enziminin ayrımı, izokratik elüsyon modunda Tris-SO₄ veya fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile boyut dışlama kolonunda kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. Farklı tampon sistemleri ile elde edilen esteraz aktivitesinden sorumlu piklerin karşılaştırılması yapılmıştır.

2.3.4.2. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

BCA enziminin ayrımı, izokratik elüsyon modunda fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile boyut dışlama kolonunda kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (*p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. Farklı konsantrasyonlu substrat çözeltileri hazırlanıp şırınga pompa ile sisteme gönderildiği zaman elde edilen esteraz aktivitesinden sorumlu piklerin karşılaştırılması yapılmıştır.

2.3.4.3. KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kromatografik Sistemde Belirlenmesi

Boyut dışlama kolonları (SEC) ile protein ayrımları yapılırken pH seviyesi 5-8,5 ve konsantrasyonu 0,1-0,5 M aralığında olan tampon çözeltiler hareketli faz olarak tercih edilmektedir. Düşük pH (< 4) ve düşük iyonik şiddeti (< 0,05 M) ayırım üzerine olumsuz etki etmektedir. Bu olumsuz etkiler ancak tampon pH' ısı ya da iyonik şiddetinin artırılmasıyla ortadan kaldırılabilir. Bu amaçla elektrostatik etkileşimleri en aza indirmek için protein ayrımlarında kullanılan tampon çözeltilere farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,4 M) tuz çözeltileri ilave edilmektedir. Fakat protein ayırımından ziyade protein aktivitelerinin önemli olduğu çalışmalarda eklenen tuz çözeltilerinin aktivite üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

BCA enziminin ayrımı, izokratik elüsyon modunda Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ve aynı tampon sisteminin KCl içeren farklı bir kompozisyonu ile boyut dışlama kolonunda kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına şırınga pompa ile sisteme taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilmiştir. Tampon sistemi içerisinde KCl' nin bulunma durumuna göre elde edilen esteraz aktivitesinden sorumlu piklerin karşılaştırılması yapılmıştır.

2.3.4.4. Akış Hızı ve Enzimatik Reaksiyonun Dedeksiyon Üzerine Etkisinin Araştırılması

HPLC sisteminde, akış hızı azaldığı zaman kolonda ayrılan numunelerin dedektör önünden geçiş süreleri artacağı için dedeksiyon bakımından pik alanının da bu süreyle orantılı olarak artması beklenmektedir. Bu doğrultuda akış hızının azalmasının sadece dedektörün önünde geçen süreyle orantılı olarak mı, yoksa aynı zamanda artan bu süre zarfında meydana gelen reaksiyon artışı ile de orantılı bir şekilde aktivite artışıyla ilgili olarak mı dedeksiyona etki ettiği araştırılmıştır.

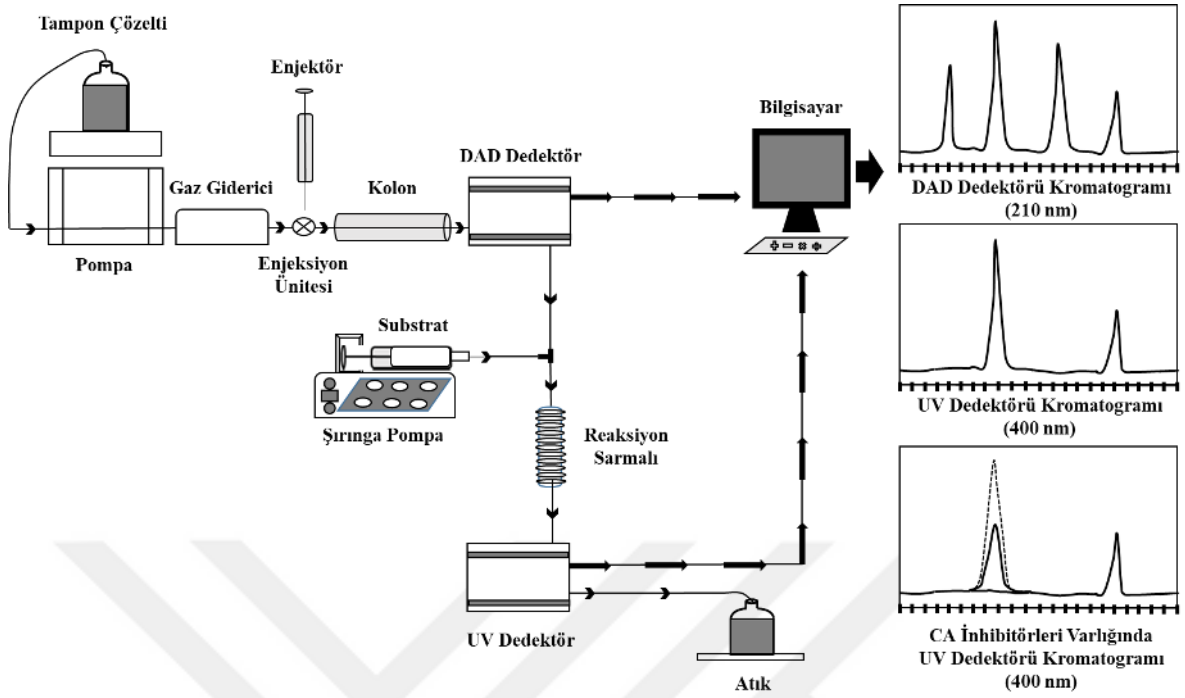
Dedeksiyonun sadece akış hızıyla orantılı olarak ne kadar değiştiğini belirlemek adına bozulmuş substrat enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk) sisteme gönderilmiştir. Aynı zamanda şırınga pompadan 0,3 mL/dk akış hızında sisteme saf su gönderilerek 400 nm dalga boyunda elde edilen kromotogramlarda bozulmuş substratın verdiği pik alanları belirlenmiştir.

Dedeksiyonun, akış hızının yanı sıra aynı zamanda azalan akış hızı sonucu reaksiyon ilerleyişi ile de değiştiğini belirlemek adına BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk) sisteme gönderilmiştir. Aynı zamanda şırınga pompadan 0,3 mL/dk akış hızında sisteme taze hazırlanmış substrat gönderilerek 400 nm' de elde edilen kromotogramlarda BCA enziminin verdiği aktivite pik alanları belirlenmiştir.

Farklı akış hızlarında, enzim varlığında ve yokluğunda elde edilen piklerin alanları karşılaştırılarak dedeksiyon üzerine akış hızının etkisi belirlenmiştir.

2.3.5. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi

HPLC sisteminde yöntem geliştirirken, hareketli fazın bileşimi ve oranının ayırma boyunca sabit kaldığı izokratik elusyon kullanılmıştır. Hareketli fazı oluşturan farklı tampon sistemleri, farklı hareketli faz akış hızları, farklı şırınga pompa akış hızları, protein ayırımı ve esteraz aktivitesi tespiti adına farklı dalga boyları denenerek yöntemin geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla FIA modunda yapılan tüm denemelerde elde edilen bilgilerden faydalanılmıştır.



Şekil 12. Geliştirilen on-line HPLC-Karbonik anhidraz enzim tayin yöntemi sistemi

İlk defa geliştirilen bu on-line HPLC-CA enzim tayin yönteminde, protein karışımları HPLC ile bileşenlerine ayrılıp DAD dedektörü ile kromatogramları 210 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Aynı zamanda sisteme birinci dedektör sonrasında şırınga pompa yardımıyla substrat enjekte edilerek ayrılan proteinlerin esteraz aktivitesine sahip olup olmadıkları UV dedektör aracılığı ile 400 nm dalga boyunda takip edilmiştir. UV dedektör ile 400 nm’ de tespit edilen enzimin esteraz aktivite pikleri, asetazolamid ve sülfanilamid gibi spesifik CA inhibitörleri ile muamele edilip enzimin karbonik anhidraz mı yoksa başka bir esteraz mı olduğu tespit edilmiştir.

Geliştirilen on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemine ait kurulum şeması Şekil 12’ de verilmiştir.

Geliştirilen yöntemle, belirli parametreler üzerinden kromatografik çalışmalar uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

2.4. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Optimizasyonu

Geliştirilen on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, akış hızları, tampon çözelti seçimi, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti pH' ısı, reaksiyon sıcaklığı, tübing boyu ve substrat konsantrasyonu parametreleri üzerinden optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları esteraz aktivite kromatogramları için geliştirilmiştir.

2.4.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine HPLC ve Şırınga Pompa Akış Hızlarının Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, hareketli faz olarak belirlenen tampon çözelti ile, sabit hareketli faz konsantrasyonunda, sabit hareketli faz pH' ında, sabit sıcaklıkta, sabit substrat konsantrasyonunda ve sabit tübing boyunda şırınga pompa ile farklı akış hızlarında (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk) sisteme gönderilen substrat ve HPLC pompa ile farklı akış hızlarında (0,5; 0,7 ve 1 mL/dk) sisteme gönderilen tampon çözelti ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının olduğu akış hızları optimum olarak belirlenmiştir.

2.4.2. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Seçiminin Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit sıcaklıkta, sabit substrat konsantrasyonunda, sabit tübing boyunda ve sabit pH' ya sahip farklı konsantrasyonlu (50, 100, 150 ve 200 mM) Tris-SO₄ ve fosfat tamponları ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği tampon çözelti optimum olarak belirlenmiştir.

2.4.3. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit sıcaklıkta, sabit substrat konsantrasyonunda ve sabit tübing boyunda pH' sı 8,2 olan 4 farklı konsantrasyonda hazırlanan (50, 100, 150 ve 200 mM) fosfat tamponu ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği tampon konsantrasyonu optimum olarak belirlenmiştir.

2.4.4. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit sıcaklıkta, sabit substrat konsantrasyonunda, sabit tampon konsantrasyonunda ve sabit tübing boyunda farklı pH değerlerine (7; 7,4; 7,8 ve 8,2) sahip olan fosfat tamponu ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği pH optimum olarak belirlenmiştir.

2.4.5. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit substrat konsantrasyonunda, sabit tampon konsantrasyonunda, sabit tübing boyunda ve sabit pH' da farklı sıcaklık değerlerinde (25, 30, 35, 40, 45, 50 °C) meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği sıcaklık optimum olarak belirlenmiştir.

2.4.6. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tübing Boyunun Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit sıcaklıkta, sabit substrat konsantrasyonunda, sabit tampon konsantrasyonunda ve sabit pH' da farklı uzunluklara (2; 2,5 ve 3 m) sahip tübingler kullanılarak meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği tübing boyu optimum olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda reaksiyon süresi araştırılmıştır.

2.4.7. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

On-line HPLC sisteminde sabit konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, sabit HPLC pompa akış hızında, sabit şırınga pompa akış hızında, sabit sıcaklıkta, sabit tampon konsantrasyonunda, sabit pH' da ve sabit tübing boyunda farklı konsantrasyonlara (3, 4 ve 5 mM) sahip substrat (*p*-nitrofenil asetat) çözeltileri kullanılarak meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları değerlendirilmiş ve en yüksek pik alanlarının tespit edildiği substrat konsantrasyonu optimum olarak belirlenmiştir.

2.5. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Validasyonu

Optimize edilmiş on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, Uluslararası Uyumluluk Konferansı (International Conference on Harmonization, ICH)' na göre doğrusallık, doğrusal aralık, tespit (LOD) sınırı, tayin (LOQ) sınırı, kesinlik ve sağlamlık parametreleri üzerinden valide edilmiştir (ICH, 1995). Optimize edilmiş yöntemde, hareketli faz olarak 0,15 M fosfat tamponu (pH 8,2), 0,5 mL/dk HPLC pompa hareketli faz akış hızı, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu ve 3 m tübing boyu kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları ikinci dedektörde elde edilen 400 nm verileri kullanılarak aktivite açısından gerçekleştirilmiştir.

2.5.1. Doğrusallık

Doğrusallık, belirli bir derişim aralığı sınırları içerisinde numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan test sonuçları elde etme yeteneği olarak ifade edilmektedir. Doğrusallık, analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak bir sinyal grafiğinin görsel olarak incelenmesiyle değerdendirilmiştir. Doğrusallığı belirlemek adına farklı BCA konsantrasyonuna (0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 mg/mL) sahip geniş bir aralıkta çalışılmıştır. Grafik üzerinden korelasyon katsayısı (r^2), y eksenini kesme noktası ve regresyon çizgisinin eğimi belirlenmiştir.

2.5.2. Doğrusal Aralık

Doğrusal aralık, yöntemin kanıtlanmış doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet seviyesine sahip olduğu üst ve alt konsantrasyonları da kapsayan aralıktır. Bu aralıkta elde edilen sonuçlar kabul edilebilir bir belirsizlik vermektedir. Doğrusal aralık doğrusallığın belirlenmesi adına oluşturulan kalibrasyon grafiği üzerinden ara konsantrasyon değerdleri de çalışılarak belirlenmiştir. Grafik üzerinden korelasyon katsayısı (r^2), y eksenini kesme noktası ve regresyon çizgisinin eğimi belirlenmiştir.

2.5.3. Tespit (LOD) Sınırı

Tespit sınırı (LOD, Limit of Detection), miktarı kesin bir değerd olarak verilmeksizin bir numunedeki tespit edilebilen en düşük analit miktarıdır. LOD' u belirlemek için yanıt ve eğim yaklaşımlarının standart sapması ve sinyal/gürültü oranları gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu çalışmada, LOD' un belirlenmesi için sinyal/gürültü (3:1) oranı kullanılmıştır. Sinyal/gürültü oranının belirlenmesi, analitin düşük konsantrasyonlu olduğu bilinen numunelerden alınan ölçüm sinyallerinin boş numunelerle karşılaştırılması ve analitin güvenilir bir şekilde tayin edilebileceği minimum konsantrasyonun oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Yapılan çalışmada örnek körünün (içerisinde analit bulunmayan matriks) 2 bağımsız ölçümünün vermiş olduğu gürültülerin ortalaması hesaplanmıştır. Gürültü değeri 3 ile çarpılarak LOD' un sayısal değeri belirlenmiştir. Ayrıca analitin düşük konsantrasyonlu

(0,2 mg/mL) çözeltisi hazırlanarak yapılan 10 bağımsız ölçümünün standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma değeri 3 ile çarpılarak LOD' un sayısal değeri belirlenmiştir.

2.5.4. Tayin (LOQ) Sınırı

Tayin sınırı (LOQ, Limit of Quantification), uygun kesinlik ve doğrulukla bir numunede kantitatif olarak belirlenebilen en düşük analit miktarıdır. LOQ' u belirlemek için yanıt ve eğim yaklaşımlarının standart sapması ve sinyal/gürültü oranları gibi çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu çalışmada, LOQ' un belirlenmesi için sinyal/gürültü (10:1) oranı kullanılmıştır. Sinyal/gürültü oranının belirlenmesi, analitin düşük konsantrasyonlu olduğu bilinen numunelerden alınan ölçüm sinyallerinin boş numunelerle karşılaştırılması ve analitin güvenilir bir şekilde tayin edilebileceği minimum konsantrasyonun oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Yapılan çalışmada örnek körünün (içerisinde analit bulunmayan matriks) 2 bağımsız ölçümünün vermiş olduğu gürültülerin ortalaması hesaplanmıştır. Gürültü değeri 10 ile çarpılarak LOQ' un sayısal değeri belirlenmiştir. Ayrıca analitin düşük konsantrasyonlu (0,2 mg/mL) çözeltisi hazırlanarak yapılan 10 bağımsız ölçümünün standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma değeri 10 ile çarpılarak LOQ' un sayısal değeri belirlenmiştir.

2.5.5. Kesinlik

Kesinlik, herhangi bir analitik yöntem ile tekrarlanan ölçümlerin birbirine olan yakınlığını ifade etmektedir. Yöntemin kesinliği, ICH kılavuzu Q2 (R1)' e göre tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) ve ara kesinlik (günler arası kesinlik) açısından değerlendirilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı konsantrasyon (sırasıyla 0,2 ve 4 mg/mL) ile değerlendirilmiştir. Her konsantrasyon, tekrarlanabilirlik için aynı gün altı tekrarda analiz edilmiştir. Günler arası kesinlik için ise birbirini takip eden iki gün boyunca her bir konsantrasyonun altı tekrarı yapılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinliklerin standart sapması ve % bağıl standart sapması (% RSD) hesaplanmıştır.

2.5.6. Sağlamlık

Sağlamlık, çalışılan parametreler üzerinde kasıtlı olarak yapılan küçük değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür. Ayrıca normal kullanım şartlarında yöntemin güvenilirliğini de göstermektedir. Analitik koşulların değiştirilmesine duyarlı olacak şekilde akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve hareketli fazın konsantrasyonu parametreleri üzerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Akış hızı 0,48 ve 0,52 mL/dk, reaksiyon sıcaklığı 24,5 ve 25,5 °C, hareketli fazın pH' sı 8,15 ve 8,25 ve hareketli fazın konsantrasyonu 0,14 ve 0,16 M olmak üzere iki farklı değerde iki paralel olacak şekilde çalışılmıştır. Yapılan küçük değişikliklerin optimum değerlerde yapılan analiz sonuçları üzerindeki etkileri üzerinden yöntemin sağlamlığı değerlendirilmiştir.

2.6. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Protein Karışımları ve Doğal Numunelere Uygulanması

Optimizasyonu ve validasyonu yapılan on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, protein içeriği bilinen standart protein karışımları ve protein içeriği bilinmeyen bitki ve hayvan dokuları üzerinde uygulanmış ve sonuçlar kayıt altına alınmıştır.

2.6.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi ile Belirlenmesi

Esteraz aktivite tayin yöntemiyle CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi ile kromatografik sistemde belirlenmiştir. Sülfanilamid için Aktivite (%)-[I] grafiği çizilip, bu grafiklerden %50 inhibisyona karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) hesaplanmıştır.

Tablo 11. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine sülfanilamid inhibisyon etkisinin kromatografik olarak incelenmesinde kullanılan çözeltiler ve akış hızları

HPLC Sisteminde Kullanılan Çözeltiler	HPLC Pompa Akış Hızı (mL/dk)	Şırınga Pompa Akış Hızı (mL/dk)
Fosfat tamponu (Hareketli faz: 0,15 M; pH 8,2)	0,5	-
Enzim çözeltisi (2 mg/mL, 20 µL)	0,5	-
İnhibitör (sülfanilamid: 18,75; 9,37; 6; 3 ve 1 µM)	-	0,3
<i>p</i> -nitrofenil asetat (5 mM)	-	0,3

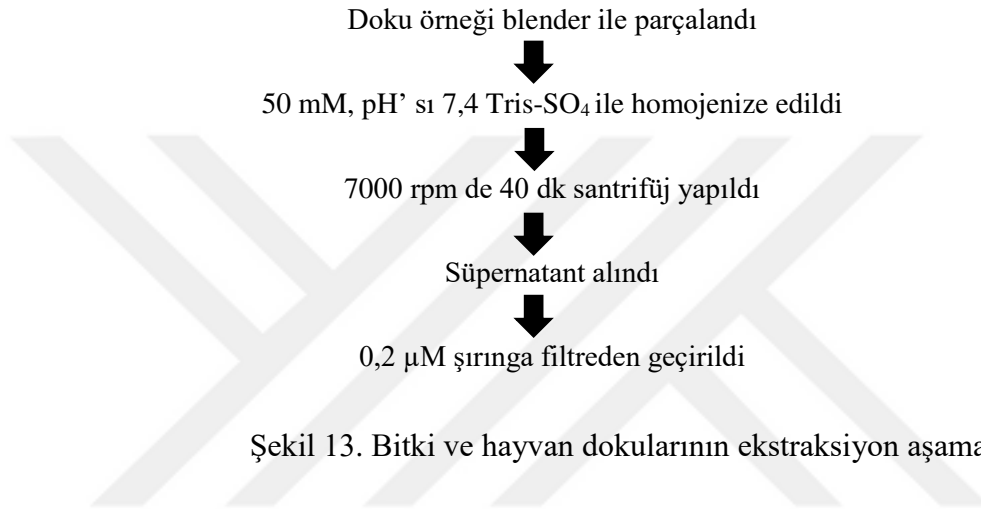
Tablo 11’ de bulunan çözeltiler belirtilen konsantrasyon ve akış hızlarında HPLC pompa ve şırınga pompa yardımıyla HPLC sistemine gönderilmiştir. Ayrıca, 2 mg/mL konsantrasyonlu 20 µL BCA enzim çözeltisi enjeksiyon ünitesinden sisteme enjekte edilmiştir. Protein ayrımı takibi 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilip esteraz aktivitesi 400 nm dalga boyunda tespit edilmiştir. Substrat, inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (18,75; 9,37; 6; 3 ve 1 µM) inhibitör içerecek şekilde sisteme gönderilerek aktiviteden sorumlu pik alanları belirlenmiştir. Pik alanına karşı sülfanilamid konsantrasyonu grafiği üzerinden BCA enziminin %50 inhibisyonuna sebep olan sülfanilamid konsantrasyonu belirlenmiştir. Her bir çalışma iki paralel çalışılıp, ortalama pik alanı kullanılarak hesaplama yapılmıştır.

2.6.2. Protein İçeriği Bilinen Standart Protein Karışımlarının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması

Esteraz aktivitesine sahip BCA ve Esteraz X enzimleri belirli konsantrasyon ve hacimlerde karıştırılarak protein içeriği bilinen standart bir protein karışımı oluşturulmuştur. Bu standart protein karışımı valide edilmiş on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemine optimum çalışma şartlarında uygulanmıştır. Esteraz aktiviteleri 400 nm dalga boyundaki pik alanları üzerinden tespit edilen proteinler, CA’ nın standart inhibitörü olan sülfanilamid çözeltisi ile reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyon sonucunda pik alanı azalan veya tamamen yok olan proteinler takip edilerek CA tayini yapılmıştır.

2.6.3. Protein İçeriği Bilinmeyen Bitki ve Hayvan Dokularının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması

Bitki ve hayvan dokularının seçimi yapılırken daha önce uygulanmış olan benzer literatür çalışmaları dikkate alınmıştır. Deneylerde kullanılan bitkiler (ıspanak, brokoli ve kereviz) manavdan, hayvan dokusu (sığır karaciğeri) ise kasaptan temin edilmiştir. Taze olarak çalışılan dokulara ait ekstraksiyon basamakları şekildeki gibidir (ekil 13).



Şekil 13. Bitki ve hayvan dokularının ekstraksiyon aşamaları

Taze olarak hazırlanan protein içeriği bilinmeyen bitki ve hayvan doku ekstraktları valide edilmiş on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemine optimum çalışma şartlarında uygulanmıştır. Her bir ekstraktın protein ayırımı takibi 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilip, esteraz aktiviteleri 400 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Esteraz aktiviteleri pik alanları üzerinden tespit edilen proteinler, CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid çözeltisi ile reaksiyona sokulmuştur. Bu amaçla inhibitör substrat çözeltisine eklenmiştir. Bu reaksiyon sonucunda pik alanı azalan veya tamamen yok olan proteinler takip edilerek CA tayini yapılmıştır.

2.6.4. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Pik Alanları Üzerinden Verilen Esteraz Aktivite Değerlerinin Enzim Ünitesine Dönüştürölmesi

Enzim ünitesi, 25 °C de, bir dakikada, optimal koşullar altında 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Enzim ünitesinin tanımından yola çıkarak optimum şartlar altında bir dakikada ürün oluşumu spektrofotometrik olarak absorbans değişimi

üzerinden takip edilmiştir. Aynı şartlar altında aynı çalışma kolon kullanılmadan FIA modunda HPLC sistemine uygulanmış ve dakikadaki ürün oluşumu, pik alanları üzerinden takip edilmiştir. Oluşan *p*-nitrofenol derişimi, Beer-Lambert yasası üzerinden molar absorptivite değeri kullanılarak spektrofotometrik olarak hesaplanarak enzim ünitesine dönüştürülmüştür. Hesaplanan spektrofotometrik enzim ünitesi miktarına karşılık gelen kromatografik pik alanı belirlenmiştir. Esteraz aktivitesine karşılık gelen pik alanları, 1 enzim ünitesine karşılık gelen pik alanına bölünerek sonuçlar enzim ünitesi şeklinde ifade edilmiştir. Bütün çalışmalar üç paralel olacak şekilde yapılmıştır.

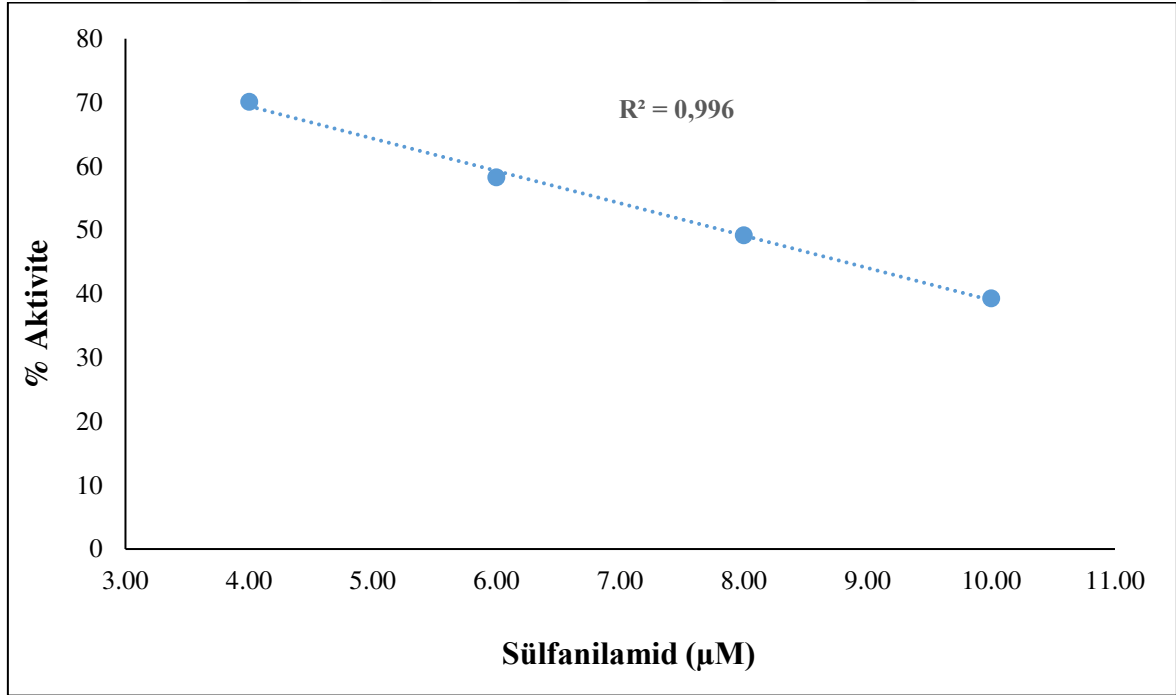


3. BULGULAR

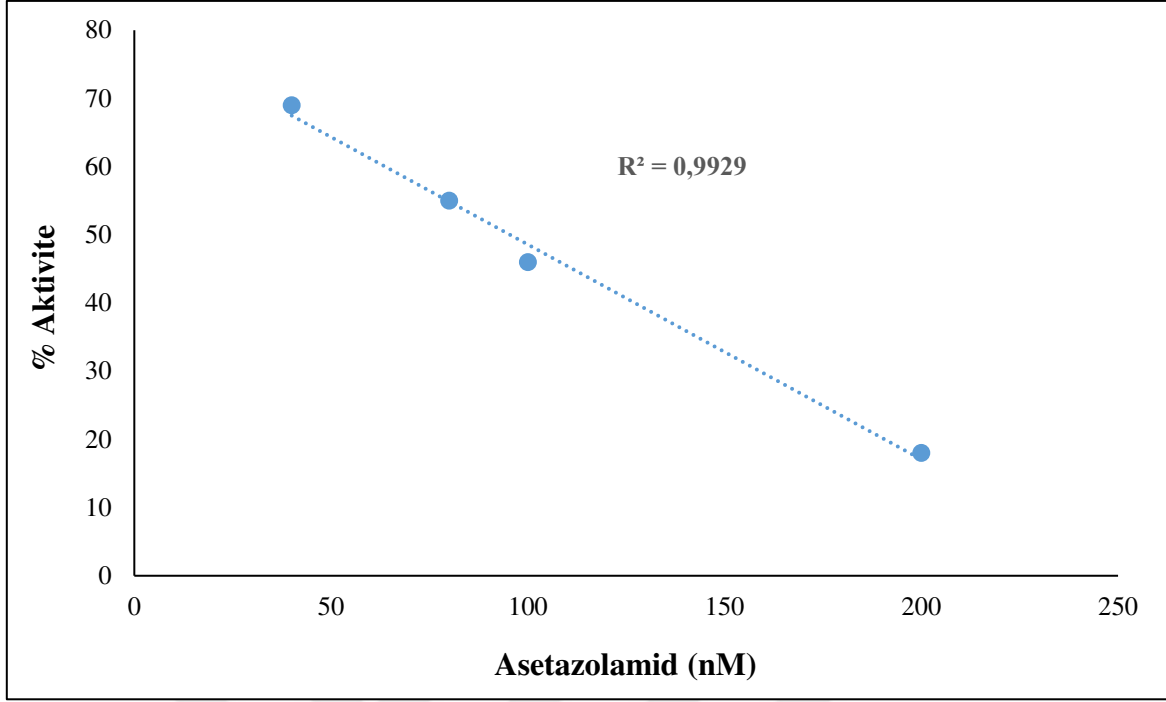
3.1. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntem Geliştirme Öncesi Yapılan Çalışmalar

3.1.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Asetazolamid ve Sülfanilamidin IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Esteraz aktivite tayin yöntemiyle CA' nın standart inhibitörleri olan asetazolamid ve sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Her bir standart inhibitör için Aktivite (%)-[I] grafikleri çizilip, bu grafiklerden %50 inhibisyona karşılık gelen inhibitör konsantrasyonları (IC₅₀) hesaplandı. Sülfanilamid için IC₅₀ değeri 7,83 µM olarak bulunurken asetazolamid için bu değer 95,48 nM olarak tespit edildi (Şekil 14-15).



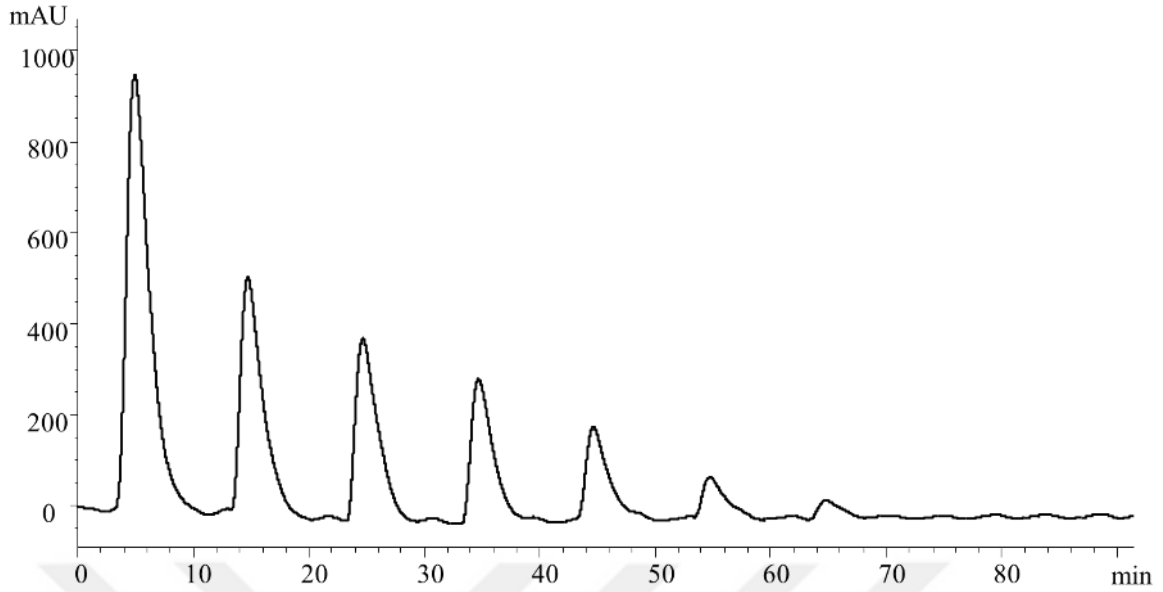
Şekil 14. BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı sülfanilamid konsantrasyonu ile IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği



Şekil 15. BCA enziminin esteraz aktivite metodu ile çalışılan 4 farklı asetazolamid konsantrasyonu ile IC_{50} değerinin bulunması için çizilen % Aktivite-[Asetazolamid] grafiği

3.1.2. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC ile FIA modunda BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına farklı konsantrasyonlarda (2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL) BCA enzimi hazırlanarak on dakika aralıklarla HPLC sistemine enjekte edildi. Konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak pik boyutunun da arttığı tespit edildi (Şekil 16). Yapılan çalışmanın sonuçları, HPLC sisteminde FIA modunda BCA enziminin esteraz aktivitesinin tespitinin yapılabileceğini gösterdi.

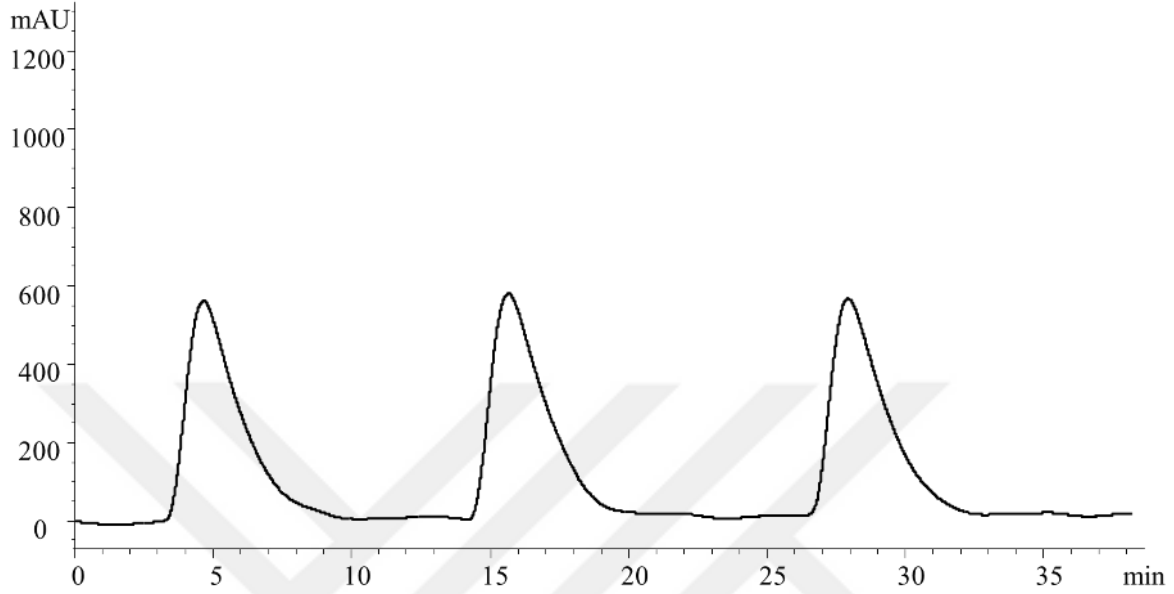


Şekil 16. Farklı konsantrasyonlardaki (2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL) BCA enziminin HPLC ile FIA modunda 348 nm dalga boyunda verdiği kromatogram

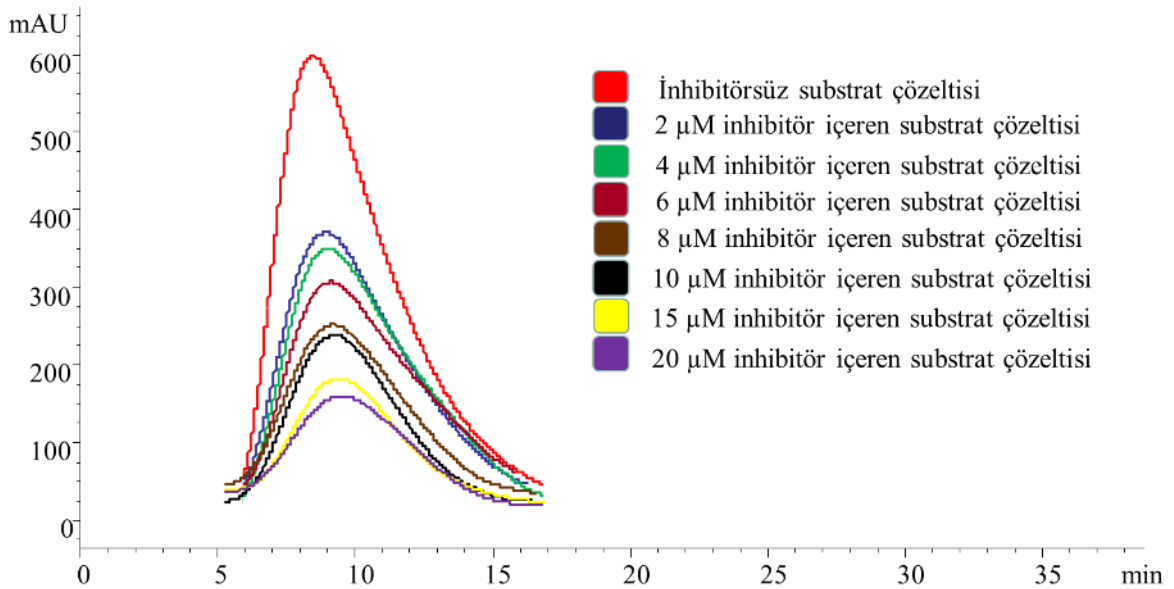
3.1.3. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC_{50} Değerinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC ile FIA modunda esteraz aktivite tayin metoduyla CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC_{50} değerini belirleyebilmek adına 1 mL hacimli farklı konsantrasyonlardaki (600, 450, 300, 240, 180, 120 ve 60 μ M) sülfanilamid çözeltileri 14 mL substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) çözeltisiyle karıştırılarak şırınga pompa ile HPLC sistemine gönderildi. Ayrıca inhibitörsüz substrat çözeltisi de şırınga pompa ile HPLC sistemine gönderildi. HPLC pompa ve şırınga pompa akış hızları 0,2 mL/dk olarak ayarlandı. Enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği tübingin boyu 3 m olarak ayarlandı. HPLC sisteminde hareketli faz olarak pH' sı 7,4 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu kullanılıp enjeksiyon noktasından sisteme 1 mg/mL BCA enzimi enjekte edildi. Her bir analiz üç paralel olacak şekilde yapıldı. Sülfanilamid çözeltilerinin tüm konsantrasyonları için aktiviteden sorumlu pik alanları hesaplanarak sülfanilamid için IC_{50} değeri belirlendi. İnhibitörsüz substrat kullanılarak elde edilen üç paralel aktivite piki tespit edildi (Şekil 17). İnhibitörsüz substrat ve farklı konsantrasyonlarda (600, 450, 300, 240, 180, 120 ve 60 μ M) sülfanilamid çözeltileri içeren substrat çözeltilerine ait aktivite pikleri tespit edildi (Şekil 18). İnhibitör konsantrasyonu arttıkça aktiviteden sorumlu piklerin küçüldüğü görüldü. HPLC ile FIA modunda esteraz aktivite tayin metoduyla CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için

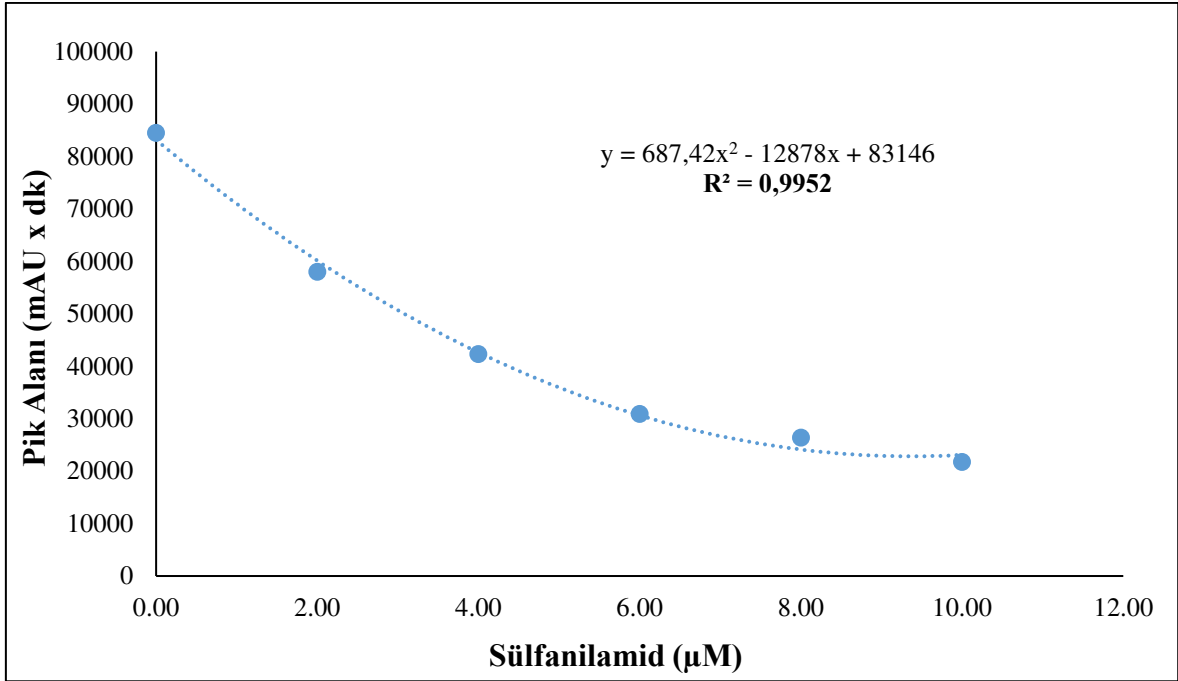
inhibitör konsantrasyonuna karşı pik alanı grafiğinden faydalanılarak IC_{50} değeri $4,21 \mu M$ olarak belirlendi (Şekil 19).



Şekil 17. 1 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 348 nm dalga boyunda elde edilen üç paralel aktivite pikini gösteren kromatogram



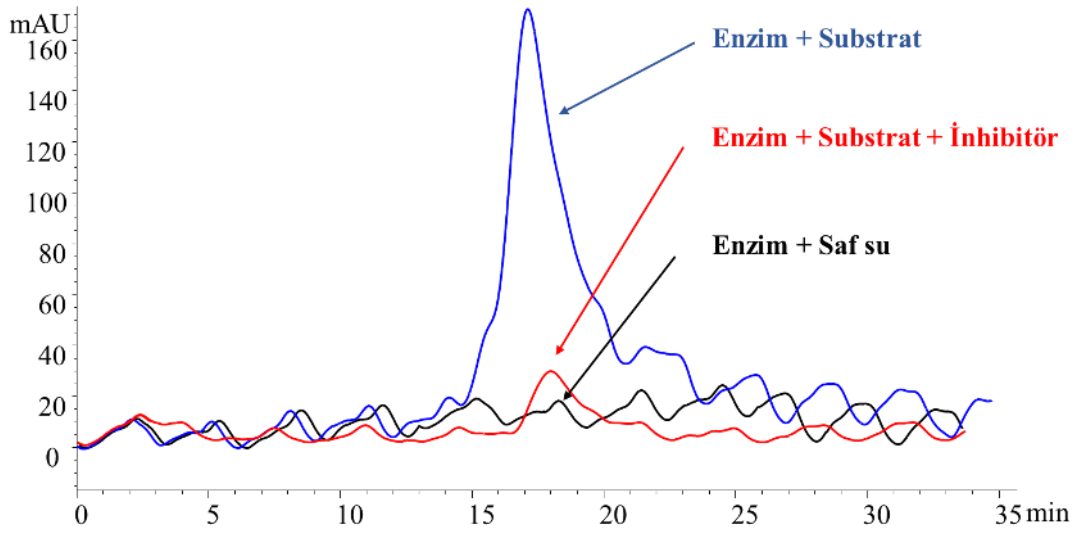
Şekil 18. 1 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (2, 4, 6, 8, 10, 15 ve 20 μM sülfanilamid) inhibitör içeren substrat çözeltisiyle reaksiyonu sonucu 348 nm dalga boyunda elde edilen aktivite pikleri



Şekil 19. HPLC ile FIA modunda 348 nm dalga boyunda esteraz aktivite tayin metoduyla CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC₅₀ değerinin bulunması adına çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği

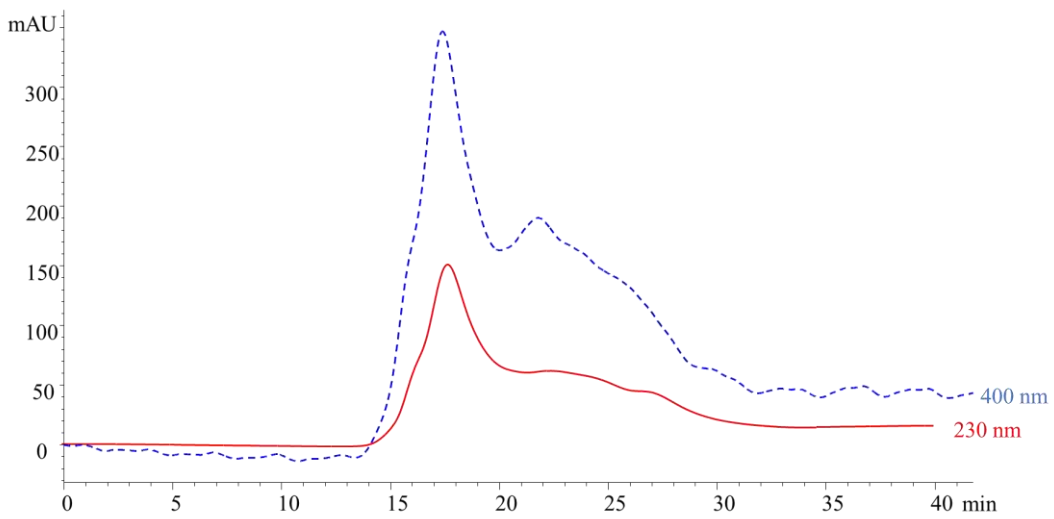
3.1.4. BCA Enziminin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

BCA enziminin kromatografik ayrımı ve esteraz aktivitesinin belirlenmesi adına, 5 mg/mL BCA enziminin akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,25 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm de ayrımı gerçekleştirildi. Karbonik anhidraz enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına ise ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat gönderildi ve 348 nm de aktivite piki tespit edildi. Aktivite pikinin karbonik anhidraz enzimine ait olduğunu ispat etmek adına ayrıca ikinci pompadan sisteme saf su ve IC₅₀ konsantrasyonunda (8 µM) olacak şekilde ayarlı inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileri ayrı ayrı gönderildi. Saf su gönderildiğinde hiçbir aktivite görünmezken, substrat içerisinde inhibitör bulunan çözelti gönderildiği zaman aktivitenin azaldığı tespit edildi (Şekil 20). Böylelikle yapılan çalışmalarla yöntem geliştirme noktasında karbonik anhidrazın ayrımının ve aktivitesinin tespiti noktasında önemli bir başarıya ulaşıldı.



Şekil 20. Karbonik anhidraz enziminin esterez aktivitesini belirlemek adına ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile gönderilen substrat, saf su ve inhibitör içeren substrat çözeltilerinin 348 nm dalga boyunda verdiği aktivite piklerine ait kromatogramlar

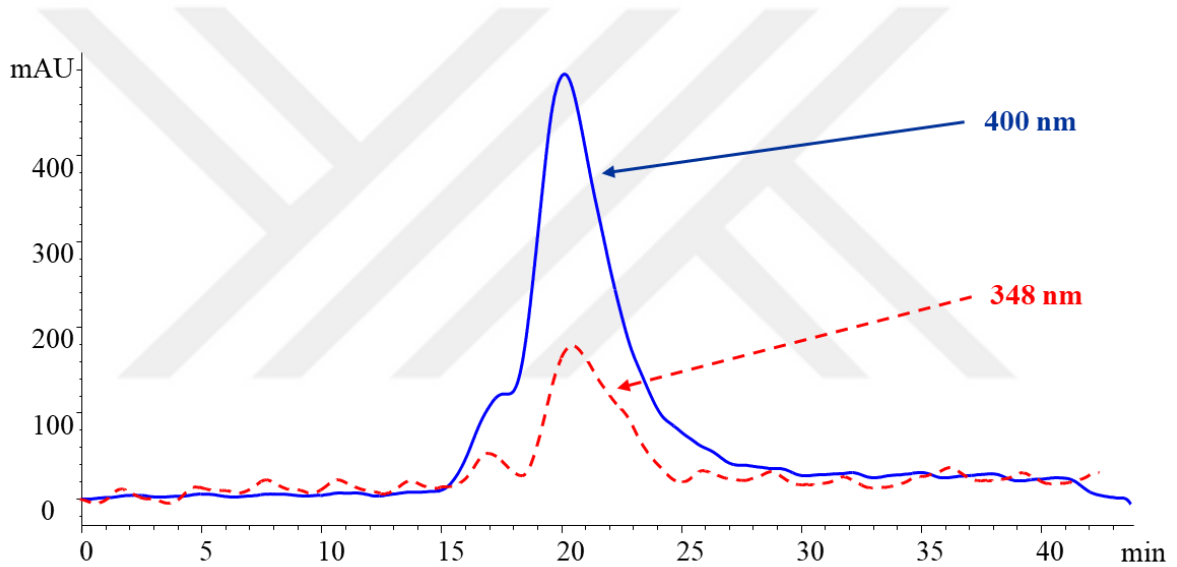
5 mg/mL BCA enziminin kromatografik ayrımı, akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,1 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirildi. BCA enziminin esterez aktivitesini belirleyebilmek adına ise ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderildi ve 400 nm' de aktivite piki tespit edildi (Şekil 21).



Şekil 21. 5 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyundaki kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esterez aktivite piki

3.1.5. BCA Enziminin Kromatografik Aktivite Tayininde Ölçüm Dalgaboyunun Araştırılması

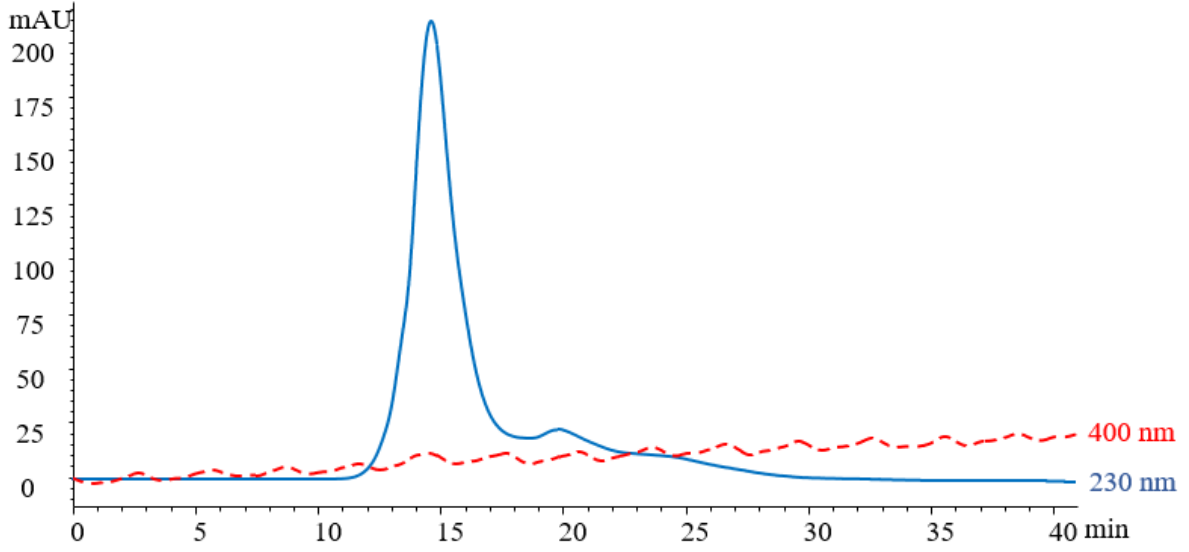
5 mg/mL konsantrasyonlu BCA enziminin ayrımı, akış hızı 0,5 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile kromatografik olarak gerçekleştirildi. BCA enziminin esterez aktivitesini belirleyebilmek adına ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat çözeltisi (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilerek 348 ve 400 nm dalga boylarında aktivite pikleri arandı (Şekil 22). Esteraz aktivitesine ait sinyalin 400 nm dalga boyunda en az iki kat daha fazla olduğu tespit edildi.



Şekil 22. 5 mg/mL konsantrasyonlu BCA enziminin farklı dalga boylarında (348 ve 400 nm) verdiği esterez aktivite pikleri

3.1.6. BSA Proteininin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

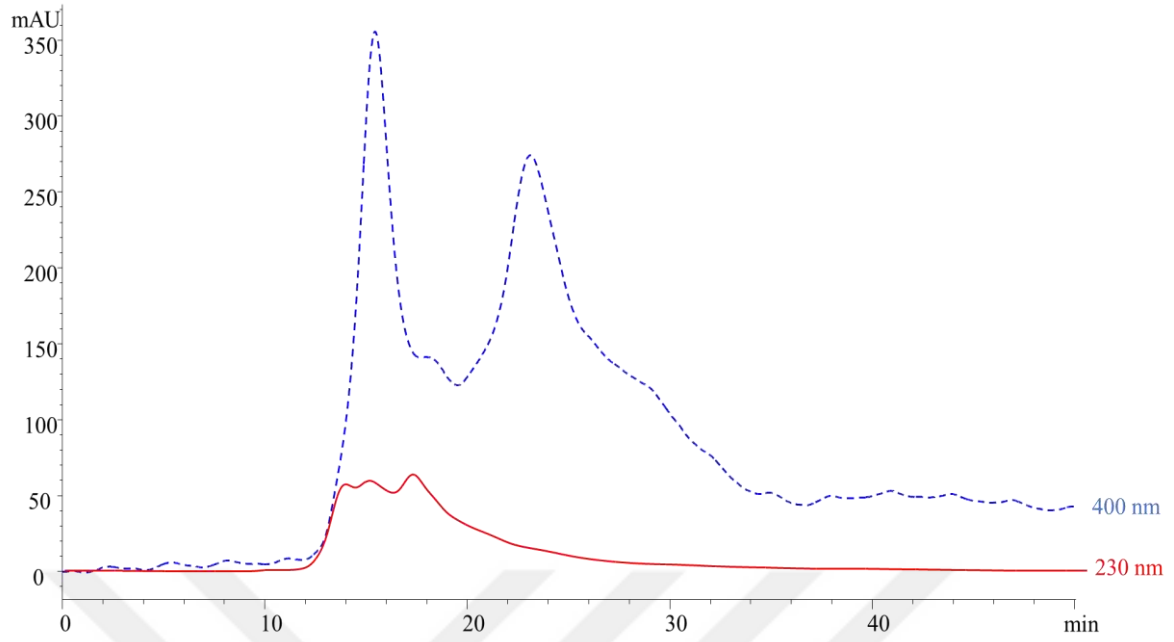
On-line HPLC sisteminde, 5 mg/mL BSA proteininin kromatografik ayrımı, akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,2 olan 0,1 M Fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirildi. BSA proteininin esterez aktivitesini belirleyebilmek adına ise ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat gönderildi ve 400 nm de aktivite piki arandı (Şekil 23). BSA proteininin yok denecek kadar az miktarda esterez aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 23. 5 mg/mL BSA proteininin 230 nm dalga boyundaki kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivite kromatogramı

3.1.7. Sığır Karaciğer Ekstresinin Kromatografik Ayrımı ve Esteraz Aktivitesinin Belirlenmesi

Sığır karaciğer ekstresinin HPLC’ de ayrımı, akış hızı 0,7 mL/dk ve pH’ sı 8,3 olan 0,1 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz sistemi ile 230 nm’ de gerçekleştirildi. Sığır karaciğer ekstresinin esteraz aktivitesini belirleyebilmek adına ise ikinci pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderildi ve 400 nm de aktivite piki arandı (Şekil 24). Sığır karaciğer ekstresinden protein ayrımının gerçekleştiği ve ayrımı yapılan bazı proteinlerin esteraz aktivitesine sahip olduğu tespit edildi.

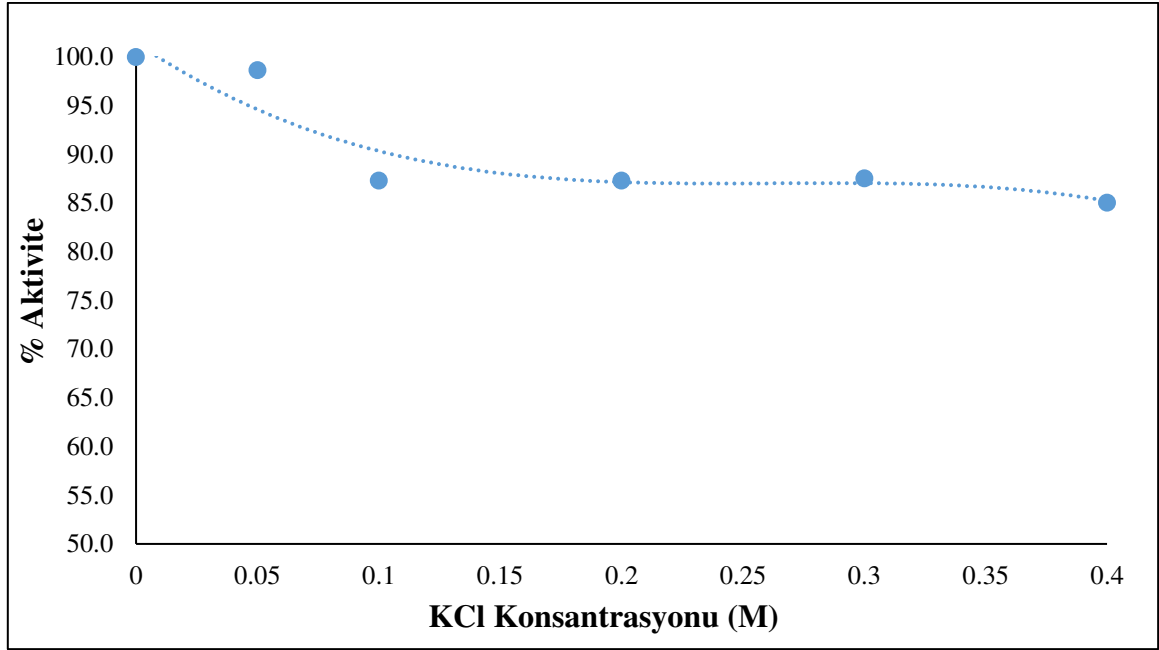


Şekil 24. Sığır karaciğer ekstresinin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivite tespiti

3.2. Geliştirilen On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi

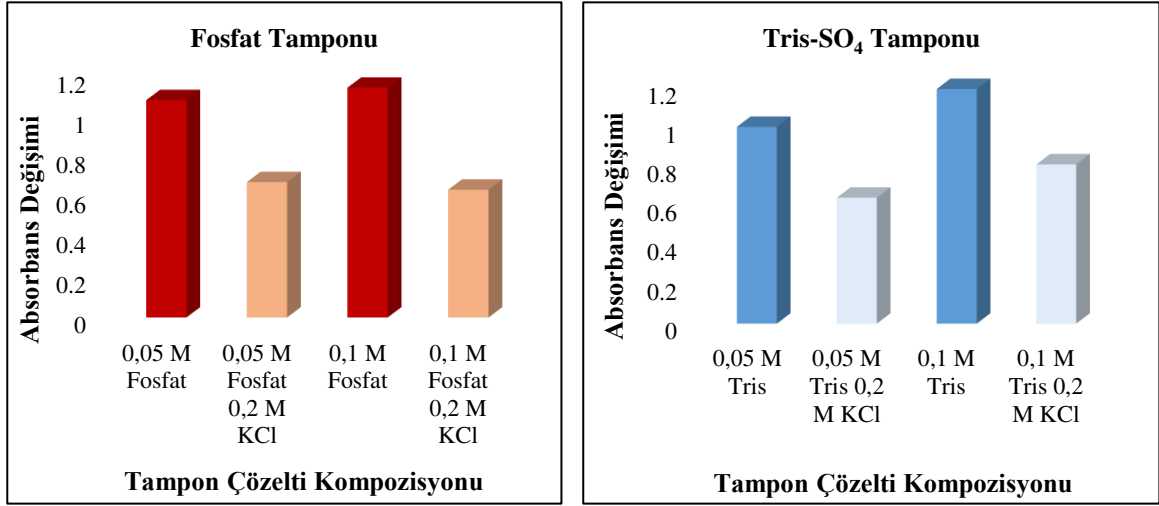
3.2.1. KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

İyonik şiddetin etkisinin ortadan kaldırılması adına HPLC çalışmalarında kullanılan tampon çözeltilerde sıklıkla tercih edilen KCl' nin esteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. pH' sı 8,3 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu ve aynı tamponun farklı konsantrasyonlarda (0,40; 0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M) KCl içeren çözeltileri hazırlanarak 348 nm dalga boyunda esteraz aktiviteleri çalışıldı. KCl yokluğunda aktivite %100 kabul edilerek farklı konsantrasyonlardaki KCl' nin esteraz aktivitesi üzerindeki inhibisyon yüzdesi tespit edildi. KCl konsantrasyonu 0,4 M olunca esteraz aktivitesinde %15' lik bir aktivite kaybı olduğu tespit edildi (Şekil 25).

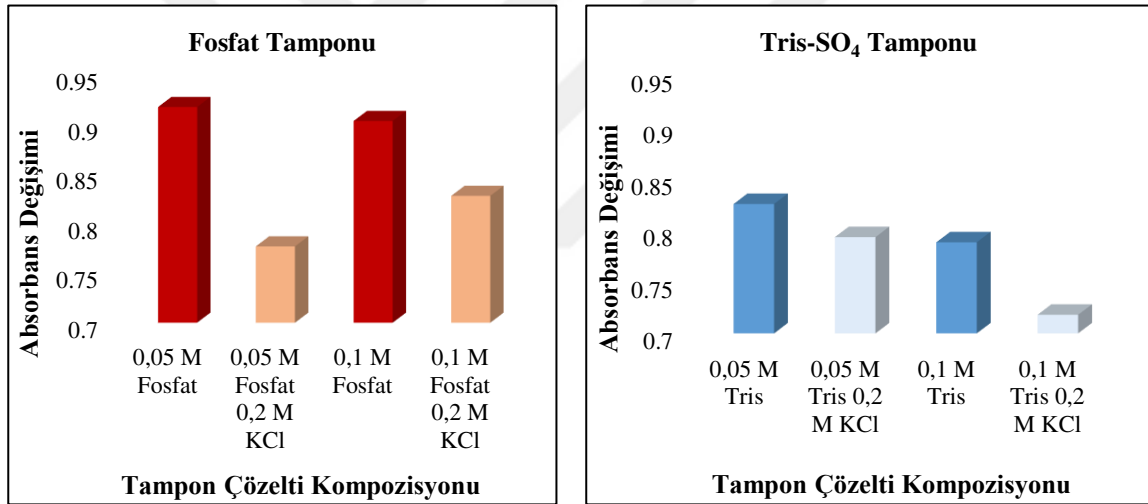


Şekil 25. Esteraz aktivite metodu ile çalışılan 5 farklı KCl konsantrasyonunda (0,40; 0,30; 0,20; 0,10 ve 0,05 M) % Aktivite grafiği

pH' sı 7,4 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponları ve bu tamponların 0,2 M KCl içeren kompozisyonları hazırlandı. 0,1 mg/mL BCA enzimi ve 3 mM *p*-nitrofenilasetat çözeltisi kullanılarak 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak esteraz aktivite tayini yapıldı. En yüksek esteraz aktivitesi 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponları kullanıldığı zaman elde edildi (Şekil 26). Reaksiyon ortamında bulunan 0,2 M KCl' nin her iki tampon için de esteraz aktivitesini baskıladığı tespit edildi. pH 7,4 olduğu zaman aktivite kaybının %45 seviyelerine kadar çıktığı, pH 8,2 olduğu zaman ise aktivite kaybının %15 seviyelerinde kaldığı tespit edildi (Şekil 26 ve Şekil 27).



Şekil 26. 0,2 M KCl' nin, pH' sı 7,4 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponları ile spektrofotometrik olarak tespit edilen esteraz aktivitesi üzerine etkisi

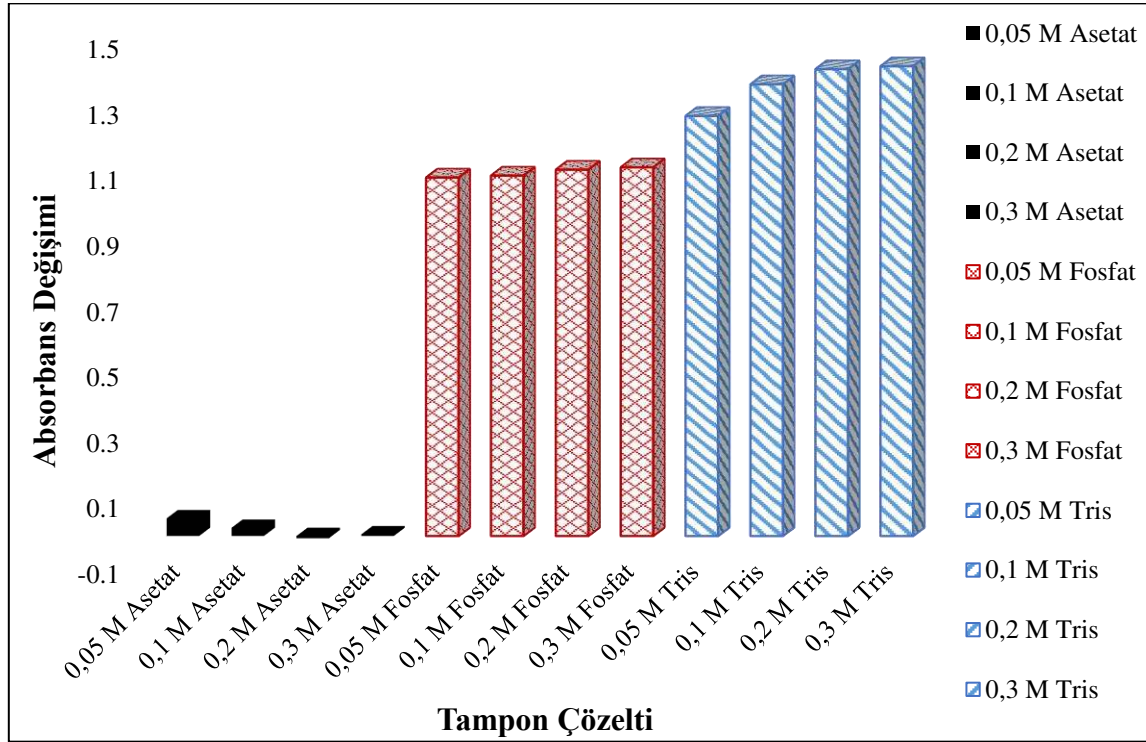


Şekil 27. 0,2 M KCl' nin, pH' sı 8,2 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponları ile spektrofotometrik olarak tespit edilen esteraz aktivitesi üzerine etkisi

3.2.2. Tampon Seçiminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Yöntemle Değerlendirilmesi

Boyut dışlama kolonları (SEC) protein ayırmaları için HPLC çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde SEC kolonları ile protein ayırımı için pH' sı 5,5 olan asetat, pH' sı 7 olan fosfat ve pH' sı 7,4 olan Tris-SO₄ tamponlarının kullanıldığı belirlendi ve bu tamponların farklı konsantrasyonları (0,05; 0,10; 0,20 ve 0,30 M) hazırlanarak esteraz aktivitesi üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemle 348 nm dalga boyunda tespit edildi.

Fosfat tamponu ve Tris-SO₄ tamponu tercih edildiği zaman yüksek esteraz aktivitesi elde edilirken, asetat tamponu tercih edildiğinde çok düşük esteraz aktivitesi tespit edildi (Şekil 28). Bu çalışmanın ışığında sonraki çalışmalar için esteraz aktivitesi belirleme noktasında Tris-SO₄ ve fosfat tamponlarının kullanılmasının uygun olduğuna karar verildi.



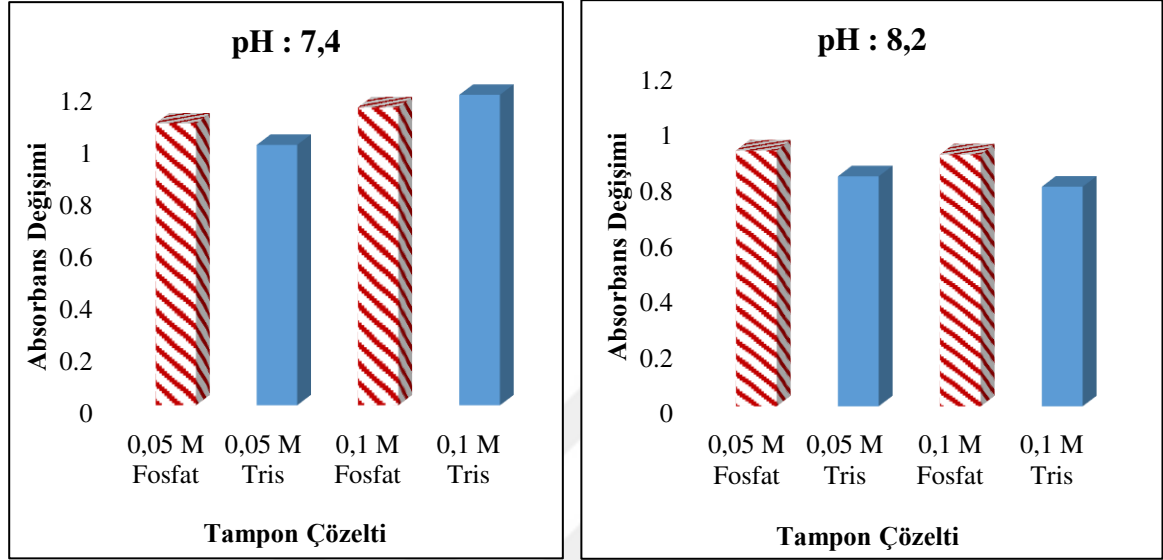
Şekil 28. Farklı konsantrasyonlu (0,05; 0,10; 0,20 ve 0,30 M) farklı tamponların (Tris-SO₄, Fosfat, Asetat) esteraz aktivitesi üzerindeki etkilerinin 348 nm dalga boyunda in vitro olarak spektrofotometrik sonuçları

3.2.3. pH' nın Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi

Yapılarında negatif yükler bulunan boyut dışlama kolonları (SEC) ile protein ayırma çalışmaları yapılırken peptit yapılarının pozitif yüklü yan grupları ile istenmeyen elektrostatik etkileşimler oluşabilmektedir. Bu etkileşimlerin ortadan kaldırılması hem kolon performansı hem de biyolojik aktivitenin ölçülebilmesi adına oldukça önemlidir. Bu çalışmada, pH değişiminin ayırma performansı ve özellikle esteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

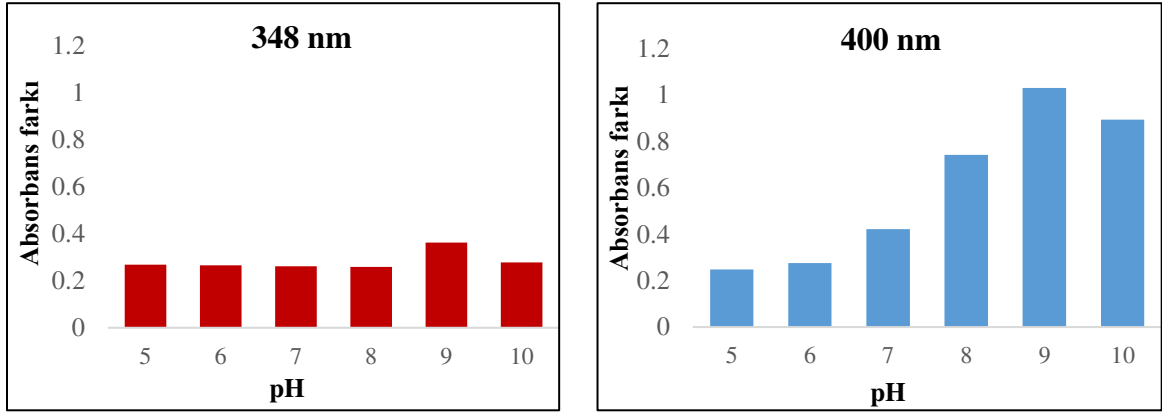
pH' sı 7,4 ve 8,2 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponları hazırlandı. 0,1 mg/mL BCA enzimi ve 3 mM *p*-nitrofenil asetat çözeltisi kullanılarak 400 nm dalga boyunda

spektrofotometrik olarak esteraz aktivite tayini yapıldı. pH 7,4 olduğu zaman 0,1 M Tris-SO₄ tamponunda daha yüksek esteraz aktivitesi tespit edilirken, pH 8,2 olduğu zaman 0,05 M fosfat tamponunda daha yüksek esteraz aktivitesi tespit edildi (Şekil 29).



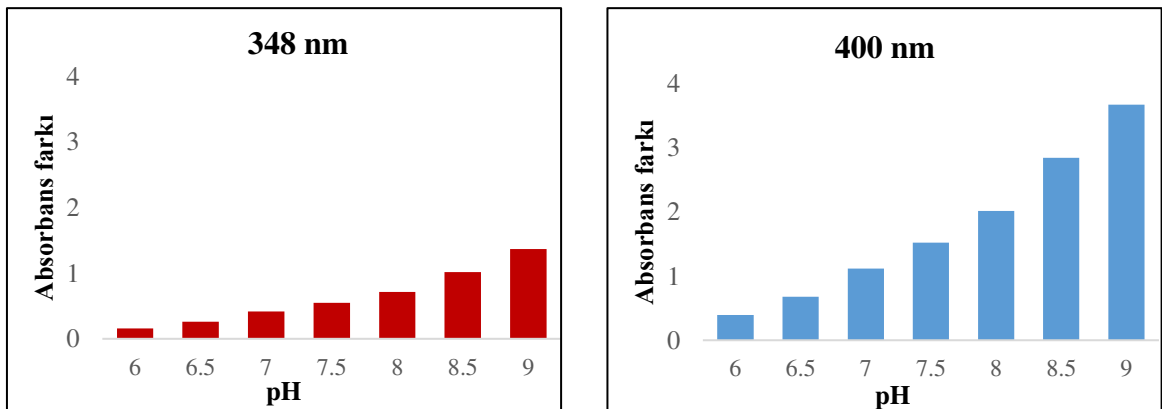
Şekil 29. pH' sı 7,4 ve 8,2 olan 0,05 ve 0,1 M Tris-SO₄ ve fosfat tamponlarının esteraz aktivitesi üzerine etkisinin spektrofotometrik olarak tespiti

Esteraz aktivitesi çalışmasında reaksiyon, pH' sı 7 olan 50 mM Tris-SO₄ tamponuyla pH 7 değerinde sabit tutulup 0,1 mg/mL BCA enzimi ve 3 mM *p*-nitrofenilasetat kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon başlatıldıktan 10 dk sonra ortam pH' sı 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan 0,5 M Tris-SO₄ tamponları ile farklı pH değerlerine getirildi. Pipetleme işleminden sonra 200-600 nm aralığında spektrumlar alındı. 348 ve 400 nm absorbans değerleri kaydedildi. Reaksiyon, pH' sı 7 olan 50 mM Tris-SO₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH' sı 9 olan 0,5 M' lık ikinci Tris-SO₄ tamponu ile ortam pH' sı 8,2 seviyelerine getirildiği zaman her iki dalga boyunda en yüksek esteraz aktivitesi sinyali elde edildi (Şekil 30).



Şekil 30. Esteraz aktivitesinde reaksiyon, pH'ı 7 olan 50 mM Tris-SO₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH'ı 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 olan 0,5 M konsantrasyonlu ikinci bir Tris-SO₄ tamponu ile ortam pH'ı değiştirilerek 348 ve 400 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri

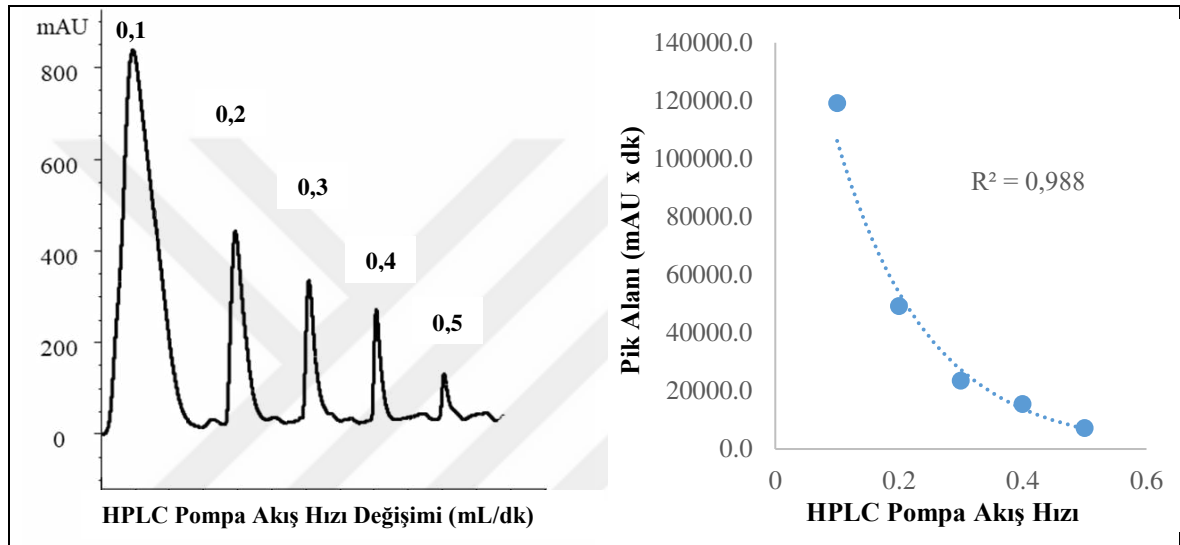
Esteraz aktivitesi çalışmasında reaksiyon, pH'ı 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 ve 9 olan 20 mM Tris-SO₄ tamponuyla farklı pH değerlerine getirilip 0,1 mg/mL BCA enzimi ve 3 mM *p*-nitrofenilasetat kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon başlatıldıktan 10 dk sonra tamamlandıktan sonra ortam, pH'ı 8 olan 1 M Tris-SO₄ tamponu ile pH 8 seviyelerine getirildi. Pipetleme işleminden sonra 200-600 nm aralığında spektrum alındı. 348 ve 400 nm absorbans değerleri kaydedildi. Reaksiyon, pH'ı 9 olan 20 mM Tris-SO₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH'ı 8 olan 1 M'lık ikinci Tris-SO₄ tamponu ile ortam pH'ı 8 seviyelerine getirildiği zaman en yüksek esteraz aktivitesi sinyali elde edildi (Şekil 31).



Şekil 31. Esteraz aktivitesinde reaksiyon pH'ı 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 ve 9 olan 20 mM Tris-SO₄ tamponu kullanılarak gerçekleştirilip, pH'ı 8 olan 1 M konsantrasyonlu ikinci bir Tris-SO₄ tamponu ile ortam pH'ı değiştirilerek 348 ve 400 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri

3.2.4. HPLC Hareketli Faz Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC ile FIA modunda CA' nın esteraz aktivitesinin belirlenmesi adına 1 mg/mL BCA enzimi sisteme enjekte edilerek iki paralel olacak şekilde akış hızı aktivite ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla aktiviteden sorumlu piklerin alanları tespit edilerek korelasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 32).



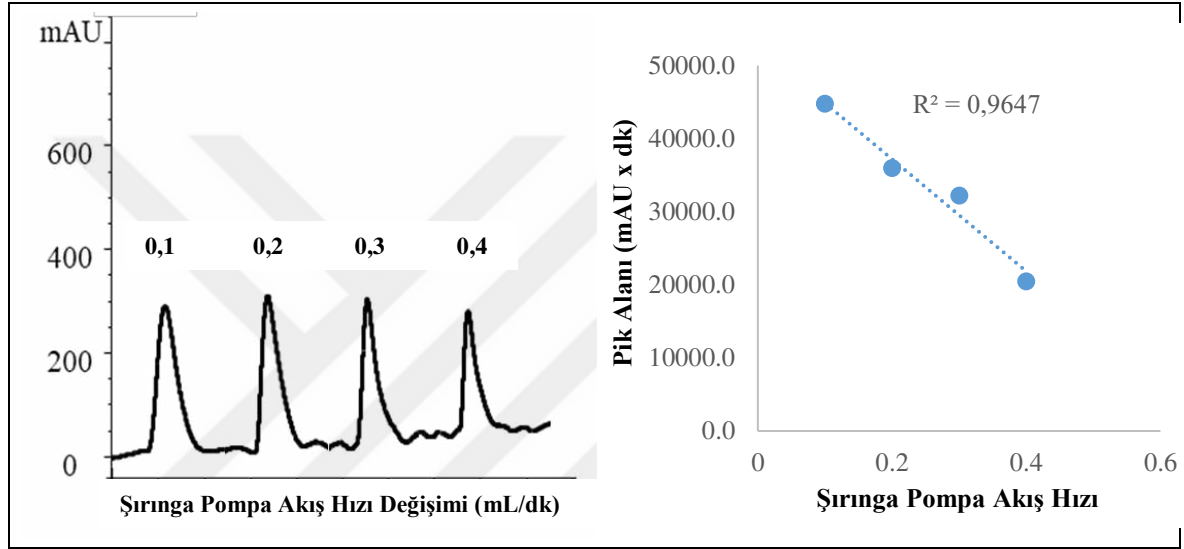
Şekil 32. FIA modunda 1 mg/mL BCA enzimi ile şırınga pompanın akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup HPLC pompa akış hızı arttırıldığında (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk) belirlenen esteraz aktivite piklerine ait kromatogram ve esteraz aktivitesine ait pik alanlarının korelasyon grafiği

Şekil 32' den anlaşıldığı üzere şırınga pompanın akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup HPLC hareketli faz akış hızı 0,1 mL/dk olacak şekilde ayarlandığı zaman en yüksek dedeksiyon ve aktivite pik alanının elde edildiği görüldü. HPLC hareketli faz akış hızı arttıkça aktivite pik boyutunun küçüldüğü ve dedeksiyonun azaldığı tespit edildi. Literatürde de protein ayrımı ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında 0,5 mL/dk ve yukarısı akış hızları arasında daha çok düşük akış hızlarının tercih edildiği tespit edildi (Jae-Bom Ohm vd., 2009; Alexia Grangeon vd., 2019).

3.2.5. Şırınga Pompa Akış Hızının Aktivite Ölçümü Üzerine Etkisinin HPLC ile FIA Modunda Belirlenmesi

HPLC ile FIA modunda CA' nın esteraz aktivitesinin belirlenmesi adına 1 mg/mL BCA enzimi sisteme enjekte edilerek iki paralel olacak şekilde akış hızı aktivite ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla aktiviteden sorumlu piklerin alanları tespit edilerek korelasyon grafiği oluşturuldu (Şekil 33).

0,1



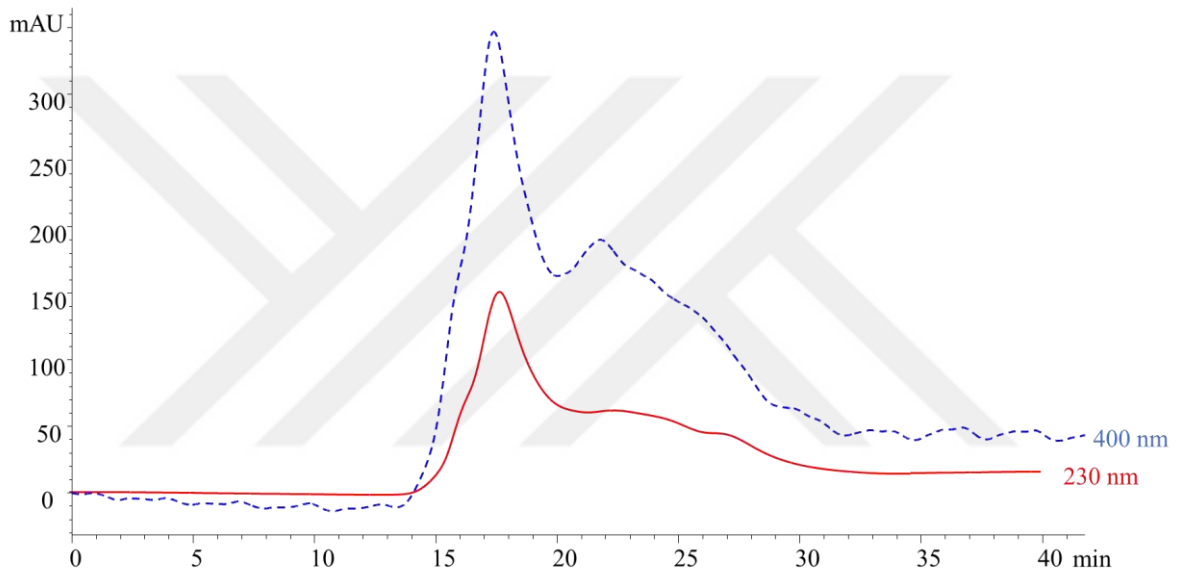
Şekil 33. FIA modunda 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC pompa akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup şırınga pompanın akış hızı arttırıldığında (0,1; 0,2; 0,3 ve 0,4 mL/dk) belirlenen esteraz aktivite piklerine ait kromatogram ve esteraz aktivitesine ait pik alanlarının korelasyon grafiği

Şekil 33' ten anlaşıldığı üzere HPLC hareketli faz akış hızı 0,2 mL/dk' da sabit tutulup şırınga pompa akış hızı 0,1 mL/dk olacak şekilde ayarlandığı zaman en yüksek dedeksiyon ve aktivite pik alanının elde edildiği görüldü. Şırınga pompa akış hızı arttıkça aktivite pik boyutunun küçüldüğü ve dedeksiyonun azaldığı tespit edildi.

Bu aşamadan sonraki çalışmalar HPLC ile kolonda kromatografik ayırım yapılarak gerçekleştirildi.

3.2.6. Tris ve Fosfat Tamponlarının Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırma

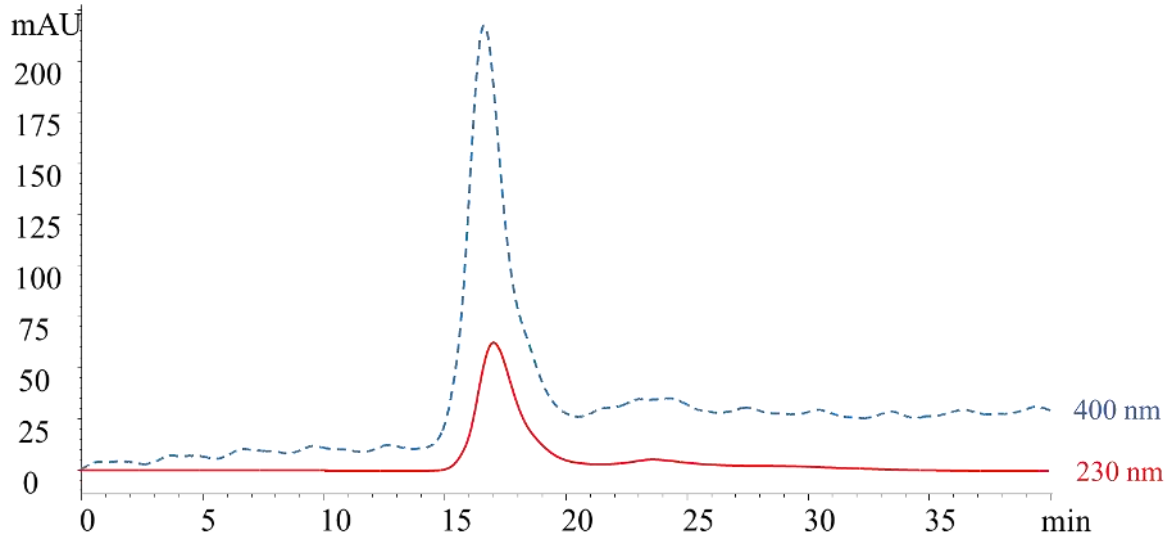
5 mg/mL BCA enziminin kromatografik ayrımı, akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,1 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirildi. BCA enziminin esteraz aktivitesini belirleyebilmek adına ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat çözeltisi (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderildi ve 400 nm' de aktivite piki tespit edildi (Şekil 34).



Şekil 34. pH' sı 8,3 olan 0,1 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile ayrımı yapılan 5 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti

1 mg/mL BCA enziminin kromatografik ayrımı, akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de ayrımı gerçekleştirildi. BCA enziminin esteraz aktivitesini belirlemek adına ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderildi ve 400 nm' de aktivite piki arandı (Şekil 35).

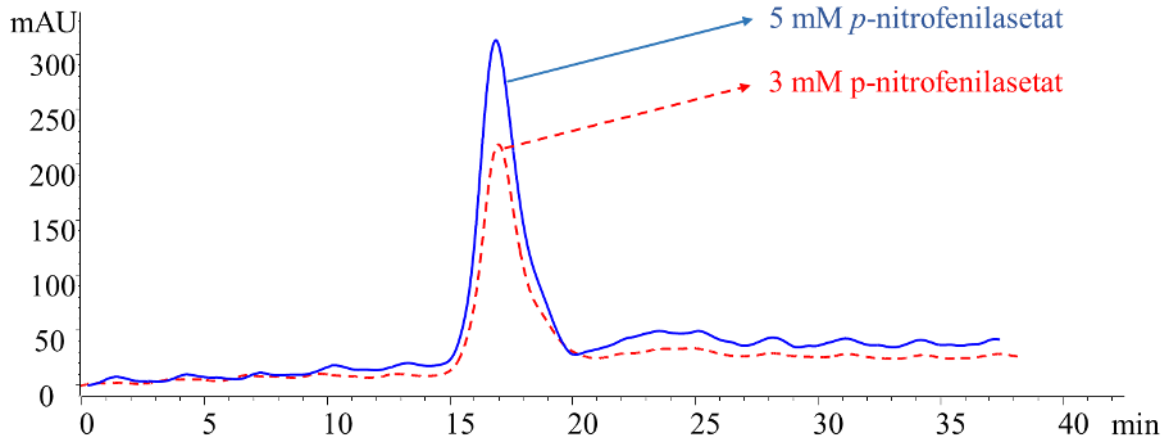
Hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu kullanıldığında hem protein ayrımının daha iyi olduğu hem de aktivitenin daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 35).



Şekil 35. pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile ayrımı yapılan 1 mg/mL BCA enziminin 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti

3.2.7. Substrat Konsantrasyonunun Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisi

1 mg/mL BCA, on-line HPLC sisteminde akış hızı 0,7 mL/dk ve pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirilip, ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat çözeltisi (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilerek 400 nm de aktivite piki belirlendi. Ayrıca 1 mg/mL BCA enziminin aynı tampon sistemi ve aynı akış hızı ile 230 nm dalga boyunda ayrımı gerçekleştirilip, ikinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat çözeltisi (5 mM *p*-nitrofenil asetat) DMSO' da çözülerek daha yüksek konsantrasyonda sisteme gönderildi ve 400 nm de aktivite piki belirlendi. Yapılan çalışmanın sonucunda substrat konsantrasyonunun artması ile esteraz aktivite sinyalinin de arttığı tespit edildi (Şekil 36).



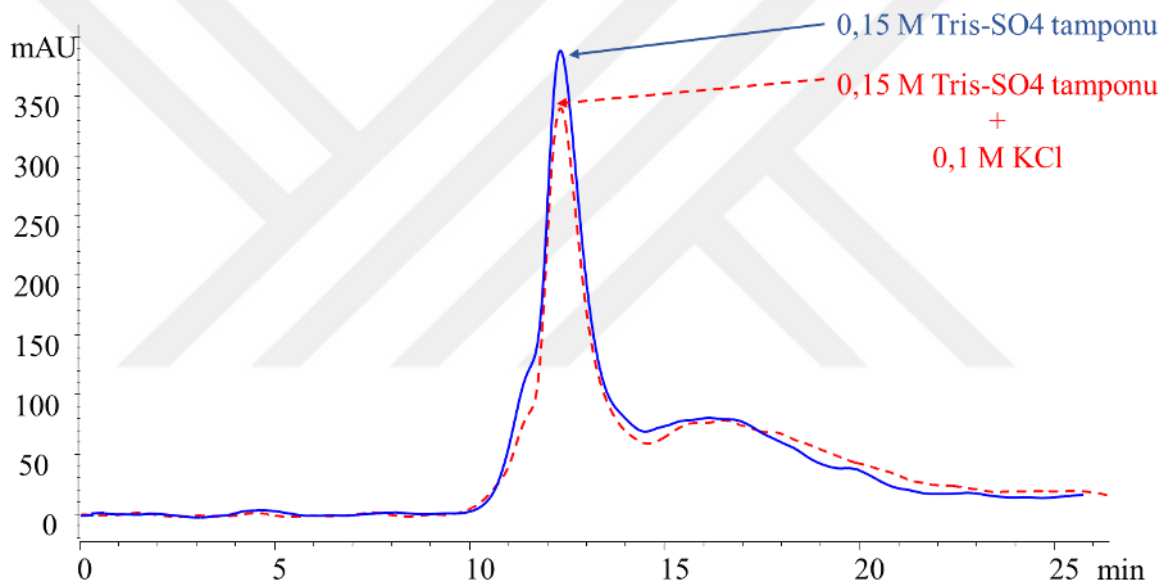
Şekil 36. pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponundan oluşan hareketli faz sistemi ile ayrımı yapılan 1 mg/mL BCA enziminin 3 mM *p*-nitrofenil asetat ve 5 mM *p*-nitrofenil asetat ile 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinin tespiti

3.2.8.KCl' nin Esteraz Aktivitesi Üzerine Etkisinin Kromatografik Sistemde Belirlenmesi

Boyut dışlama kolonları (SEC), protein ayrımları ve moleküler ağırlık analizleri için HPLC çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bütün silika temelli jel filtrasyon kolonları negatif yükler içermektedir. Bu nedenle bu kolonlarla protein ayrımı çalışmaları yapılırken peptit yapılarının pozitif yüklü yan grupları ile istenmeyen elektrostatik etkileşimleri engellemek gerekmektedir. Kolon performansı ve biyolojik aktivitenin sürdürülebilmesi için hareketli fazın seçimi oldukça önemlidir. Biyomoleküllerin ayrımında pH seviyesi 5-8,5 aralığında ve konsantrasyonu 0,1-0,5 M seviyelerindeki tampon çözeltiler hareketli faz olarak tercih edilmektedir. Düşük pH (< 4) ve düşük iyonik şiddet (< 0,05 M) ayırım üzerine olumsuz etki etmektedir. Bu olumsuz etkiler ancak tampon pH' sı ya da iyonik şiddetinin artırılmasıyla ortadan kaldırılabilir. Bu amaçla elektrostatik etkileşimleri en aza indirmek için protein ayrımlarında kullanılan tampon çözeltilere farklı konsantrasyonlarda (0,1-0,4 M) tuz çözeltileri ilave edilmektedir. Fakat protein ayırımından ziyade protein aktivitelerinin önemli olduğu çalışmalarda eklenen tuz çözeltilerinin aktivite üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmalıdır.

5 mg/mL BCA enziminin kromatografik ayrımı, akış hızı 1 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,15 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirildi. İkinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat çözeltisi (3 mM *p*-nitrofenil asetat) gönderilerek 348 nm' de esteraz aktivitesi takip edildi. Esteraz

aktivitesinden sorumlu pikin alanı 27179,2 mAU x dk olarak belirlendi. 5 mg/mL BCA enziminin kromatografik ayrımı, ayrıca pH' sı 8,3 ve akış hızı 1 mL/dk olan 0,15 M Tris-SO₄ tamponu ve 0,1 M KCl' den oluşan hareketli faz ile 230 nm' de gerçekleştirildi. İkinci bir pompadan sisteme 0,3 mL/dk akış hızı ile taze hazırlanmış substrat gönderilerek 348 nm' de esterez aktivitesi takip edildi. Esteraz aktivitesinden sorumlu pikin alanı 23300,3 mAU x dk olarak belirlendi. Hareketli faz içerisinde KCl yokluğunda aktivite %100 olarak kabul edildi. Hareketli faz içerisinde bulunan 0,1 M KCl çözeltisinin esterez aktivitesi üzerinde %14 lük bir aktivite kaybına sebep olduğu tespit edildi (Şekil 37). Yapılan kromatografik çalışma daha önce yapılmış olan spektrofotometrik çalışma ile benzer sonuçlar gösterdi.



Şekil 37. Akış hızı 1 mL/dk ve pH' sı 8,3 olan 0,15 M Tris-SO₄ tamponu ve aynı tamponun 0,1 M KCl içeren kompozisyonundan oluşan hareketli faz ile 5 mg/mL BCA enziminin esteraz aktivitesinin 348 nm dalga boyunda takibi

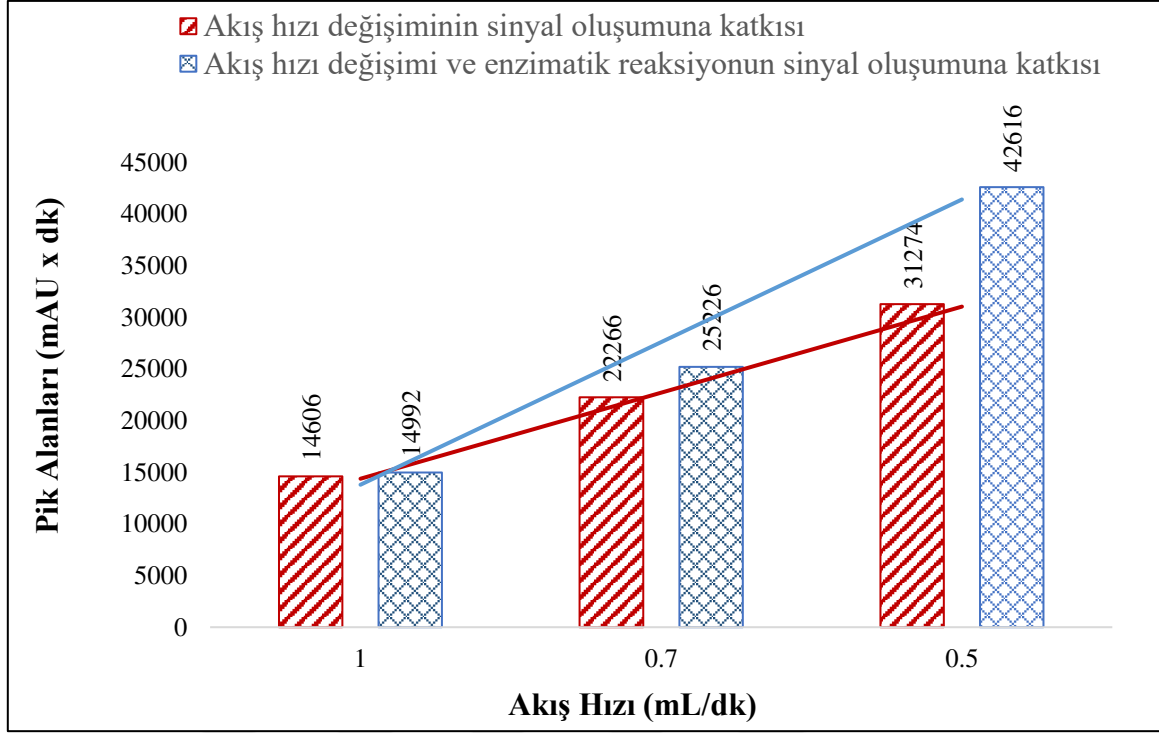
3.2.9. Akış Hızı ve Enzimatik Reaksiyonun Dedeksiyon Üzerine Etkisinin Araştırılması

Akış hızı azaldığı zaman HPLC sisteminde kolonda ayrılan numunelerin dedektör önünden geçiş süreleri artacağı için dedeksiyon bakımından pik alanının da bu süreyle orantılı olarak artması beklenmektedir. Bu doğrultuda akış hızının azalmasının sadece dedektörün önünde geçen süreyle orantılı olarak mı, yoksa aynı zamanda artan bu süre

zarfında meydana gelen enzimatik reaksiyon artışı ile de orantılı bir şekilde aktivite artışıyla ilgili olarak mı dedeksiyona etki ettiğinin araştırılması yapılmıştır.

Dedeksiyonun sadece akış hızıyla orantılı olarak ne kadar değiştiğini belirlemek adına bozulmuş substrat enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edildi. Hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk) sisteme gönderildi. Aynı zamanda şırınga pompadan 0,3 mL/dk akış hızında sisteme saf su gönderilerek 400 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlarda bozulmuş substratın verdiği pik alanları belirlendi. 1 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 14606 mAU x dk, 0,7 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 22266 mAU x dk ve 0,5 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 31274 mAU x dk olarak tespit edildi (Şekil 38). Akış hızı dakikada 1 mL' den 0,7 mL' ye düşürülünce oluşan pikin alanı %52, 0,5 mL' ye düşürülünce oluşan pikin alanı %114 artış gösterdi.

Dedeksiyonun, akış hızının yanı sıra aynı zamanda azalan akış hızı sonucu reaksiyon artışı ile de değiştiğini belirlemek adına 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme gönderildi. Hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk) sisteme gönderildi. Aynı zamanda şırınga pompadan 0,3 mL/dk akış hızında sisteme taze hazırlanmış substrat gönderilerek 400 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlarda BCA enziminin verdiği aktivite pik alanları belirlendi. 1 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 14992 mAU x dk, 0,7 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 25226 mAU x dk ve 0,5 mL/dk akış hızında oluşan pik alanı 42616 mAU x dk olarak tespit edildi (Şekil 38). Akış hızı dakikada 1 mL' den 0,7 mL' ye düşürülünce oluşan pikin alanı %94, 0,5 mL' ye düşürülünce oluşan pikin alanı %228 artış göstermiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda akış hızının değişimi ile oluşan dedeksiyonda sadece aktivitenin sebep olduğu % değişim akış hızının dakikada 1 mL' den 0,7 mL' ye düşmesiyle %42, 0,5 mL' ye düşmesiyle %114 olarak tespit edildi.

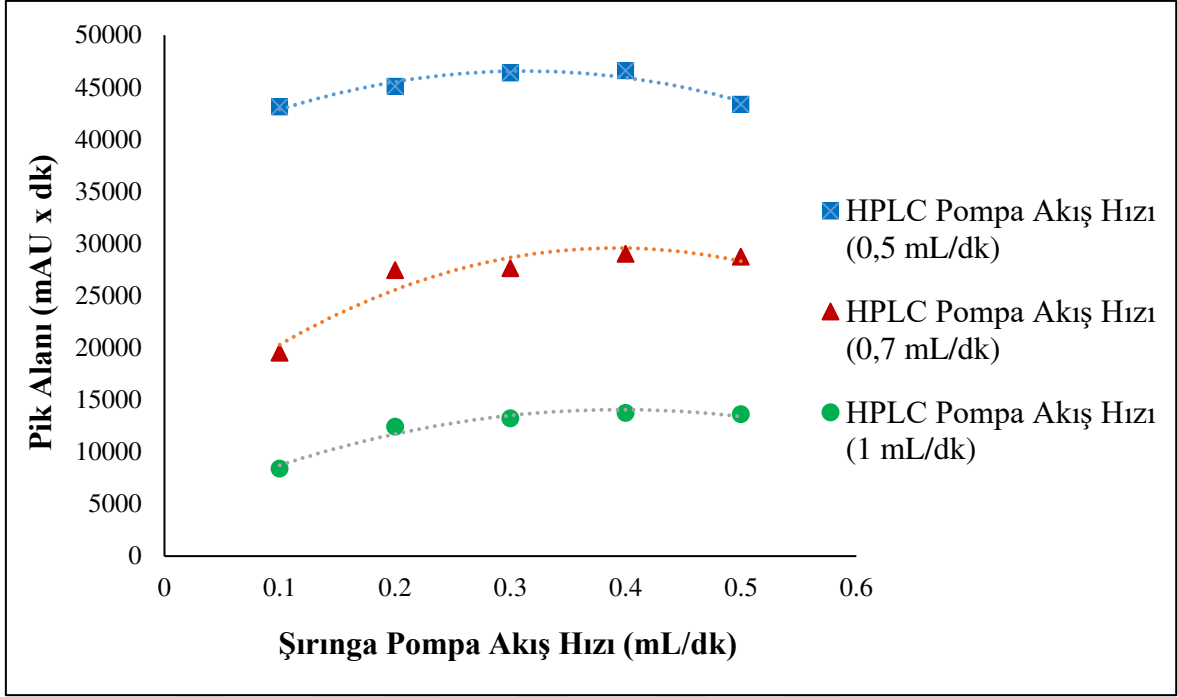


Şekil 38. Farklı akış hızlarında (0,5-0,7-1 mL/dk), 400 nm dalga boyunda bozulmuş substratın verdiği pik alanları (/) ve 1 mg/ml BCA enziminin verdiği aktivite piklerine ait pik alanları (x)

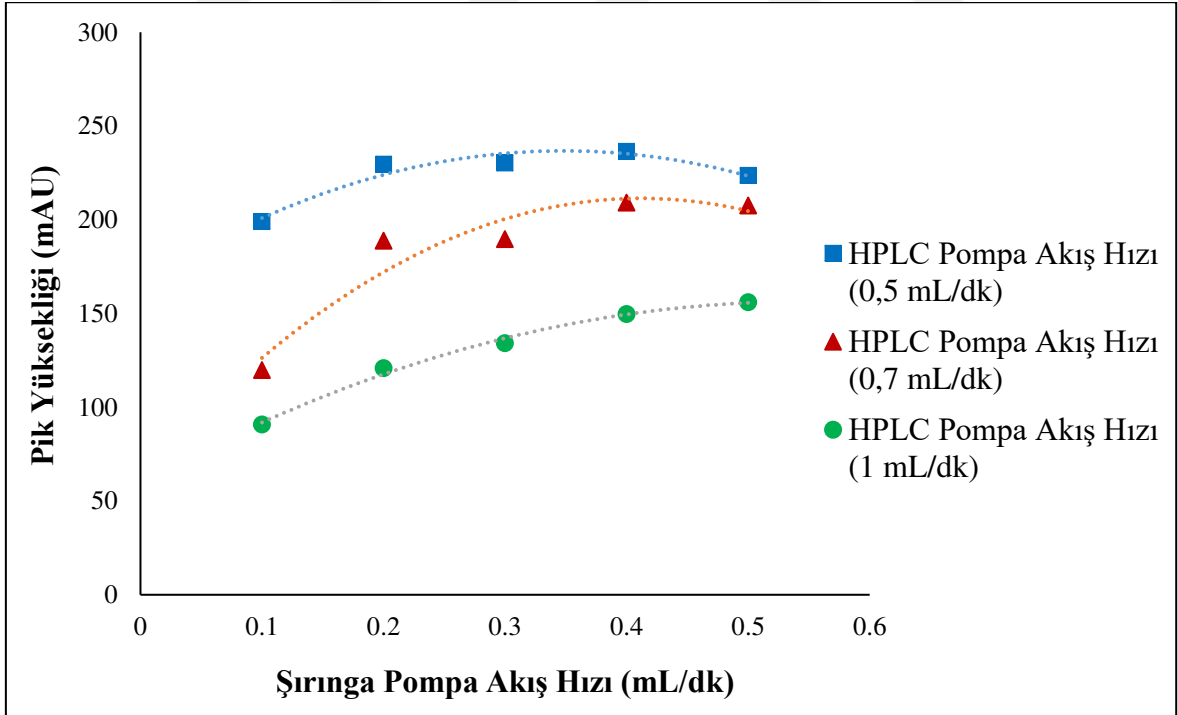
3.3. Optimizasyonu Yapılan On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Bulguları

3.3.1. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine HPLC ve Şırınga Pompa Akış Hızlarının Etkisi

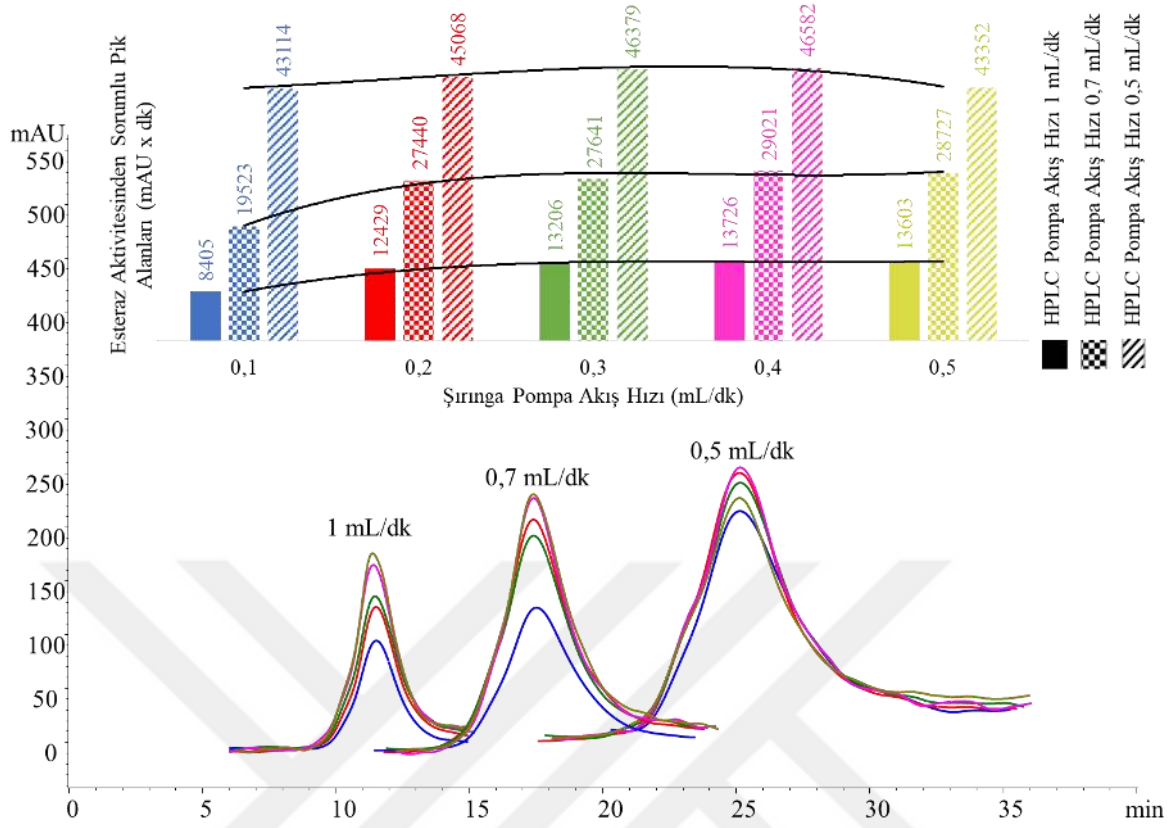
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,1 M fosfat tamponu ile, 25 °C sıcaklıkta, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda ve 3 m tübing boyunda şırınga pompa ile farklı akış hızlarında (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk) sisteme gönderilen substrat ve HPLC pompa ile farklı akış hızlarında (0,5; 0,7 ve 1 mL/dk) sisteme gönderilen tampon çözelti ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren 400 nm pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 0,5 mL/dk HPLC pompa ve 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızları optimum olarak belirlendi (Şekil 39-42).



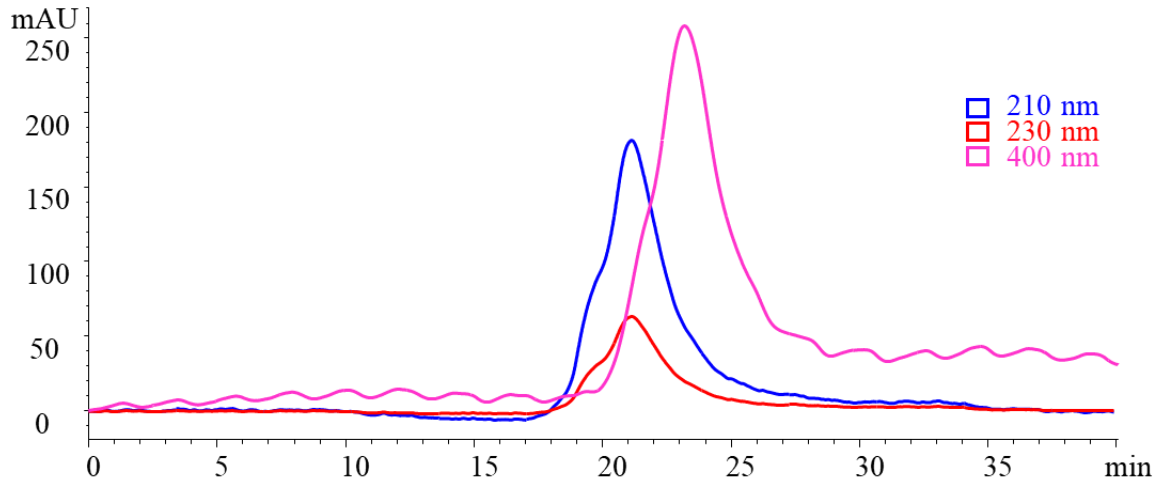
Şekil 39. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterase aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



Şekil 40. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterase aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



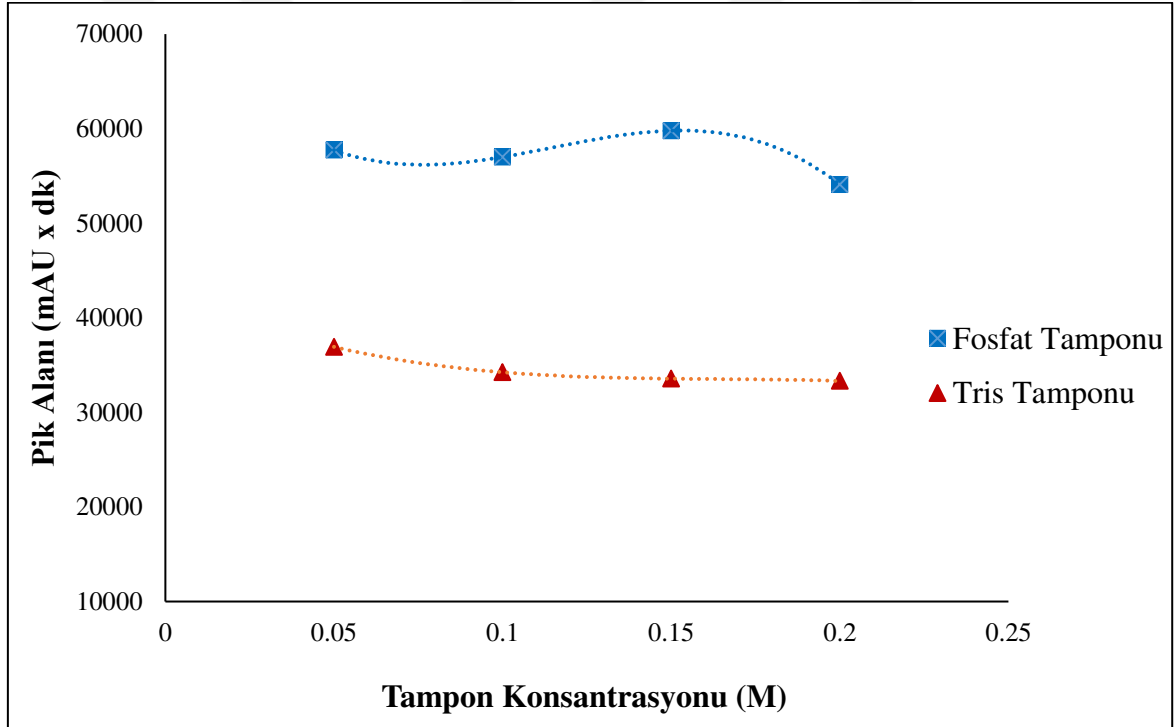
Şekil 41. 1 mg/mL BCA enzimi ile HPLC ve şırınga pompanın farklı akış hızlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterase aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



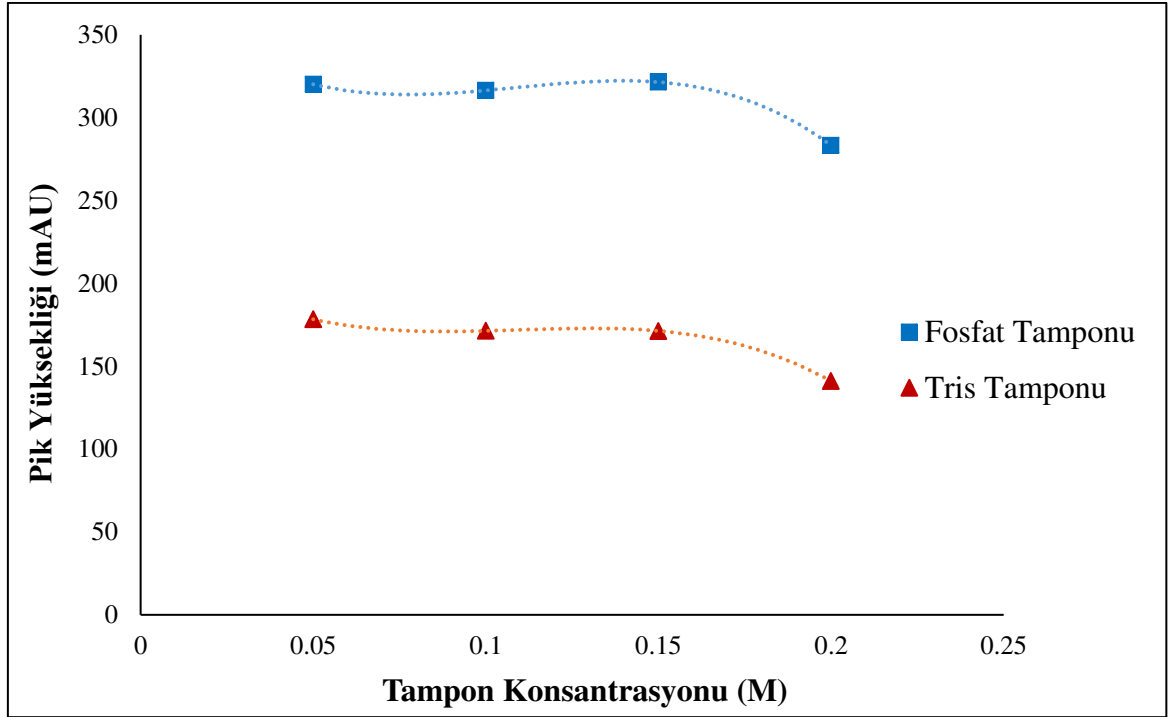
Şekil 42. 1 mg/mL BCA enzimi ile 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,4 mL/dk şırınga pompa akış hızında 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esterase aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

3.3.2. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Seçiminin Etkisi

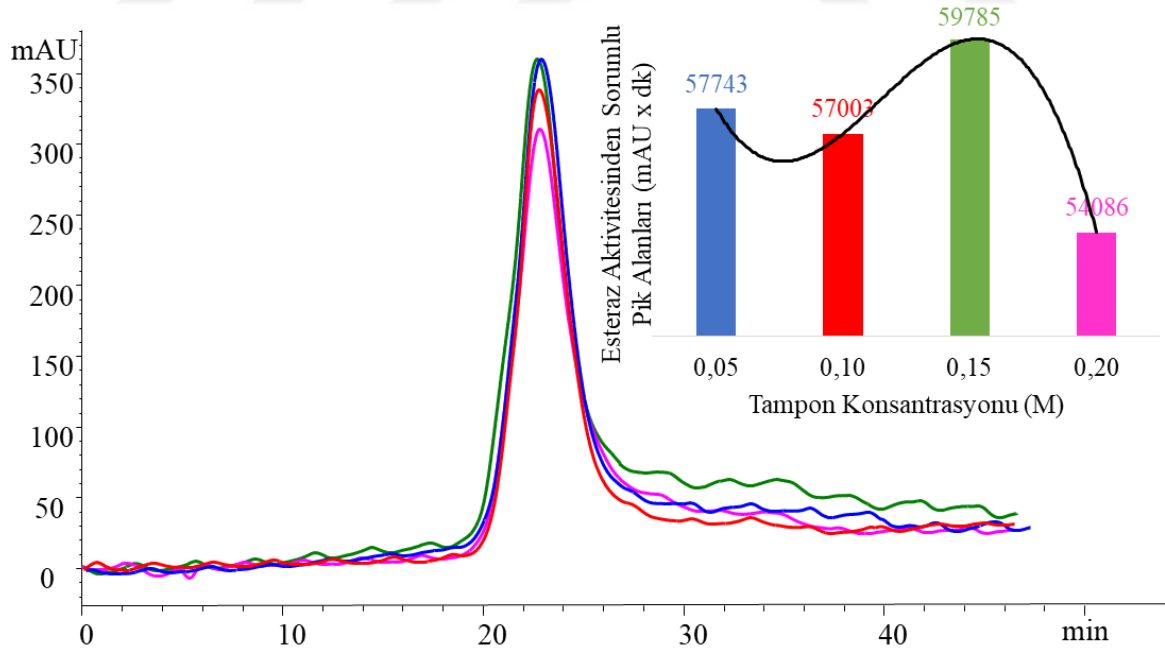
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 25 °C sıcaklıkta, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda, 3 m tübing boyunda ve pH' sı 8,2 olan farklı konsantrasyonlu (50, 100, 150 ve 200 mM) Tris-SO₄ ve fosfat tamponları ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 150 mM fosfat tamponu optimum olarak belirlendi (Şekil 43-48).



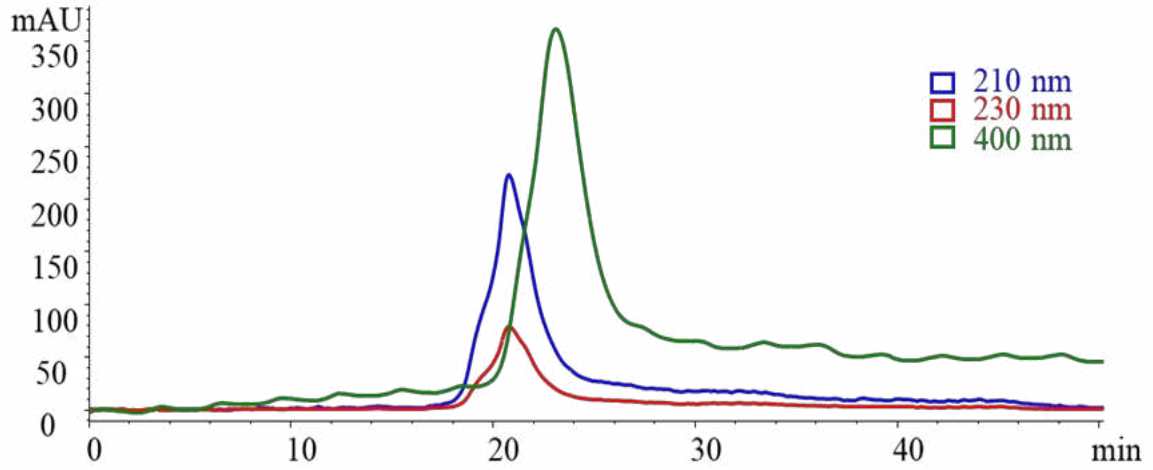
Şekil 43. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tamponların farklı konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



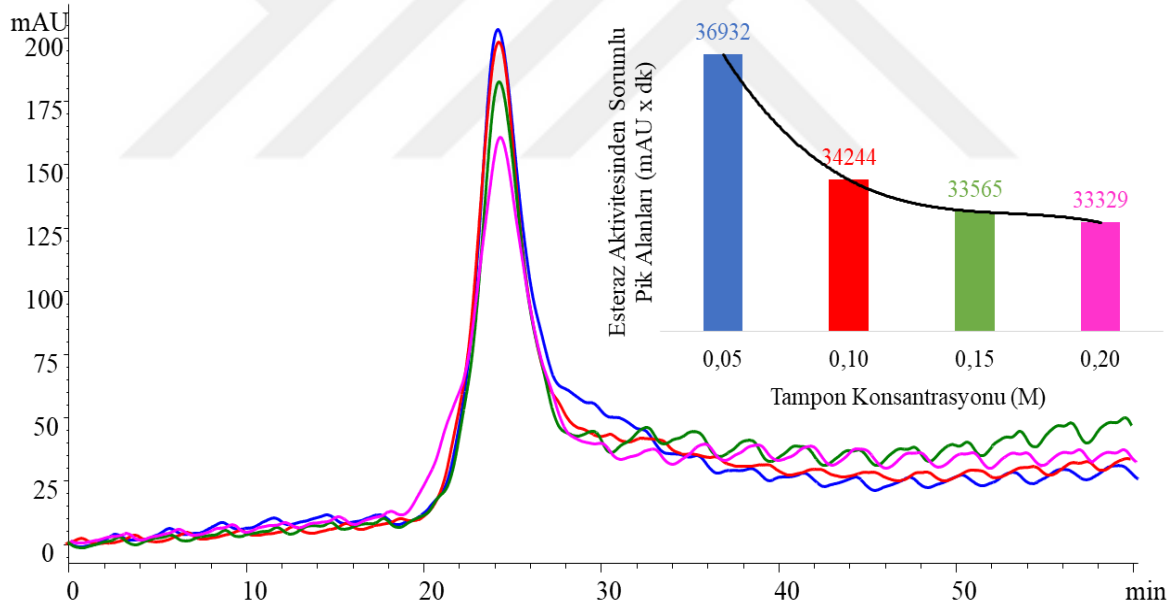
Şekil 44. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tamponların farklı konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterez aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



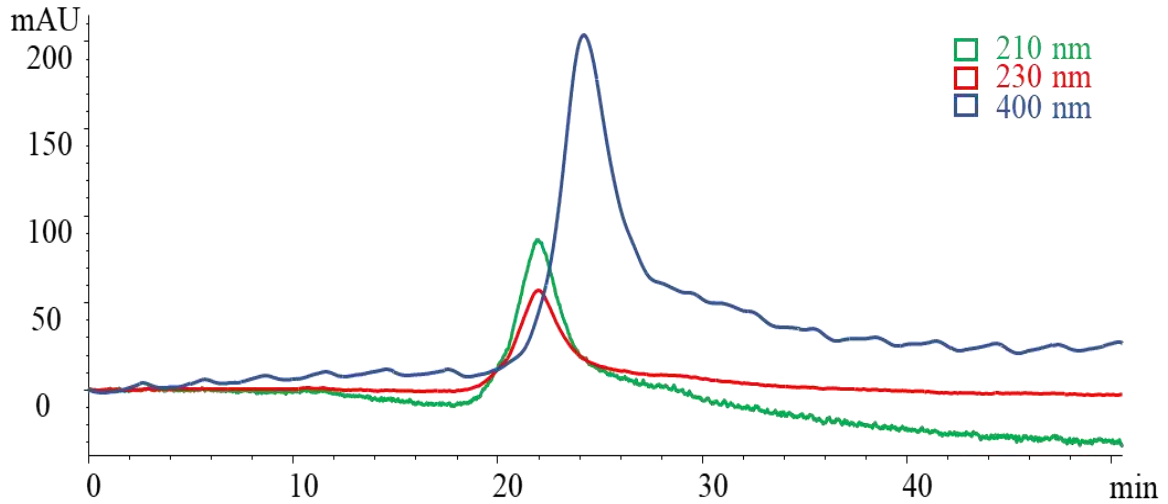
Şekil 45. Farklı konsantrasyonlardaki fosfat tamponu (0,05; 0,10; 0,15 ve 0,20 M) ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boyundaki esterez aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



Şekil 46. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esterez aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar



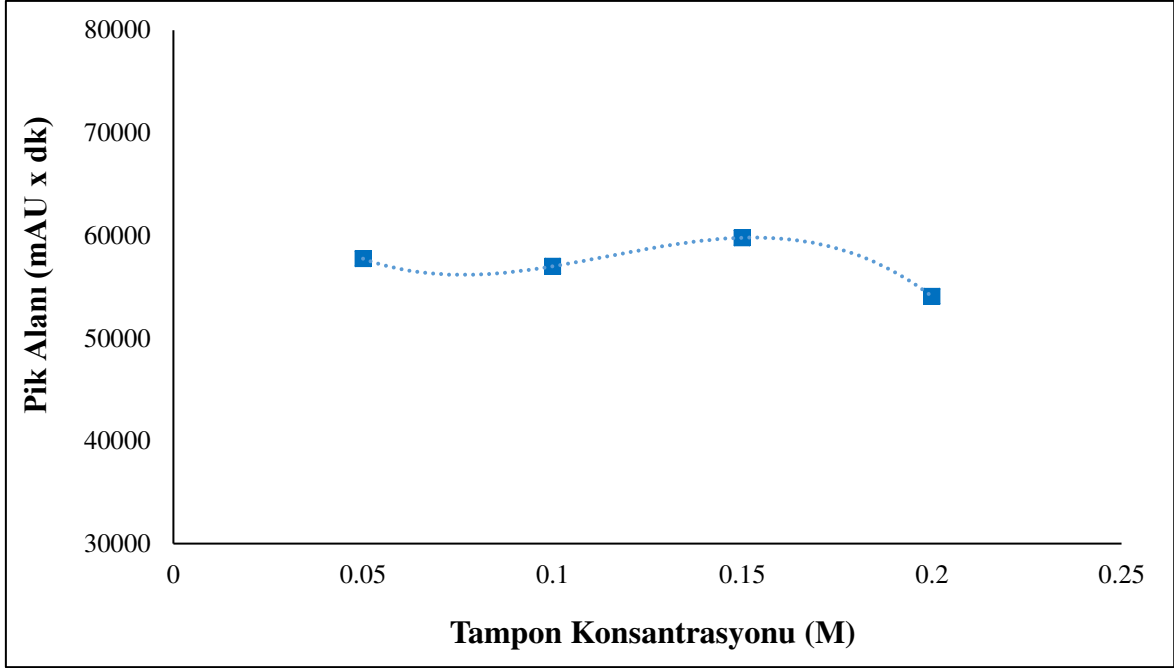
Şekil 47. Farklı konsantrasyonlardaki Tris-SO₄ tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boyundaki esterez aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



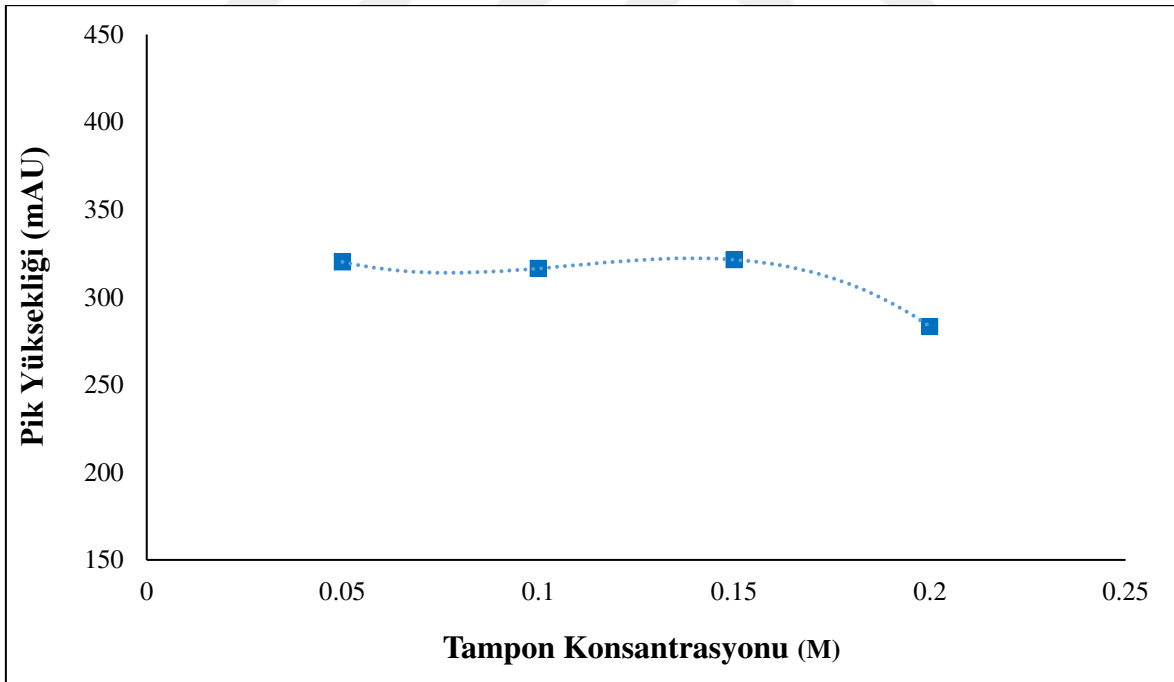
Şekil 48. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

3.3.3. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 25 °C sıcaklıkta, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda ve 3 m tübing boyunda pH' sı 8,2 olan farklı konsantrasyonlu (50, 100, 150 ve 200 mM) fosfat tamponları kullanıldığında meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini 400 nm dalga boyunda gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 0,15 M konsantrasyonlu fosfat tamponu optimum olarak belirlendi (Şekil 49 ve Şekil 50).



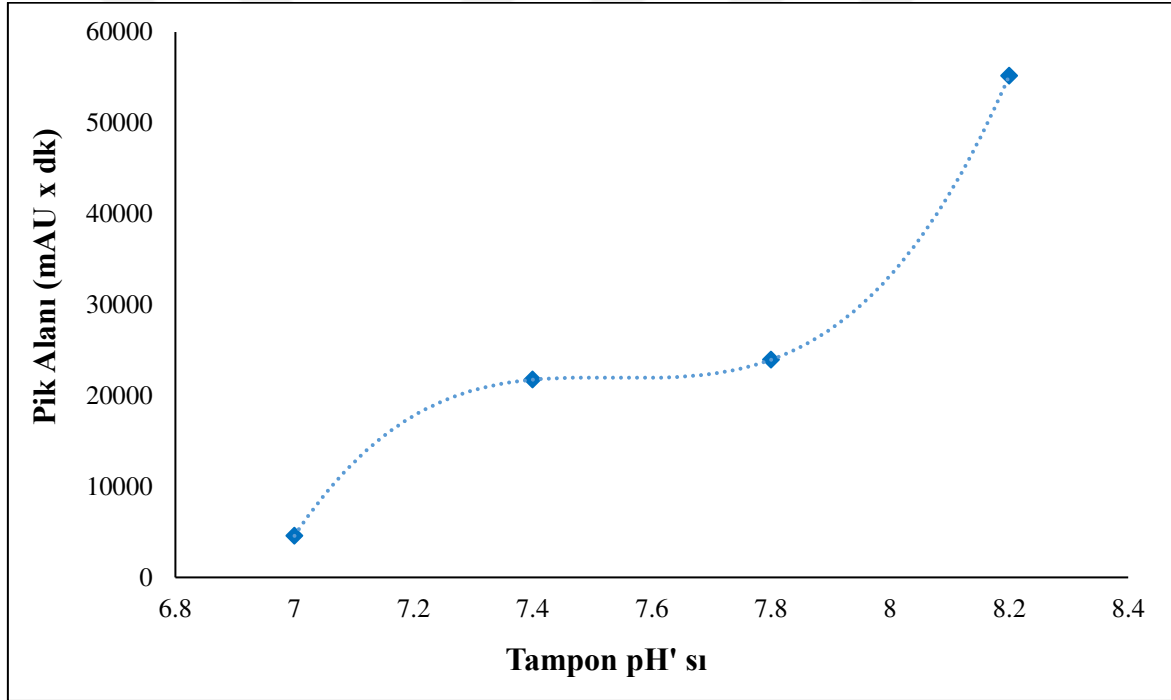
Şekil 49. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tampon konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterez aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



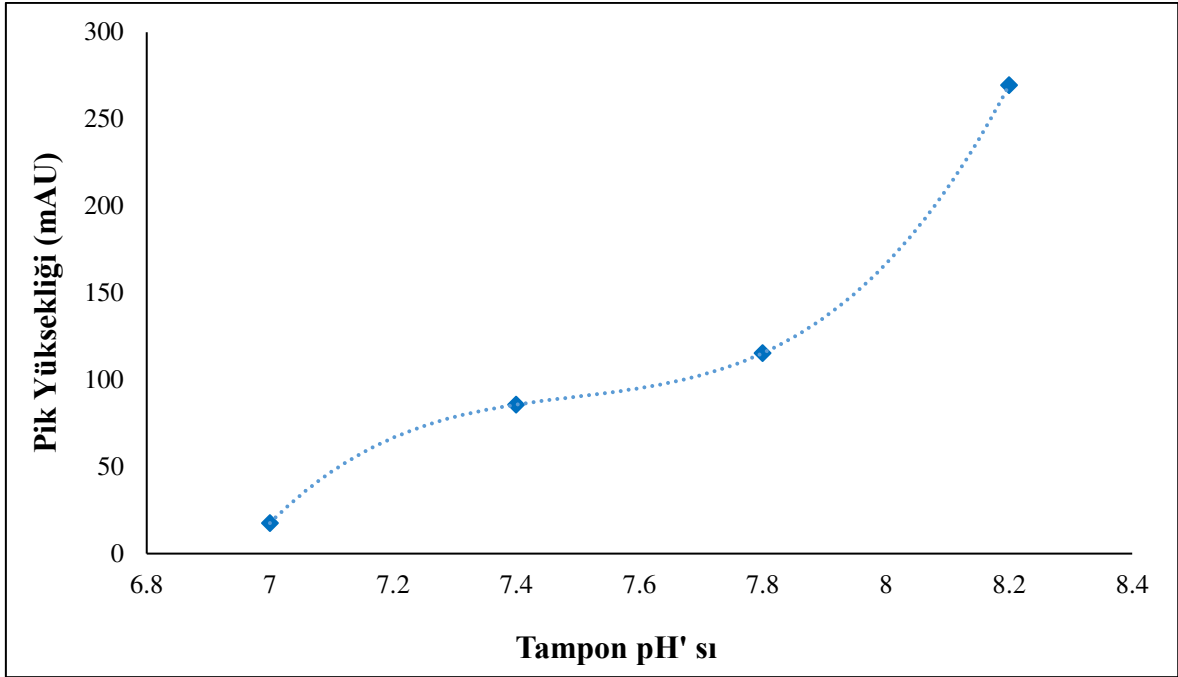
Şekil 50. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tampon konsantrasyonlarında 400 nm dalga boyunda elde edilen esterez aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği

3.3.4. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine pH' nın Etkisi

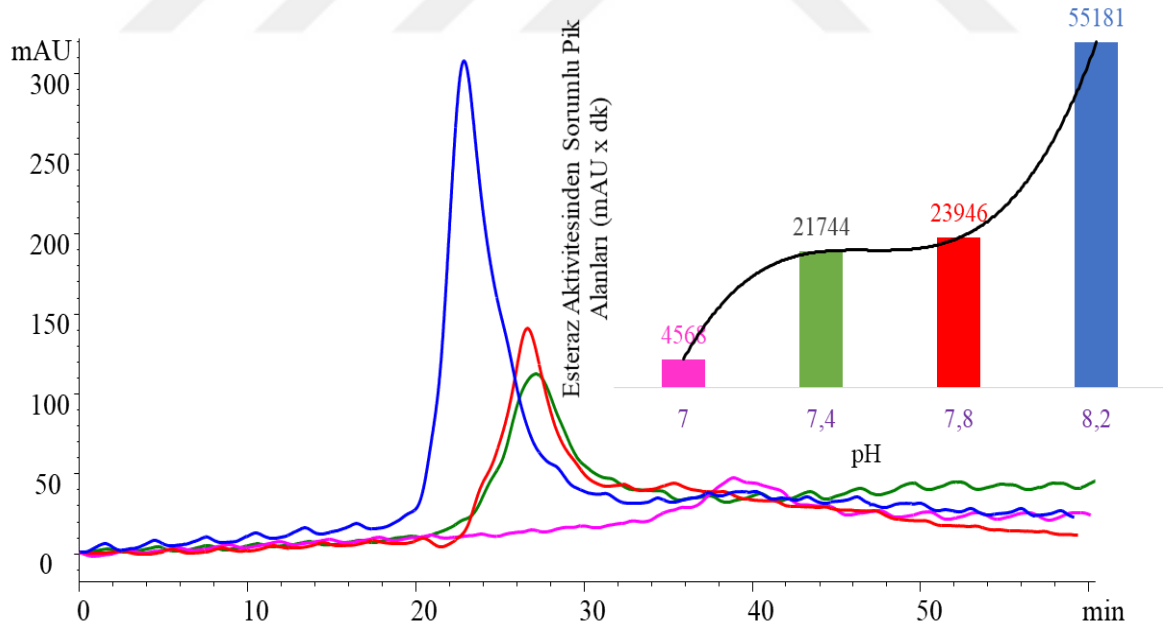
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL konsantrasyonlu BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 25 °C sıcaklıkta, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda, 0,15 M fosfat tamponu ve 3 m tübing boyu ile farklı pH değerlerine (7; 7,4; 7,8 ve 8,2) sahip olan fosfat tamponu ile meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini 400 nm' de gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 8,2 pH değeri optimum olarak belirlendi (Şekil 51-54).



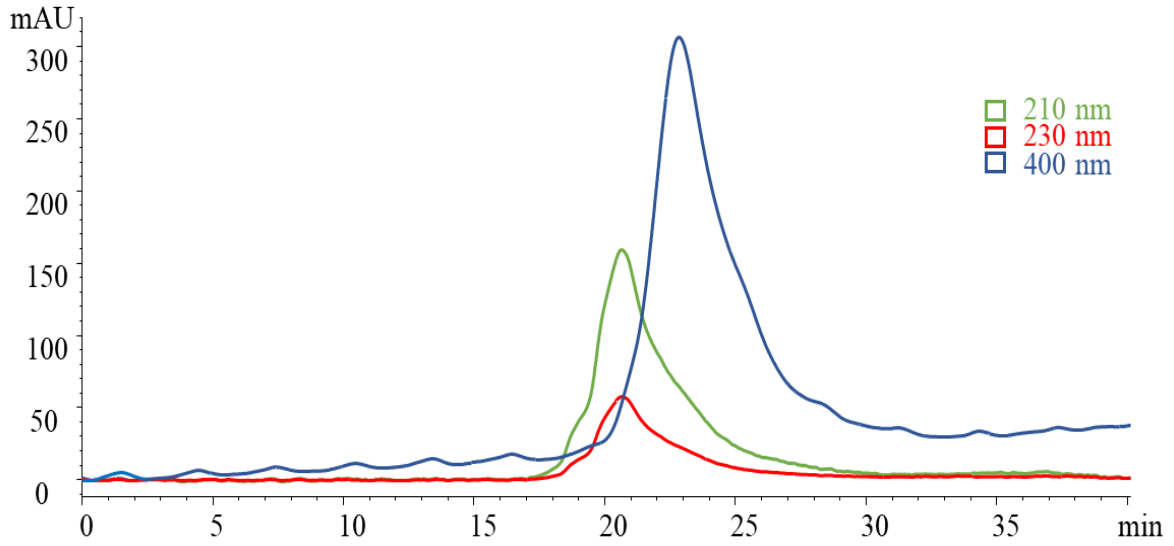
Şekil 51. 1 mg/mL BCA enziminin farklı pH' ya sahip tampon çözeltileri kullanılarak 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



Şekil 52. 1 mg/mL BCA enziminin farklı pH' ya sahip tampon çözeltileri kullanılarak 400 nm dalga boyunda elde edilen esterez aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



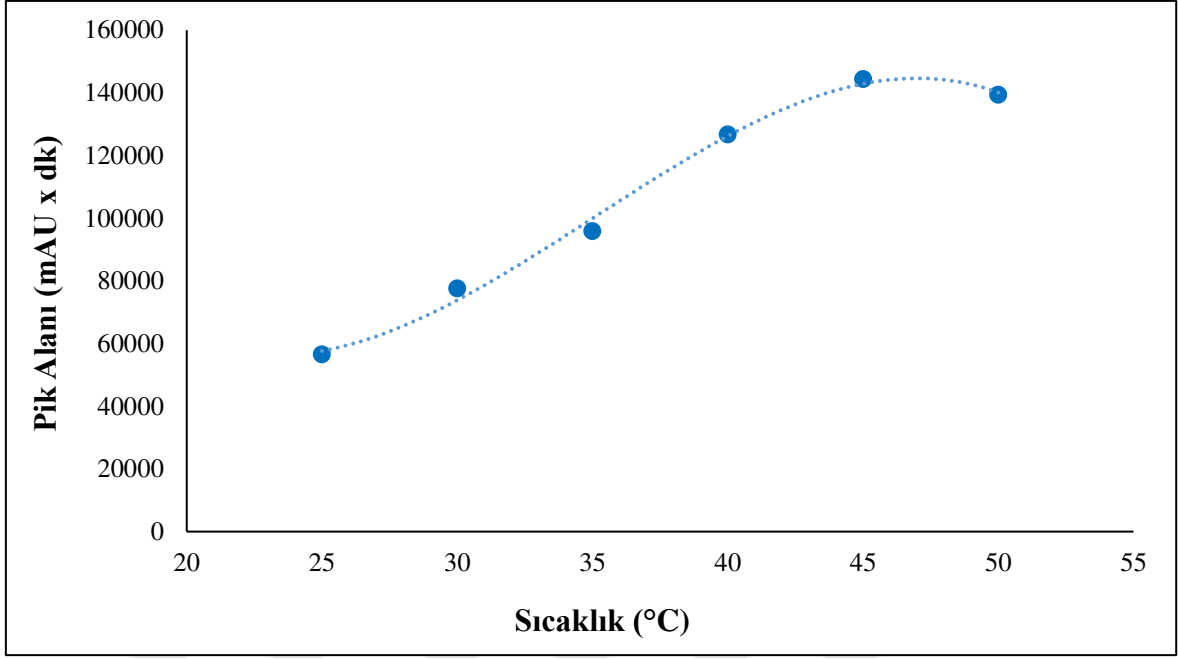
Şekil 53. Farklı pH değerlerine sahip 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esterez aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



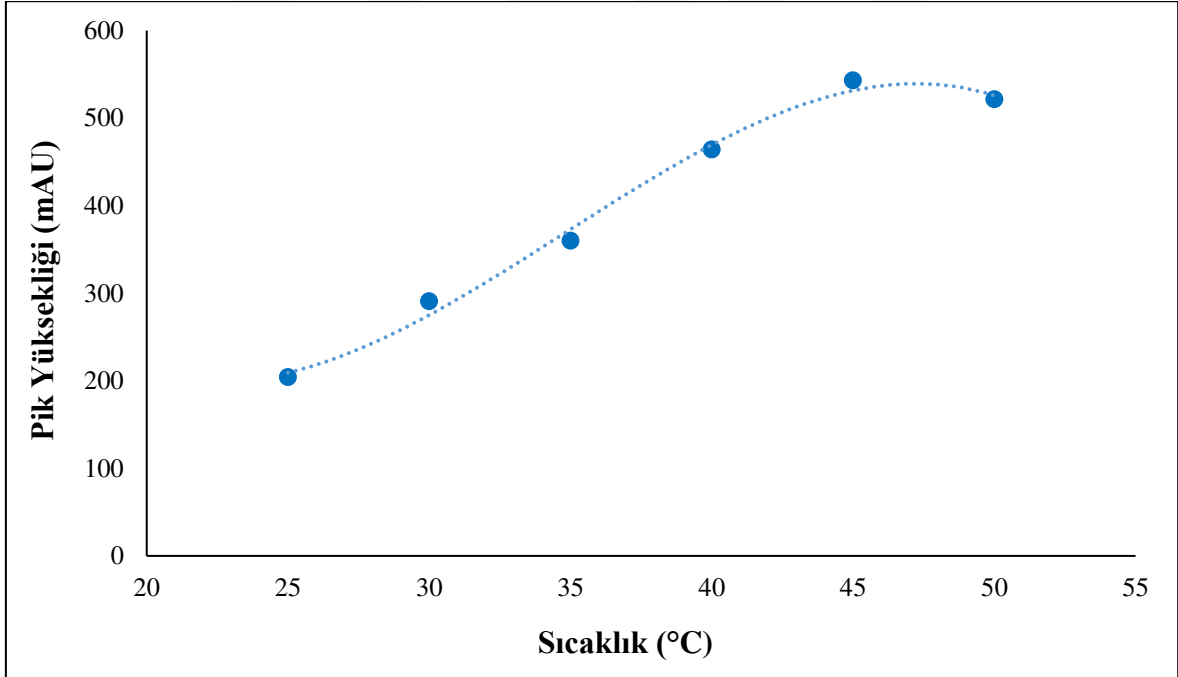
Şekil 54. 1 mg/mL BCA enzimi ile pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esterase aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

3.3.5. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

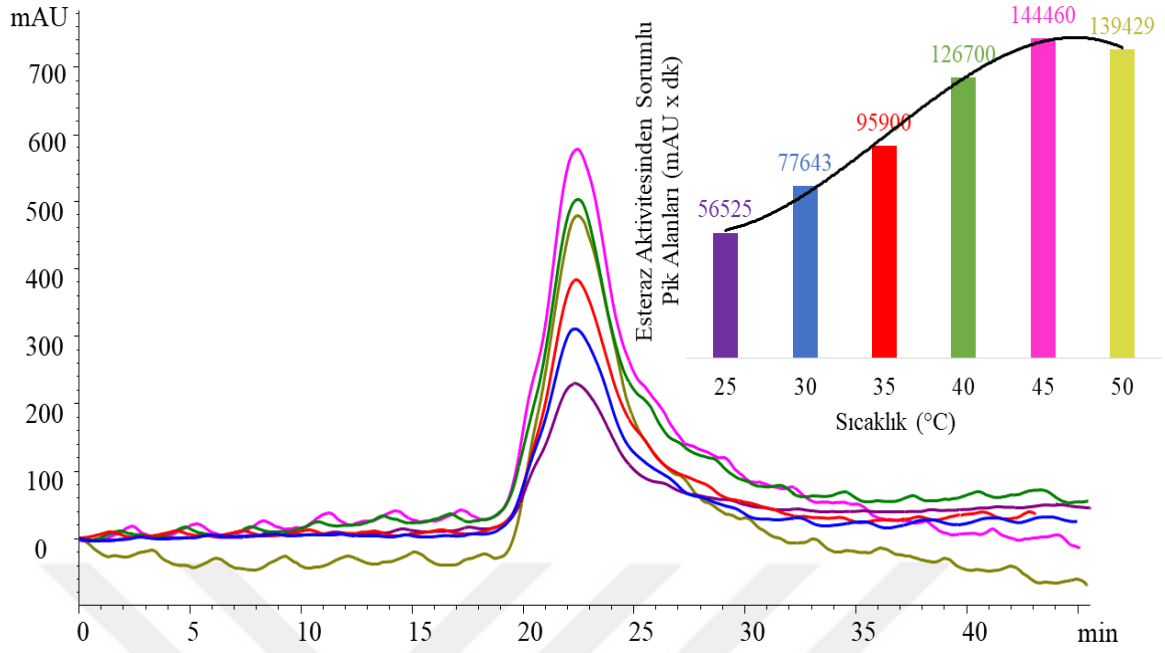
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda, 3 m tübing boyunda ve pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu kullanılarak farklı sıcaklık değerlerinde (25, 30, 35, 40, 45, 50 °C) meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esterase aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan sıcaklık değeri 45 °C olarak belirlendi (Şekil 55-58). Fakat sıcaklık artışı ile birlikte gürültünün de arttığı tespit edildi. Pik yüksekliği gürültü oranının en yüksek olduğu 25 °C optimum sıcaklık olarak belirlendi.



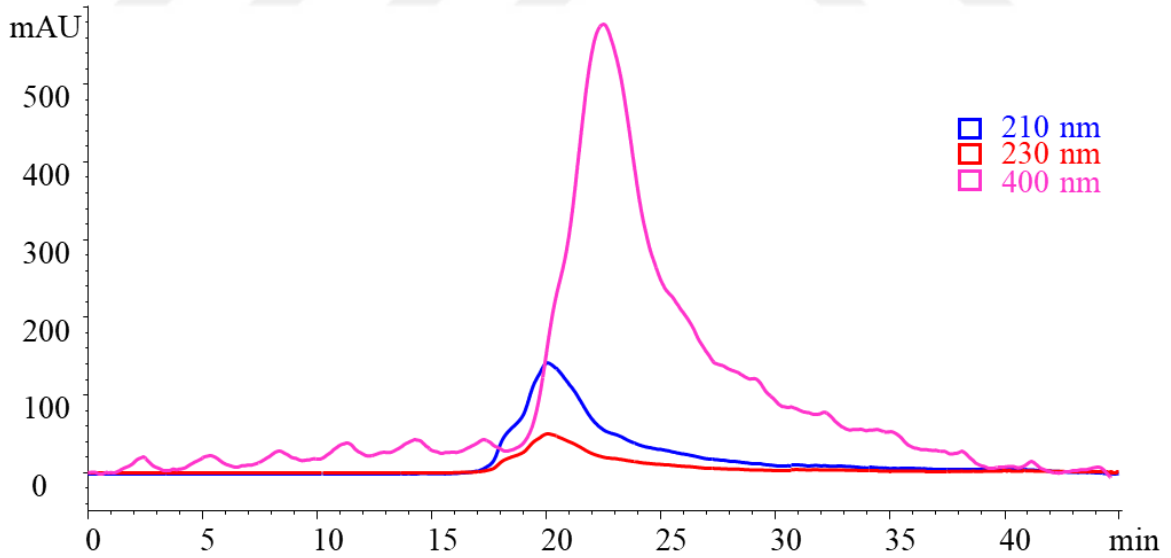
Şekil 55. 1 mg/mL BCA enziminin farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



Şekil 56. 1 mg/mL BCA enziminin farklı sıcaklıklarda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



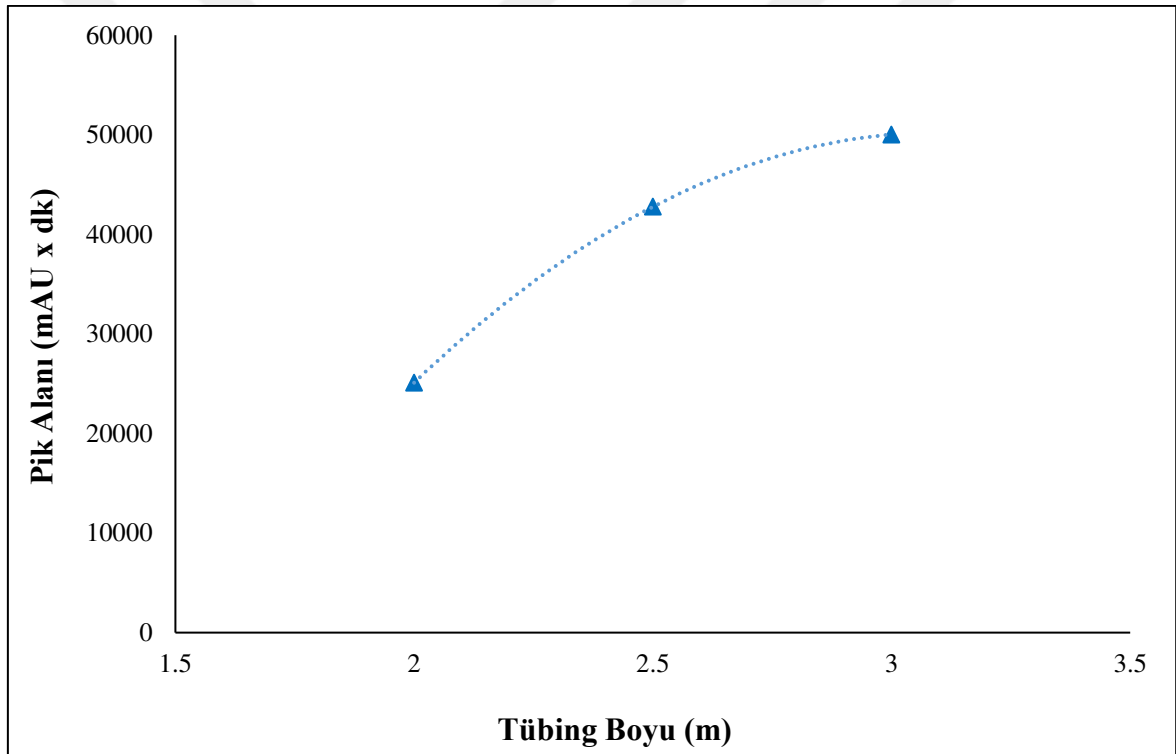
Şekil 57. Farklı sıcaklık değerlerine sahip pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



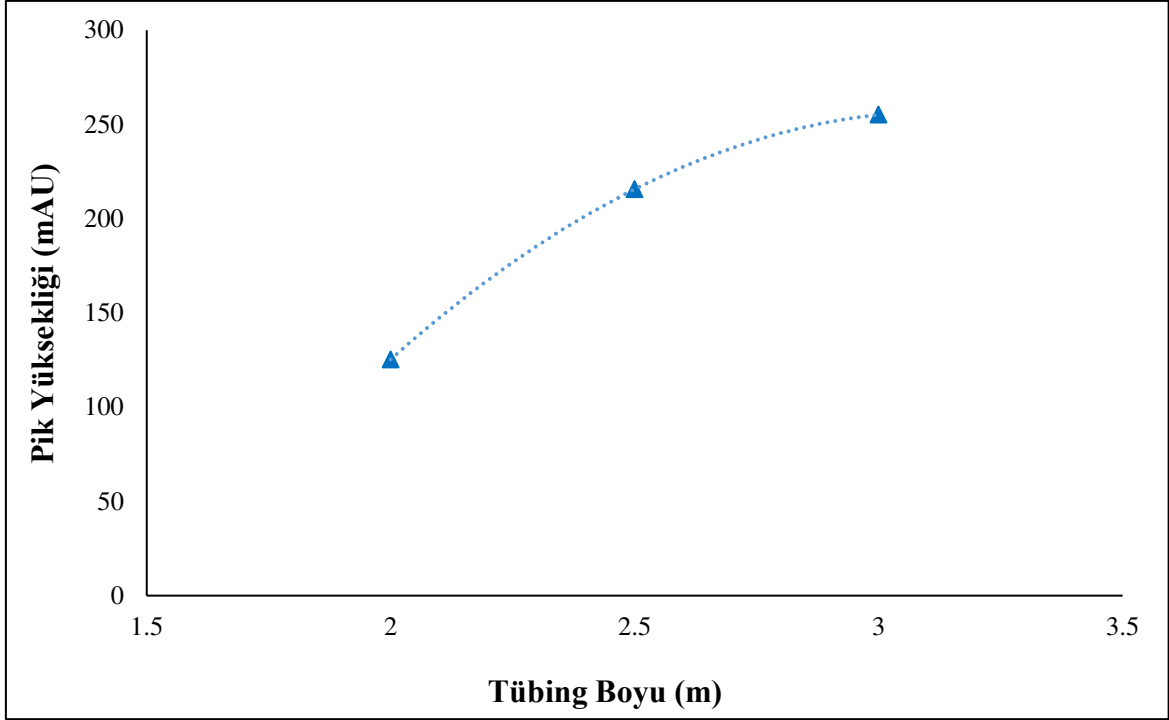
Şekil 58. 1 mg/mL BCA enzimi ile 45 °C sıcaklığında gerçekleşen reaksiyon sonucu 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

3.3.6. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Tübing Boyunun Etkisi

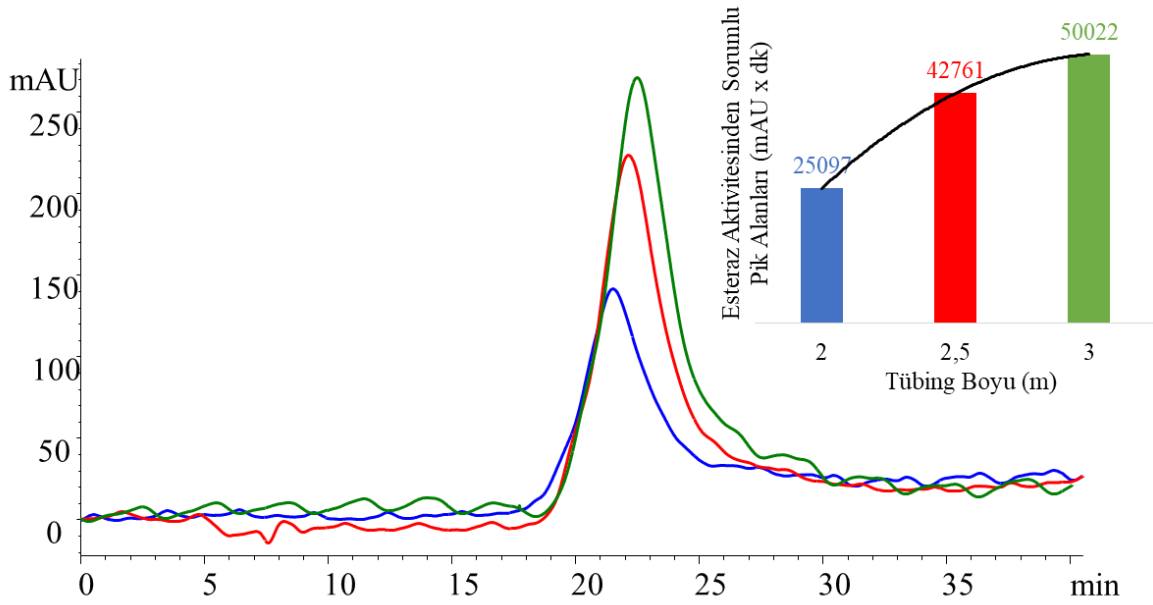
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 25 °C sıcaklıkta, 3 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonunda ve pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile farklı uzunluklara (2; 2,5 ve 3 m) sahip tübingler kullanılarak meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 3 m tübing boyu optimum olarak belirlendi (Şekil 59-62).



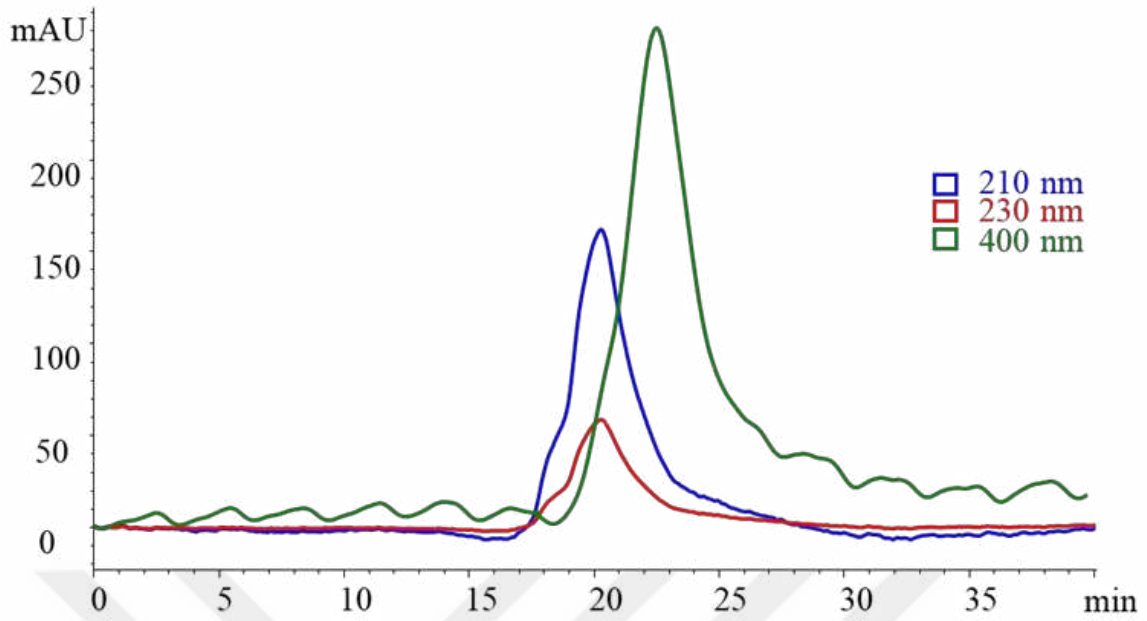
Şekil 59. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tübing boyunda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



Şekil 60. 1 mg/mL BCA enziminin farklı tübing boyunda gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esterez aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



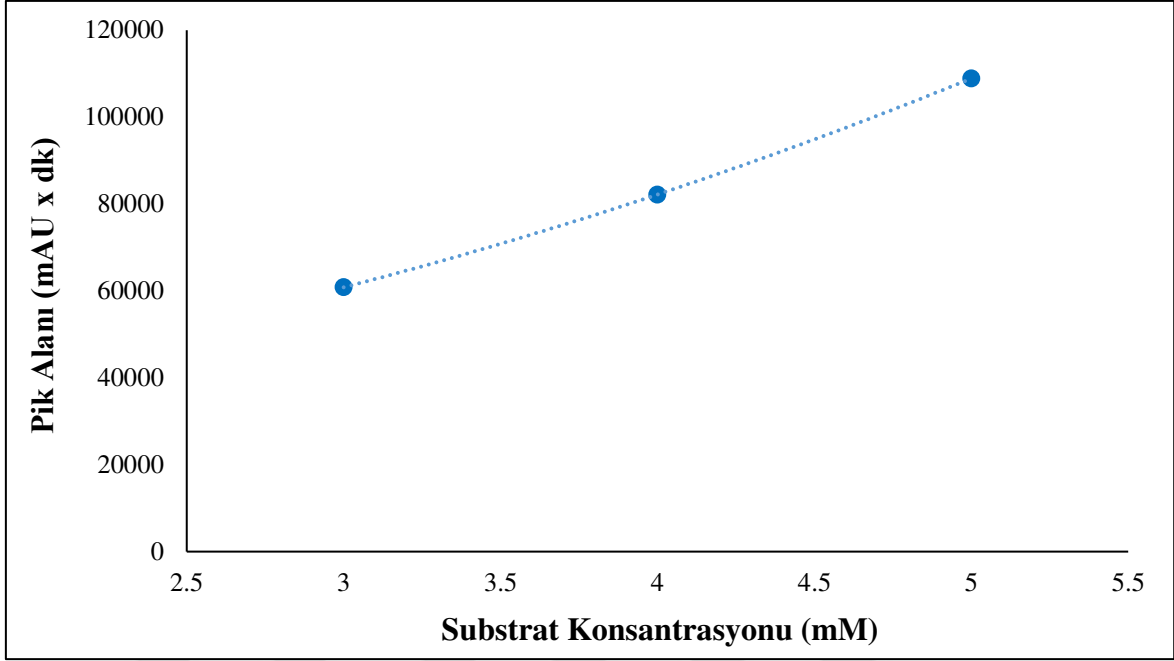
Şekil 61. Farklı tübing boylarında pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esterez aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar



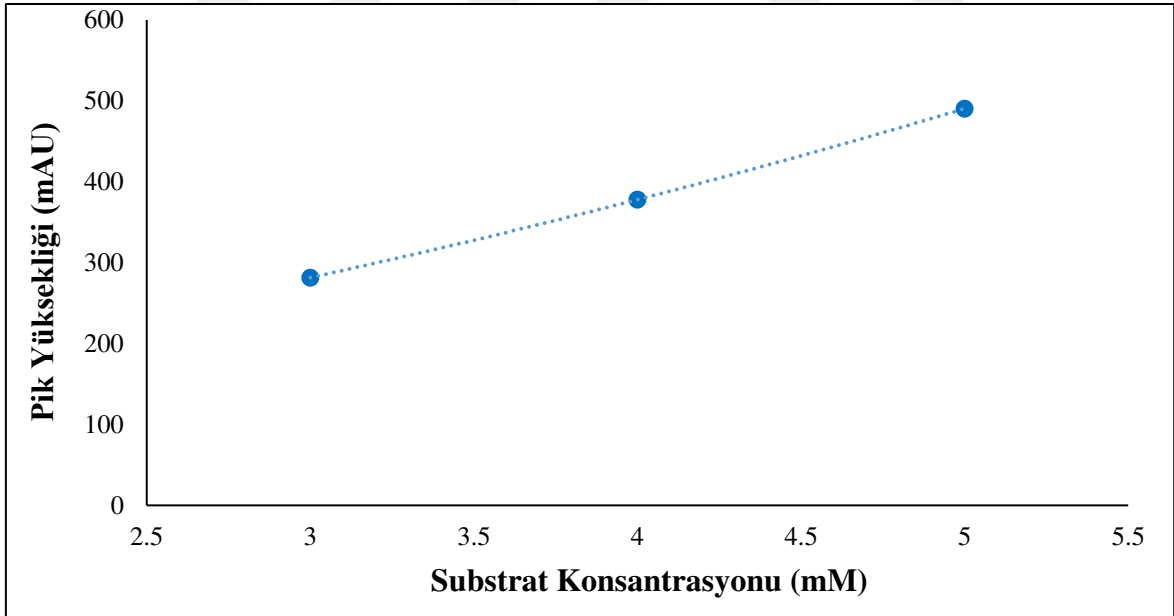
Şekil 62. 1 mg/mL BCA enzimi ile 3 m tübing boyu kullanılarak 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

3.3.7. BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

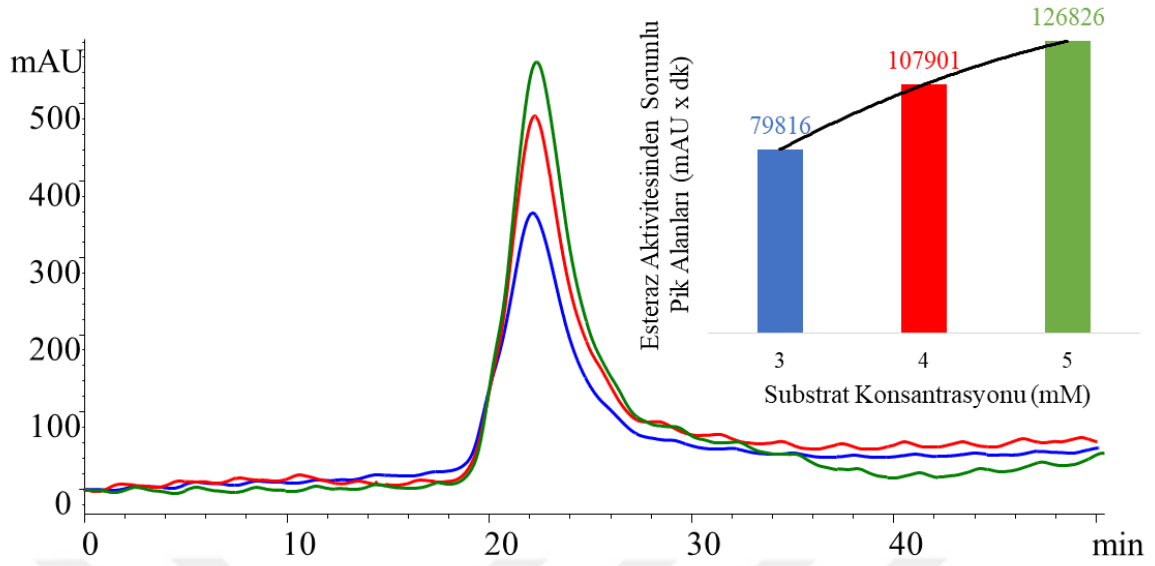
On-line HPLC sisteminde 1 mg/mL BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek, 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızında, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızında, 25 °C sıcaklıkta, 3 m tübing boyunda ve pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile farklı konsantrasyonlara (3, 4 ve 5 mM) sahip substrat (*p*-nitrofenil asetat) kullanılarak meydana gelen reaksiyon sonucu BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri değerlendirildi. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 5 mM substrat konsantrasyonu optimum olarak belirlendi (Şekil 63-66).



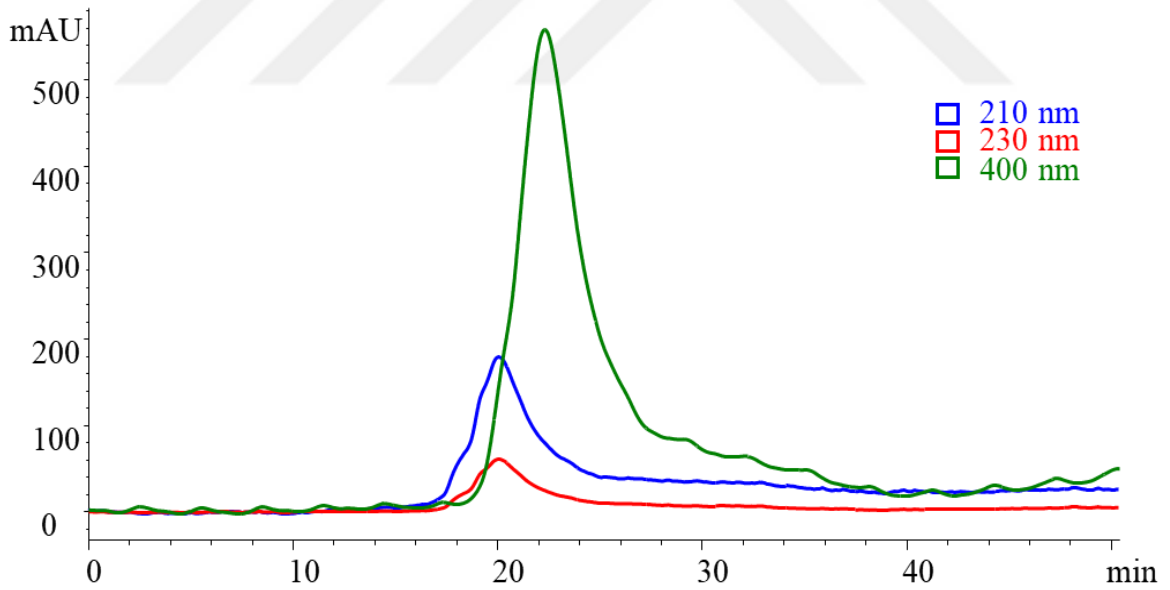
Şekil 63. 1 mg/mL BCA enziminin farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik alanlarının korelasyon grafiği



Şekil 64. 1 mg/mL BCA enziminin farklı substrat konsantrasyonlarında gerçekleşen reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen esteraz aktivite pik yüksekliklerinin korelasyon grafiği



Şekil 65. Farklı substrat konsantrasyonunda pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu ile HPLC pompa akış hızı 0,5 mL/dk, şırınga pompa akış hızı 0,3 mL/dk ayarlı sistemde 1 mg/mL BCA enziminin 400 nm dalga boylarındaki esteraz aktivitesinden sorumlu pikler ve bu piklerin sahip olduğu alanlar

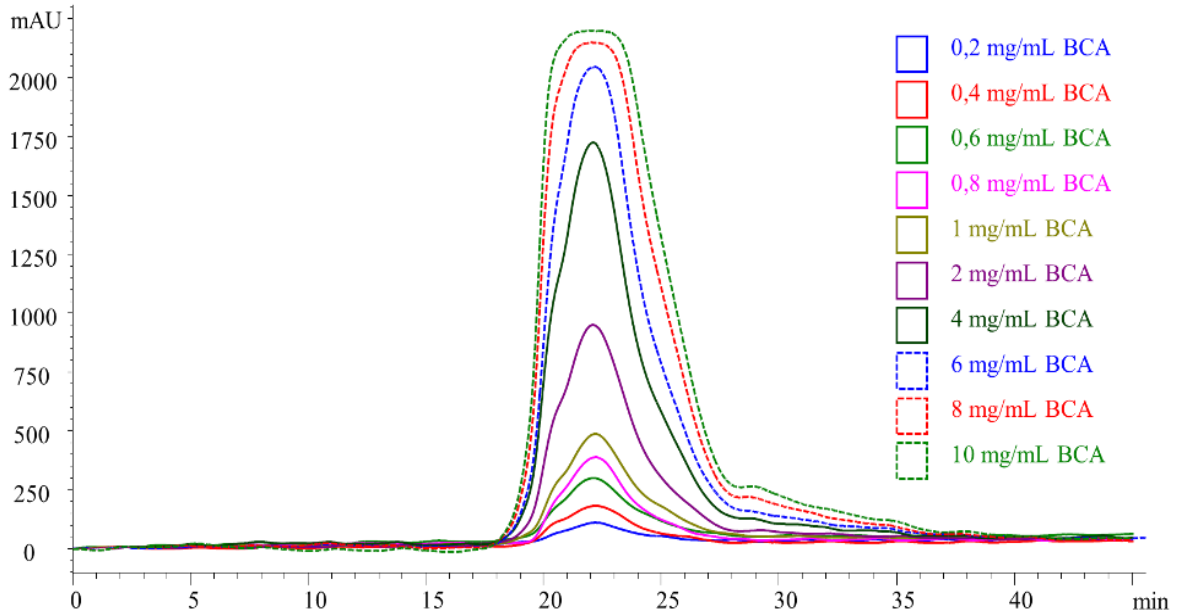


Şekil 66. 1 mg/mL BCA enzimi ile 5 mM substrat konsantrasyonunda 210 ve 230 nm dalga boylarında protein ayırımından ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar

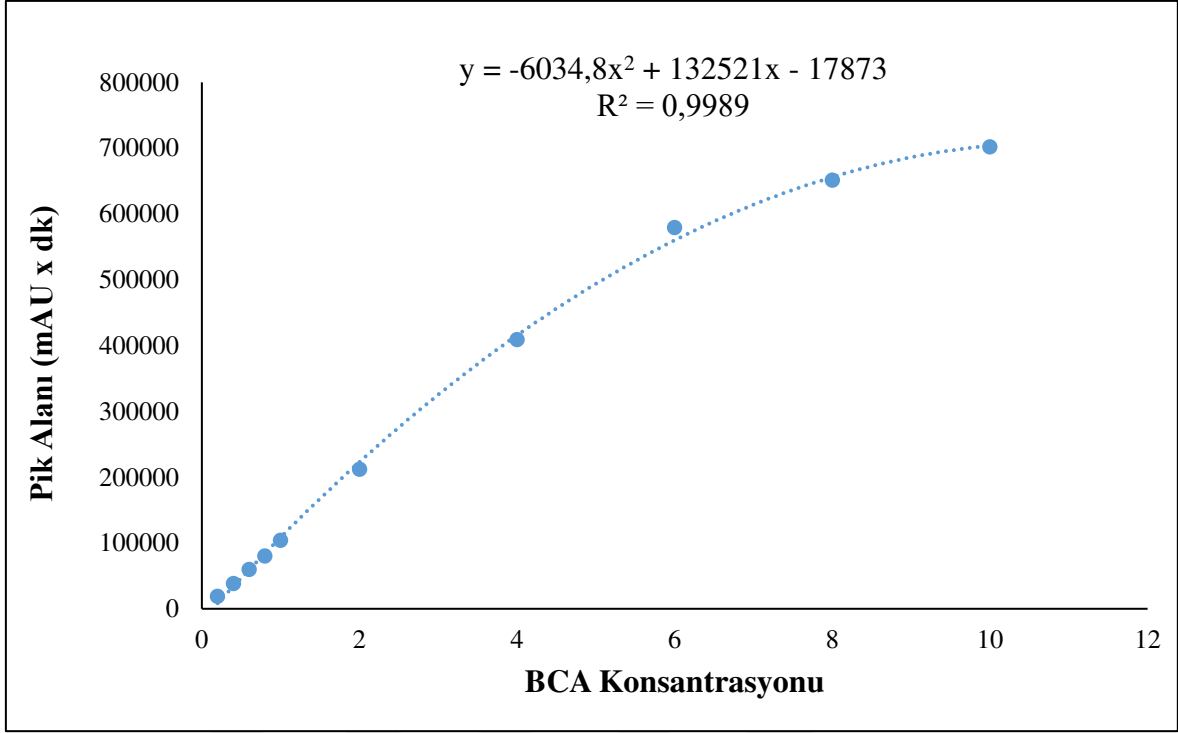
3.4. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Validasyon Çalışmaları

3.4.1. Doğrusallık

On-line HPLC sisteminde farklı konsantrasyonlarda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) hazırlanmış BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esterez aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi (Şekil 67). Bütün çalışmalar iki tekrar olacak şekilde yapıldı. Enzim konsantrasyonu-pik alanı kalibrasyon eğrisi çizilerek grafik üzerinden korelasyon katsayısı (r^2), y eksenini kesme noktası ve regresyon çizgisinin eğimi belirlendi (Şekil 68). BCA enzim konsantrasyonunun 6 mg/mL seviyelerine kadar doğrusal aktivite sinyali verdiği ve bu konsantrasyondan sonra doğrusallıktan saparak plato yapmaya başladığı tespit edildi.



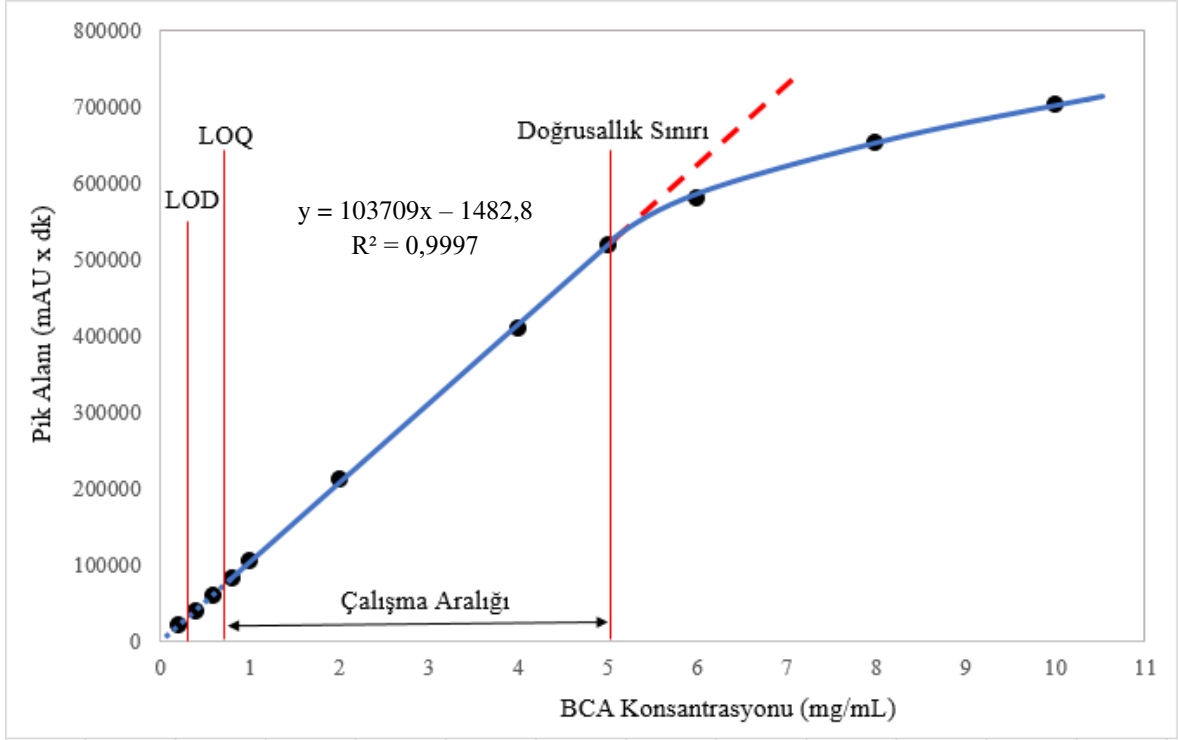
Şekil 67. Farklı konsantrasyonlu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) BCA enzimi ile 5 mM konsantrasyonlu substratın 400 nm dalga boyundaki esterez aktivitesinden sorumlu pikleri gösteren kromatogramlar



Şekil 68. Farklı konsantrasyonlu (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) BCA enzimi ile 5 mM konsantrasyonlu substrat çözeltisinin 400 nm dalga boyundaki esteraz aktivitesinden sorumlu piklerin alanlarının verdiği korelasyon grafiği

3.4.2. Doğrusal Aralık

On-line HPLC sisteminde farklı konsantrasyonlarda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) hazırlanmış BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Bütün çalışmalar iki tekrar olacak şekilde yapıldı. Enzim konsantrasyonu-pik alanı kalibrasyon eğrisi çizilerek grafik üzerinden korelasyon katsayısı (r^2), y eksenini kesme noktası ve regresyon çizgisinin eğimi belirlendi (Şekil 69). 5 mg/mL BCA enzim konsantrasyon seviyesine kadar doğrusal ($R^2 = 0,9997$) aktivite sinyali tespit edildi ve bu bölge doğrusal aralık olarak belirlendi.



Şekil 69. Çalışma aralığı, tespit (LOD) sınırı, tayin (LOQ) sınırı ve doğrusallık sınırının gösterildiği grafik

3.4.3. Tespit (LOD) Sınırı

On-line HPLC sisteminde düşük konsantrasyonlu (0,2 mg/mL) BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM *p*-nitrofenilasetat substrat konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Çalışma on tekrar olacak şekilde yapıldı. Yapılan on bağımsız ölçümün pik alanlarının standart sapması 691 mAU x dk olarak, pik yüksekliklerinin standart sapması ise 2,69 olarak bulundu. Standart sapma değerleri 3 ile çarpılarak LOD' un pik alanına karşılık gelen sayısal değeri 2073 mAU x dk olarak, pik yüksekliğine karşılık gelen sayısal değeri 8,07 mAU olarak belirlendi (Tablo 12). Daha önceden çizilen pik alanına karşı BCA konsantrasyonunu veren kalibrasyon grafiğinden LOD değerinin konsantrasyon karşılığı 0,03 mg/mL olarak belirlendi. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada örnek körünün

(içerisinde analit bulunmayan matriks) 2 bağımsız ölçümünün vermiş olduğu gürültülerin ortalaması hesaplandı ve 3,75 mAU olarak bulundu. Gürültülerin ortalaması 3 ile çarpılarak LOD değerinin pik yüksekliği olarak karşılığı 11,25 mAU olarak bulundu.

Tablo 12. 0,2 mg/mL BCA enzimi ile elde edilen LOD verileri (n=10)

Pik Alanı				
BCA Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama (mAU x dk)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma	LOD
0,20	16506	691	4,18	2073
Pik Yüksekliği				
BCA Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama (mAU)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma	LOD
0,20	76,64	2,69	3,51	8,07

3.4.4. Tayin (LOQ) Sınırı

On-line HPLC sisteminde düşük konsantrasyonlu (0,2 mg/mL) BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM *p*-nitrofenilasetat substrat konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Çalışma on tekrar olacak şekilde yapıldı. Yapılan on bağımsız ölçümün pik alanlarının standart sapması 691 mAU x dk olarak, pik yüksekliklerinin standart sapması ise 2,69 mAU olarak bulundu. Standart sapma değeri 10 ile çarpılarak LOQ' un pik alanına karşılık gelen sayısal değeri 6910 mAU x dk olarak, pik yüksekliğine karşılık gelen sayısal değeri 26,90 mAU olarak belirlendi (Tablo 13). Daha önceden çizilen pik alanına karşı BCA konsantrasyonunu veren kalibrasyon grafiğinden LOQ değerinin konsantrasyon karşılığı 0,07 mg/mL olarak belirlendi. Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada örnek körünün (içerisinde analit bulunmayan matriks) 2 bağımsız ölçümünün vermiş olduğu gürültülerin

ortalaması hesaplandı ve 3,75 mAU olarak bulundu. Gürültülerin ortalaması 10 ile çarpılarak LOD değerinin pik yüksekliği olarak karşılığı 37,50 mAU olarak bulundu.

Tablo 13. 0,2 mg/mL BCA enzimi ile elde edilen LOQ verileri (n=10)

Pik Alanı				
BCA Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama (mAU x dk)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma	LOQ
0,20	16506	691	4,18	6910
Pik Yüksekliği				
BCA Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama (mAU)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma	LOQ
0,20	77,00	2,69	3,51	26,90

Yapılan çalışmalar sonucunda doğrusal aralık, tespit (LOD) sınırı ve tayin (LOQ) sınırlarının tespit edilmesiyle güvenilir çalışma bölgesi belirlendi (Şekil 69).

3.4.5. Kesinlik

On-line HPLC sisteminde doğrusal aralık sınırları içerisinde düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı konsantrasyonda (0,2 ve 4 mg/mL) BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM *p*-nitrofenilasetat substrat konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esterase aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) ve ara kesinlik (günler arası kesinlik) her bir konsantrasyon için altı tekrar olacak şekilde yapıldı. 0,2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlu tekrarlanabilirliğin % bağıl standart sapma değerleri pik alanları açısından sırasıyla 0,81 ve 0,42 olarak tespit edildi (Tablo 14). 0,2 ve 4 mg/mL konsantrasyonlu ara kesinliğin % bağıl standart sapma değerleri pik alanları açısından sırasıyla 0,89 ve 0,43 olarak tespit edildi

(Tablo 15). Elde edilen sonuçlar yöntemin tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik bakımından oldukça iyi olduğunu gösterdi.

Tablo 14. 0,2 ve 4 mg/mL BCA enzimlerinin aktivite pik alanları üzerinden tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik) sonuçları (n=6)

Kesinlik			
Tekrarlanabilirlik (gün içi kesinlik)			
	Ortalama (mAU x dk)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
0,2 mg/mL	16663	135	0,81
4 mg/mL	444474	1877	0,42

Tablo 15. 0,2 ve 4 mg/mL BCA enzimlerinin aktivite pik alanları üzerinden ara kesinlik (günler arası kesinlik) sonuçları (n=6)

Kesinlik			
Ara kesinlik (günler arası kesinlik)			
	Ortalama (mAU x dk)	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
0,2 mg/mL	16635	149	0,89
4 mg/mL	441347	1901	0,43

3.4.6. Sağlamlık

Yöntemin sağlamlığı akış hızı (0,48 ve 0,52 mL/dk), reaksiyon sıcaklığı (24,5 ve 25,5 °C), hareketli fazın pH' sı (8,15 ve 8,25) ve hareketli fazın konsantrasyonu (0,14 ve 0,16 M) üzerinde küçük değişiklikler yapılarak değerlendirildi. On-line HPLC sisteminde akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve hareketli fazın konsantrasyonu farklılaştırılarak BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilip boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda

kromatografik ayırım gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Her bir çalışma iki paralel olacak şekilde yapıldı. Akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve hareketli fazın konsantrasyonunda yapılan küçük değişiklikler sonucunda % bağıl hatanın % 5 seviyelerinin altında kalması yöntemin sağlamlığını göstermektedir (Tablo 16). Yöntemin en fazla etkilendiği parametrenin sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. $\pm 0,5$ °C sıcaklık değişimlerinde kabul edilebilir % bağıl hatagözlenirken, ± 1 °C ve daha yüksek sıcaklık farklılıklarında bağıl hatanın % 5 seviyelerini geçtiği tespit edilmiştir.

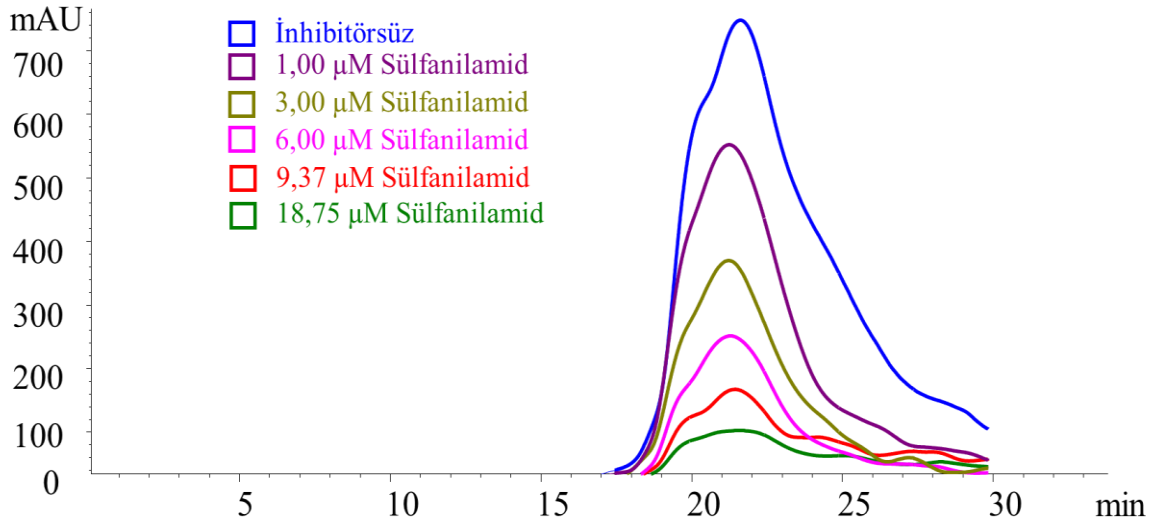
Tablo 16. Akış hızı, reaksiyon sıcaklığı, hareketli fazın pH' sı ve hareketli fazın konsantrasyonu üzerindeki küçük değişimlerle elde edilen sağlamlık sonuçları

	BCA Konsantrasyonu (mg/mL)	Ortalama Pik Alanı (mAU x dk)	% Bağıl Hata
Akış Hızı (mL/dk)			
0,48	1	107486	3,67
0,50	1	103686	
0,52	1	100199	-3,36
Reaksiyon Sıcaklığı (°C)			
24,5	1	101691	-2,68
25	1	113894	
25,5	1	132941	4,18
Hareketli Faz pH' sı			
8,15	1	103356	-0,57
8,20	1	103950	
8,25	1	104918	0,93
Hareketli Faz Konsantrasyonu (M)			
0,14	1	103354	-0,38
0,15	1	103950	
0,16	1	104195	0,24

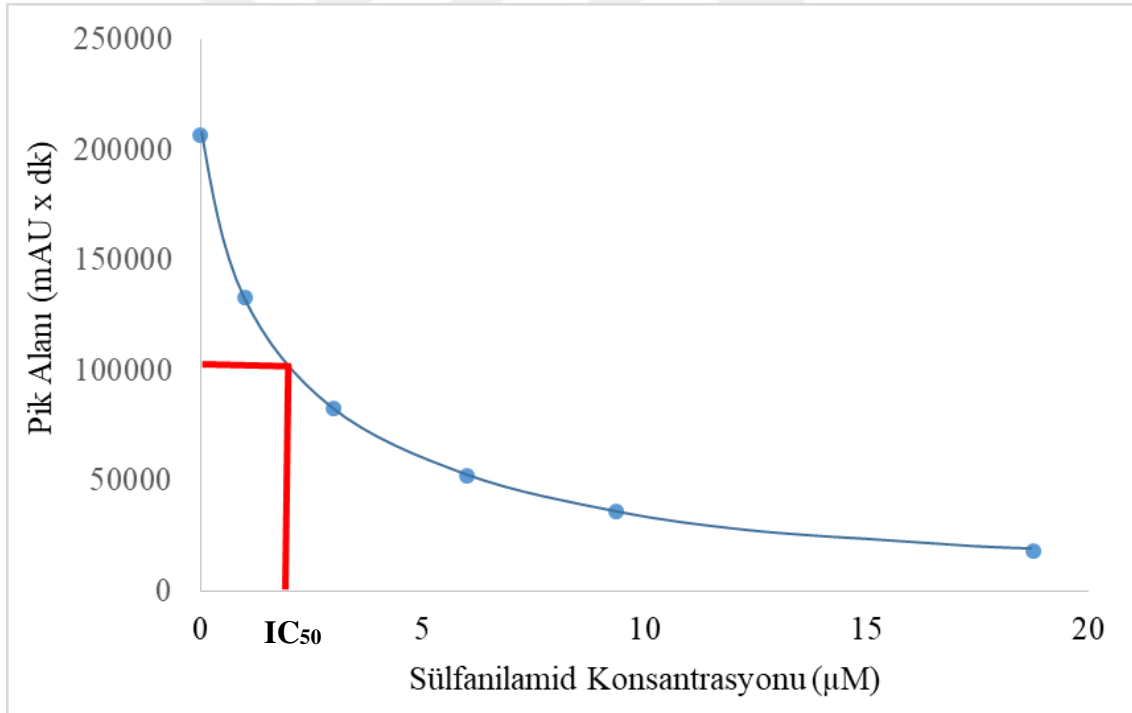
3.5. Protein Karışımları ve Doğal Numunelere Uygulanan On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Bulguları

3.5.1.BCA Enziminin Esteraz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Sülfanilamidin IC₅₀ Değerinin On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemi ile Belirlenmesi

On-line HPLC sisteminde 2 mg/mL BCA enzimi optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Esteraz aktivite tayin yöntemiyle CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamidin BCA enzimi üzerindeki inhibisyon etkisini on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi ile kromatografik olarak belirleyebilmek adına substrat, inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (18,75; 9,37; 6; 3 ve 1 µM) inhibitör içerecek şekilde sisteme gönderilerek aktiviteden sorumlu pik alanları belirlendi (Şekil 70). Pik alanına karşı sülfanilamid konsantrasyonu grafiği üzerinden BCA enziminin %50 inhibisyonuna sebep olan sülfanilamid konsantrasyonu (IC₅₀) 2,1 µM olarak hesaplandı (Şekil 71).



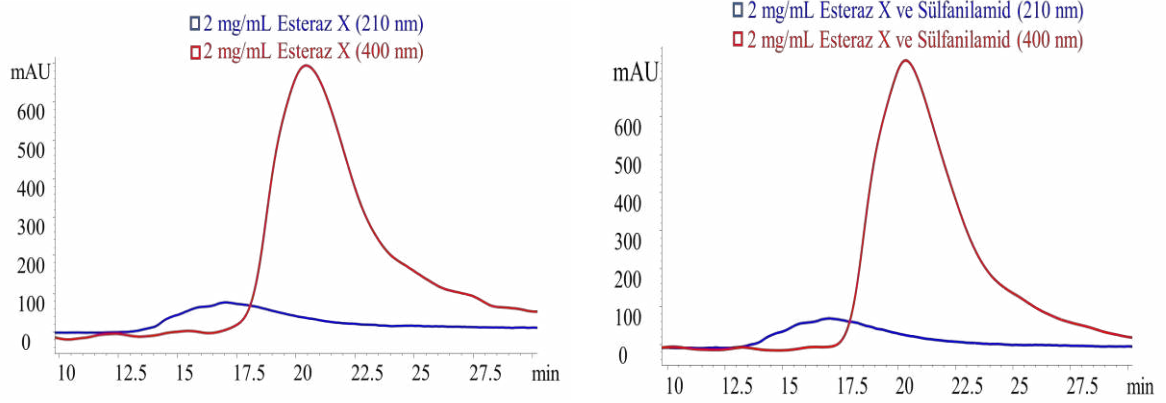
Şekil 70. 2 mg/mL BCA enziminin inhibitörsüz ve farklı son konsantrasyonlarda (18,75; 9,37; 6; 3 ve 1 µM sülfanilamid) inhibitör çözeltisi içeren substratla reaksiyonu sonucu 400 nm dalga boyunda elde edilen aktivite piklerine ait kromatogramlar



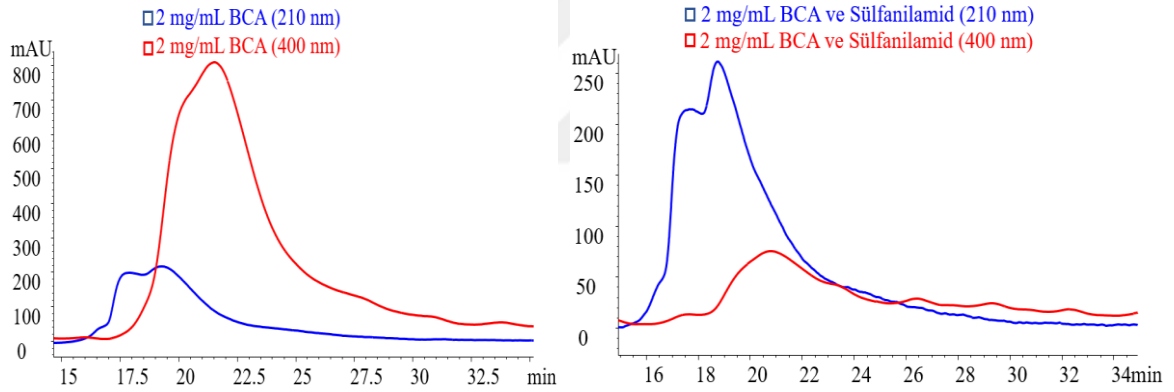
Şekil 71. On-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi ile 400 nm dalga boyunda CA' nın inhibitörlerinden sülfanilamid için IC₅₀ değerinin 2,1 µM bulunması adına çizilen % Aktivite-[Sülfanilamid] grafiği

3.5.2. Protein İçeriği Bilinen Standart Protein Karışımlarının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması

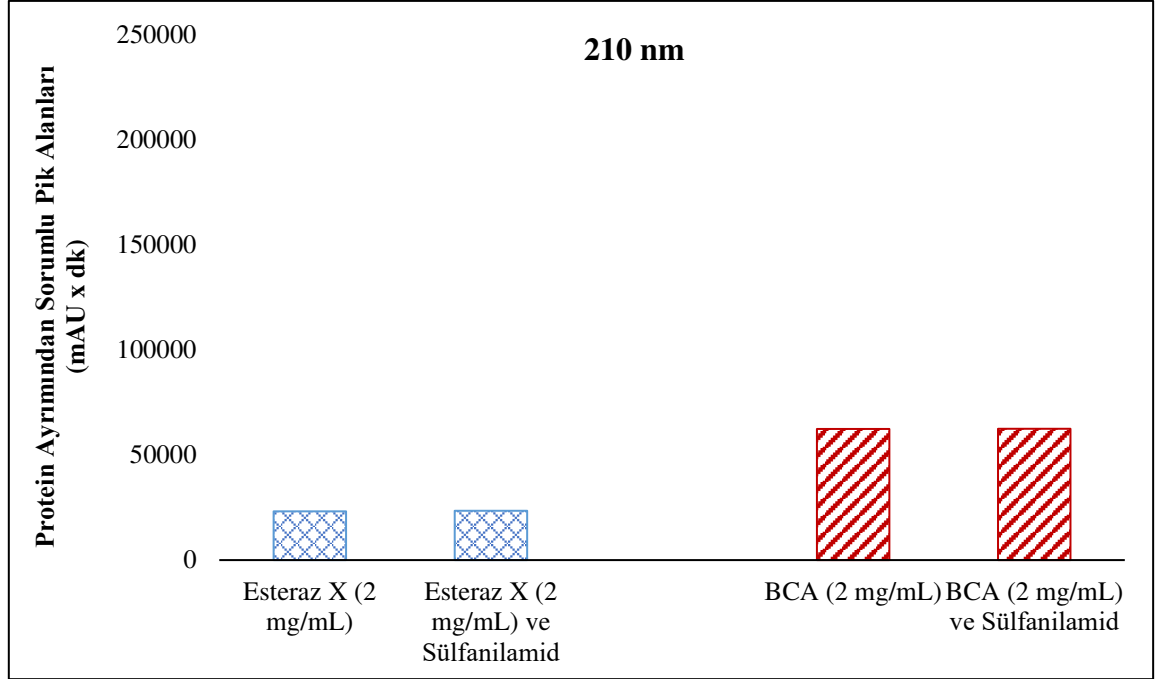
On-line HPLC sisteminde BCA, Esteraz X ve bu iki enzimin karışım çözeltileri son konsantrasyonları 2 mg/mL olacak şekilde optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Esteraz aktiviteleri 400 nm dalga boyunda pik alanları üzerinden tespit edilen protein ve protein karışımları, CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid özeltisi (18 µM son konsantrasyonlu) ile reaksiyona sokularak inhibisyon takip edildi. Bu reaksiyon sonucunda Esteraz X enziminin esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanında herhangi bir değişiklik olmazken (Şekil 72 ve 75), BCA enziminin esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanında önemli bir azalma olduğu görüldü (Şekil 73 ve 75). BCA ve Esteraz X enzimlerinin karışımı ile hazırlanan protein çözeltisinin esteraz aktivitesinden sorumlu olan pik alanının inhibitör yokluğunda her iki enzimin aktiviteleri oranında artış gösterdiği, inhibitör varlığında ise BCA enziminin inhibisyon oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 76, 77 ve 78). BCA ve Esteraz X enzimlerinin karışımı ile hazırlanan protein çözeltisinin 210 nm dalga boyunda protein ayrımı ve 400 nm dalga boyunda esteraz aktivite tayini için inhibitör yokluğunda (Şekil 79, 80 ve 81) ve inhibitör varlığında (Şekil 82, 83, 84 ve 85) her bir proteinin bireysel katkısı kadar sinyal oluşturduğu belirlendi. Yapılan alışmalar on-line HPLC-CA yönteminin protein içeriği bilinen çözeltilere rahatlıkla uygulanabileceğini gösterdi. Yeni geliştirilen yöntemle hem esteraz aktiviteli proteinler belirlenebilmekte, hem de karbonik anhidraz diğer esterazlardan ayırt edilebilmektedir.



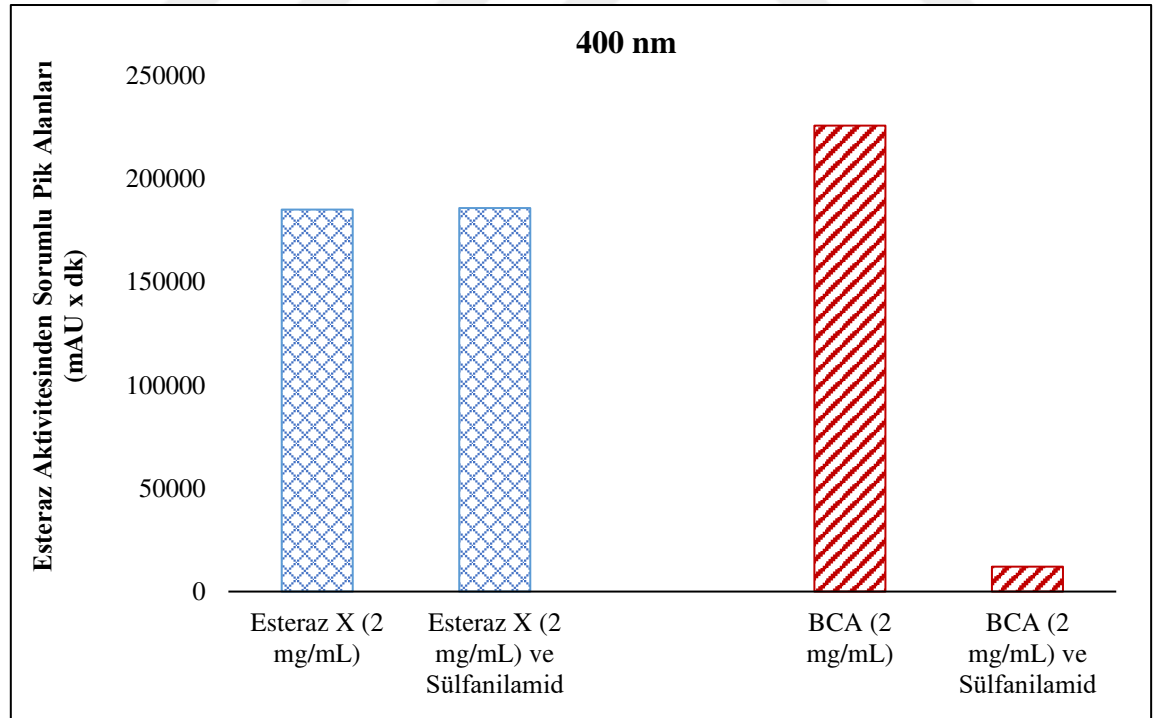
Şekil 72. 2 mg/mL Esteraz X enziminin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



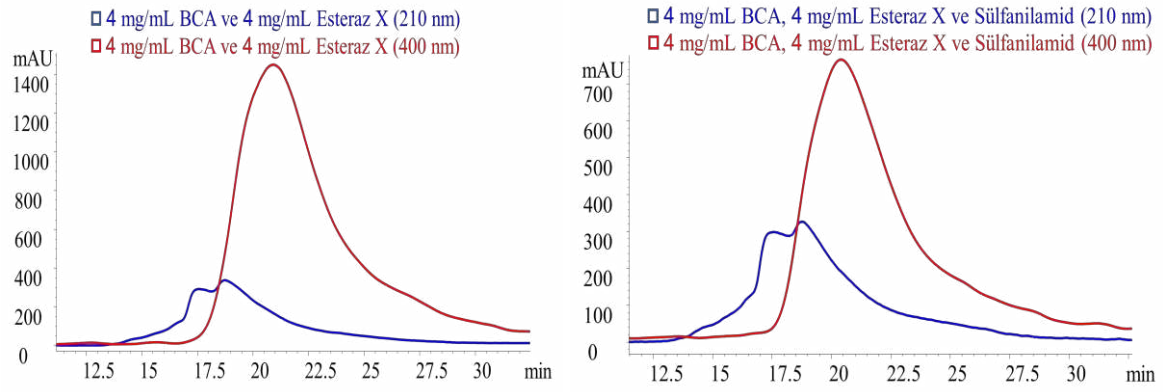
Şekil 73. 2 mg/mL BCA enziminin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



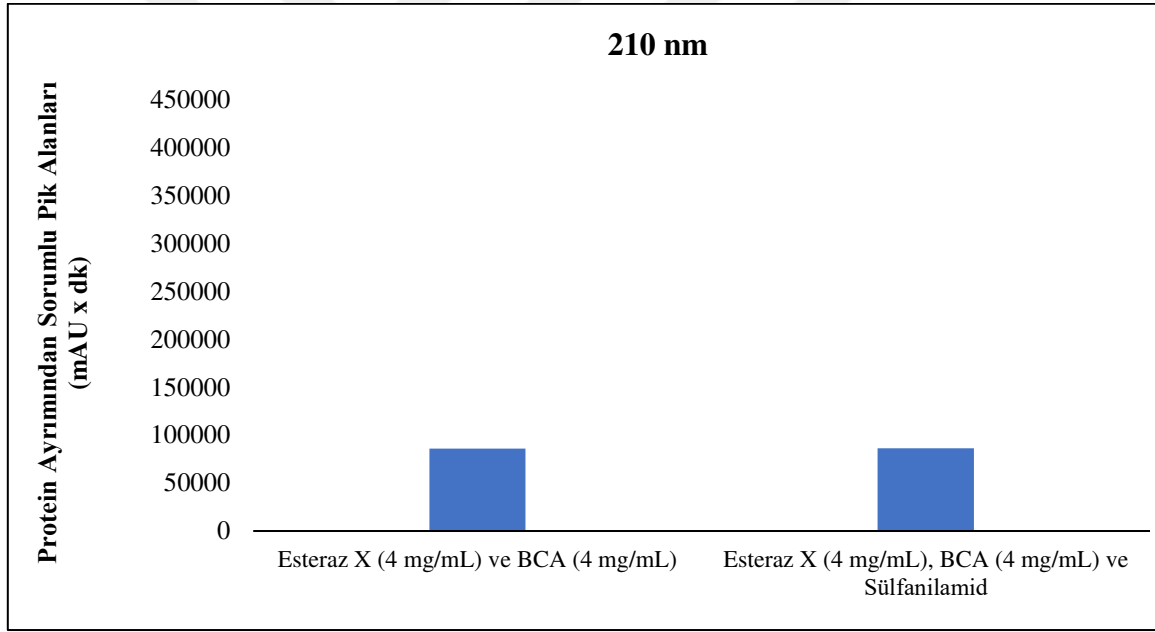
Şekil 74. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzim çözeltilerinin ve bu enzimlerin inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler



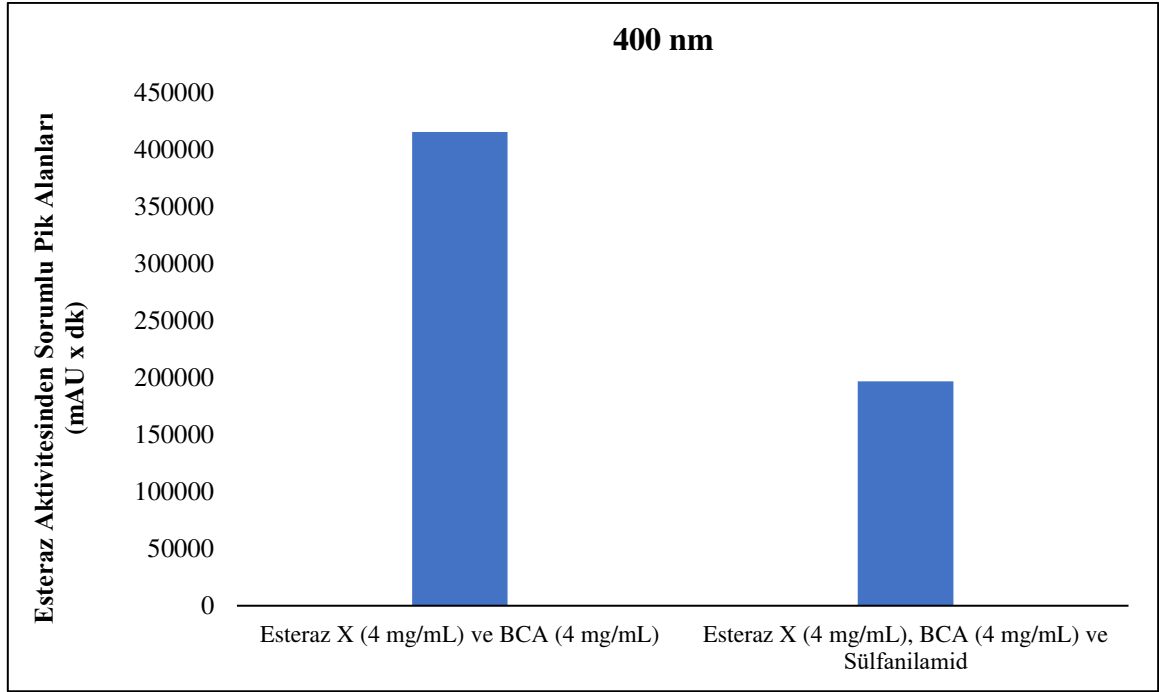
Şekil 75. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzim çözeltilerinin ve bu enzimlerin inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler



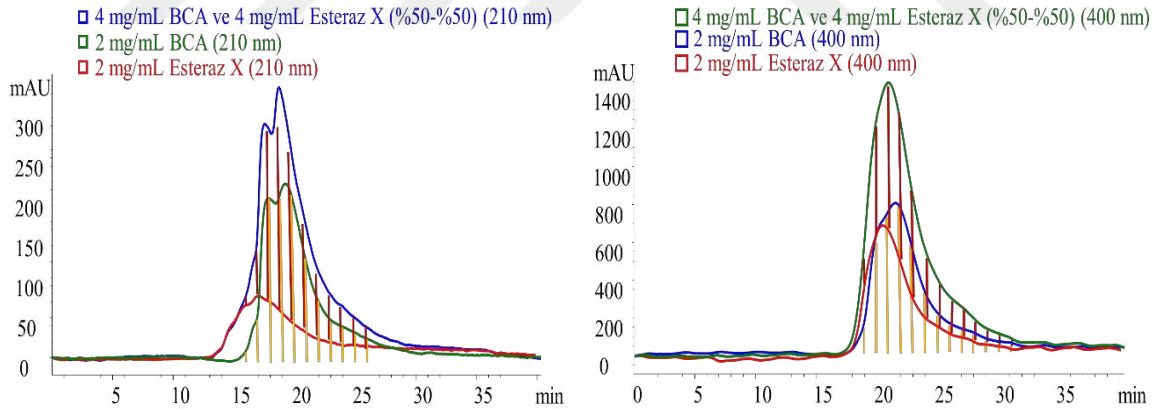
Şekil 76. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltilerinin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sulfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



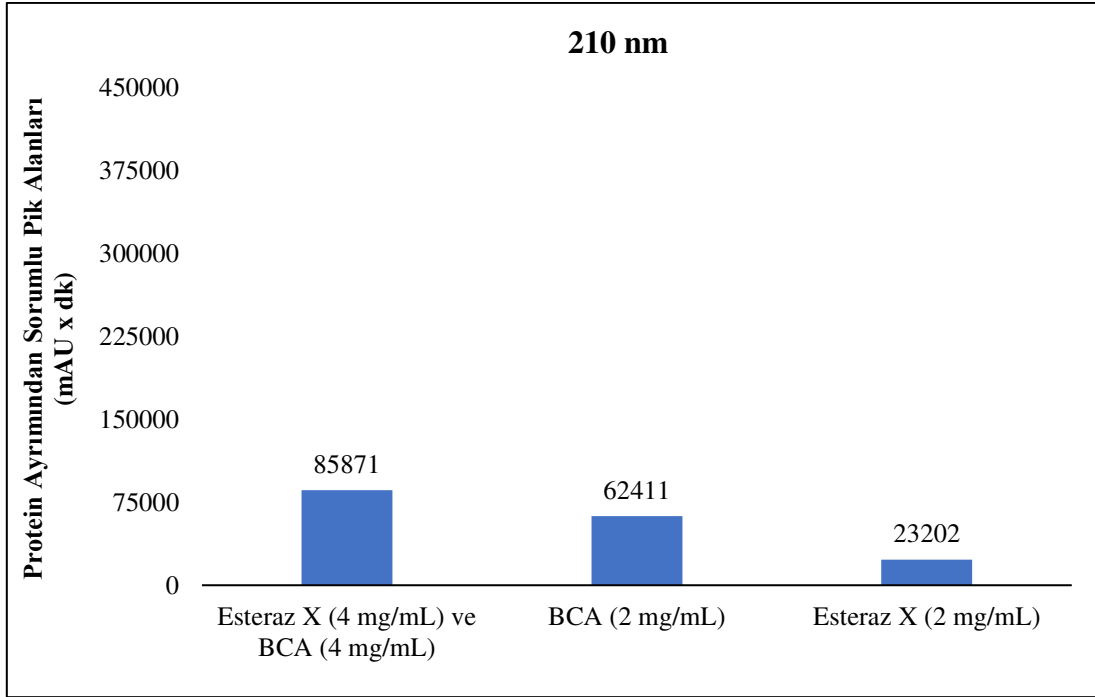
Şekil 77. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sulfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayrımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler



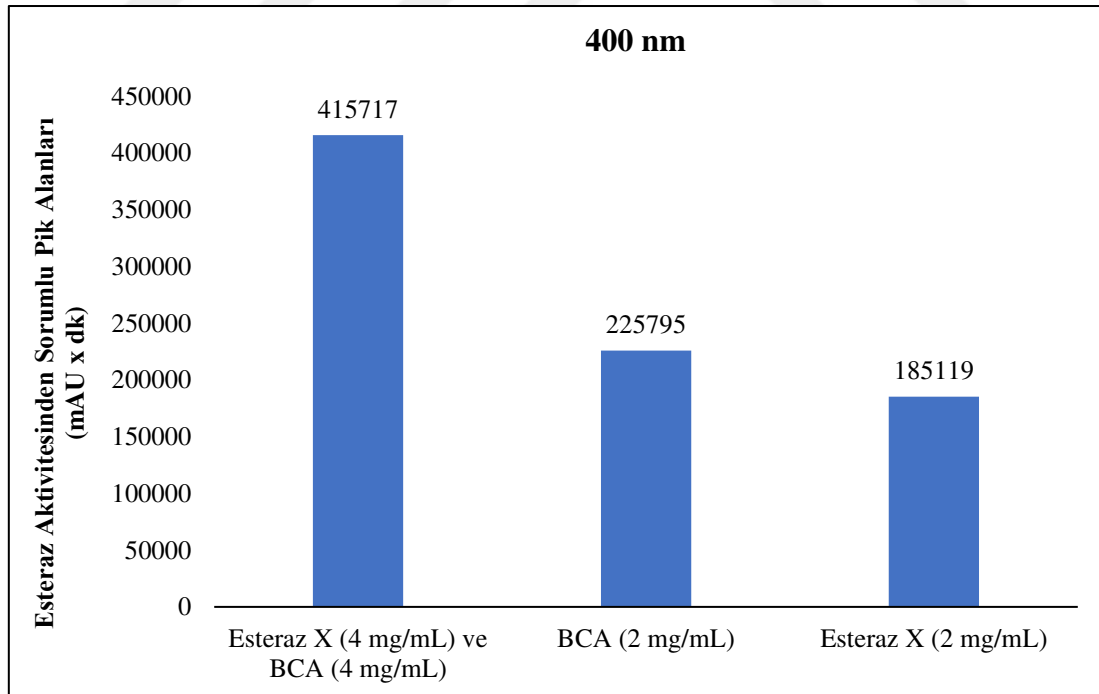
Şekil 78. Son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler



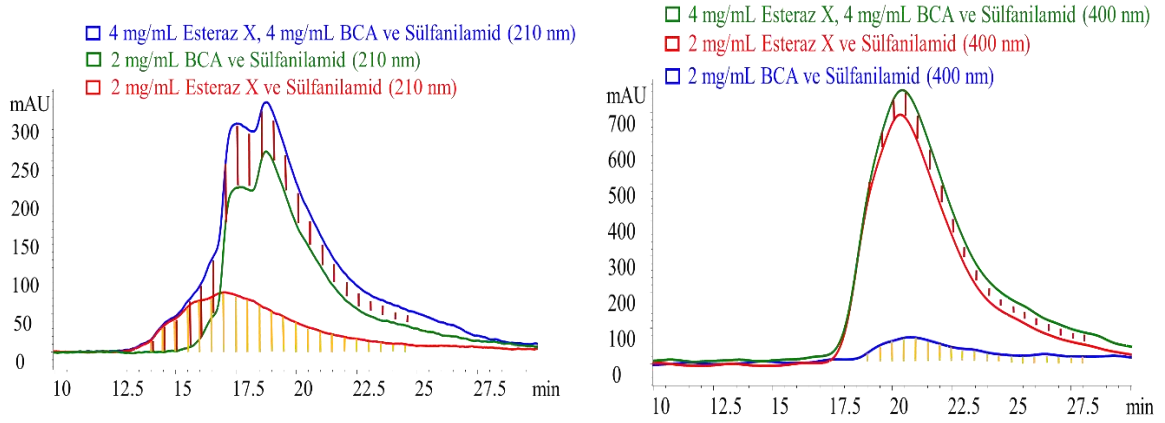
Şekil 79. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzimlerinin ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltisinin 210 nm de kromatografik ayrımı ve inhibitör içermeyen substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarının bireysel ve birlikte verdiği sinyaller



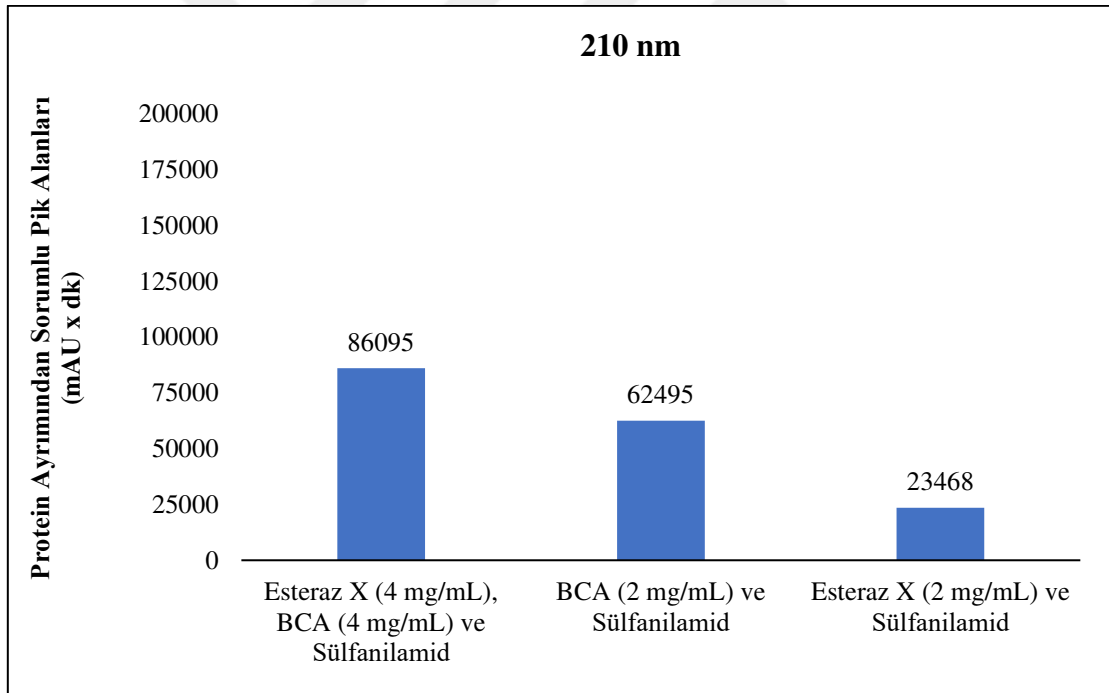
Şekil 80. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltisinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler



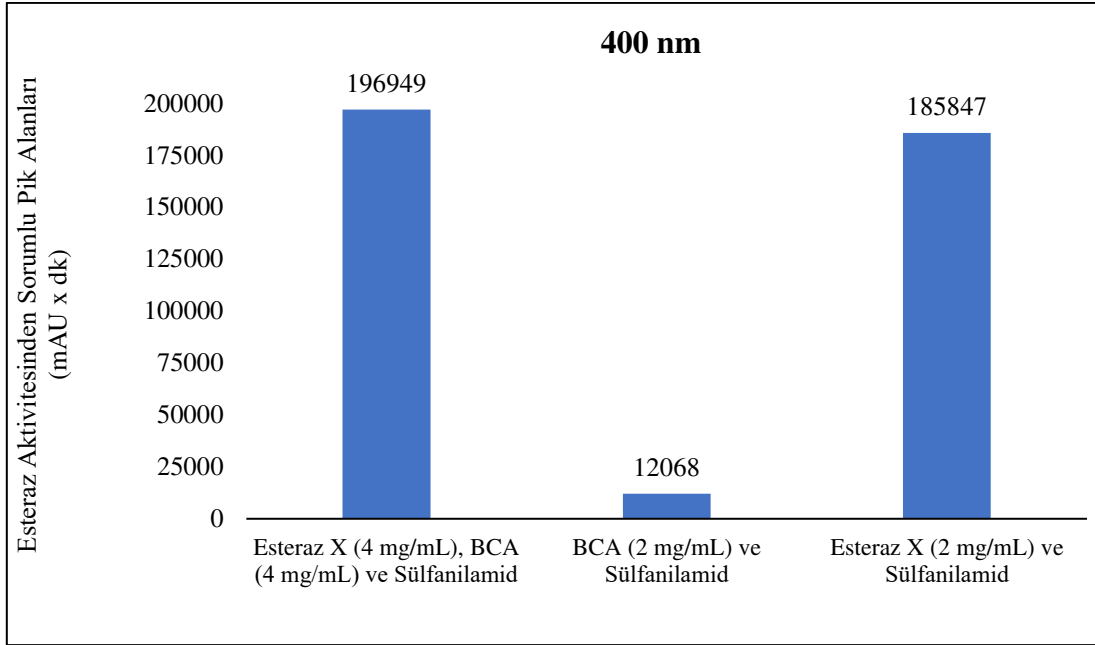
Şekil 81. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltisinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler



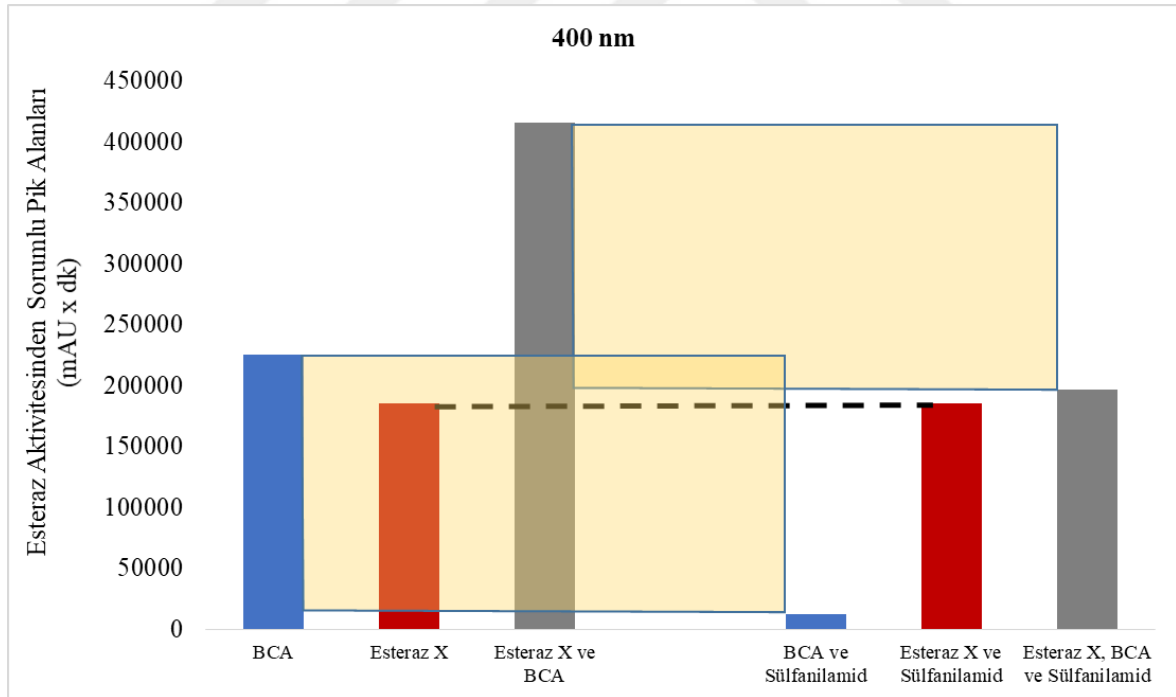
Şekil 82. 2 mg/mL BCA ve Esteraz X enzimlerinin ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışım çözeltisinin 210 nm de kromatografik ayrımı ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltisi ile reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarının bireysel ve birlikte verdiği sinyaller



Şekil 83. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 210 nm de kromatografik protein ayırımından sorumlu pik alanlarına ait grafikler



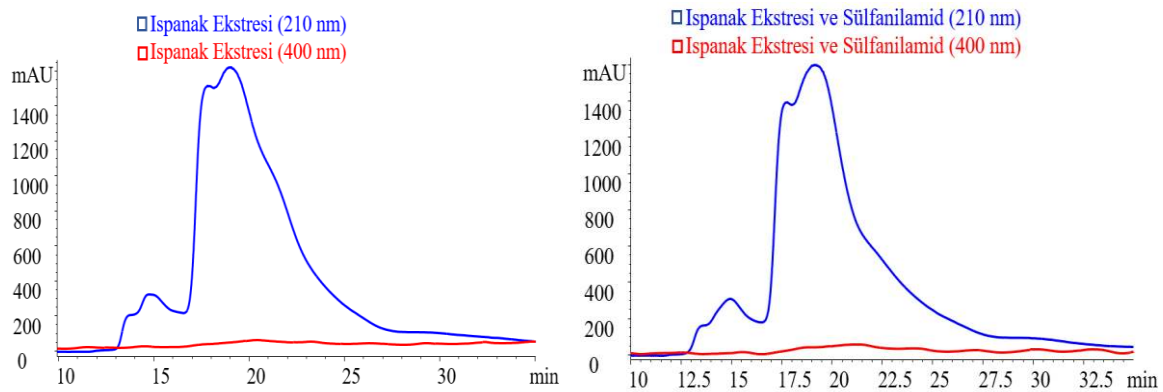
Şekil 84. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de kromatografik esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler



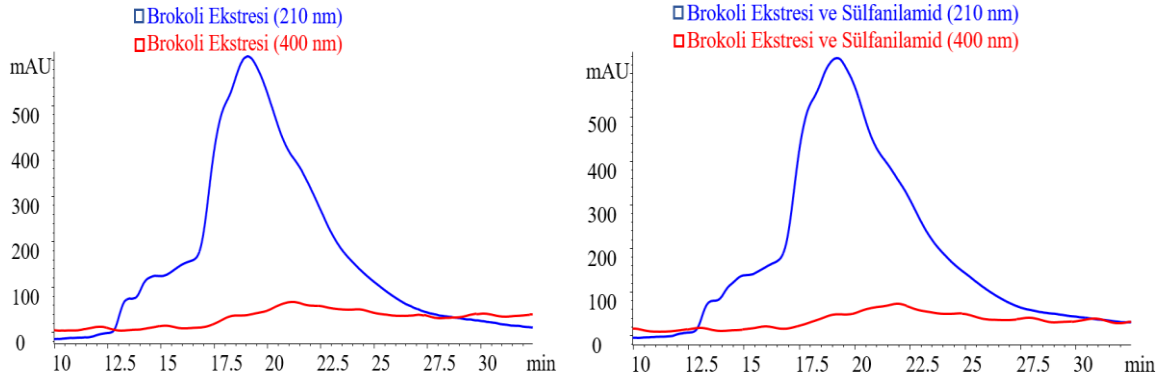
Şekil 85. 2 mg/mL BCA, 2 mg/mL Esteraz X ve son konsantrasyonları 2 mg/mL olan BCA ve Esteraz X karışımının ve bu karışımın inhibitör (sülfanilamid) içeren çözeltilerinin 400 nm de esteraz aktivitelerinden sorumlu pik alanlarına ait grafikler

3.5.3. Protein İçeriği Bilinmeyen Bitki ve Hayvan Dokularının On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yöntemine Uygulanması

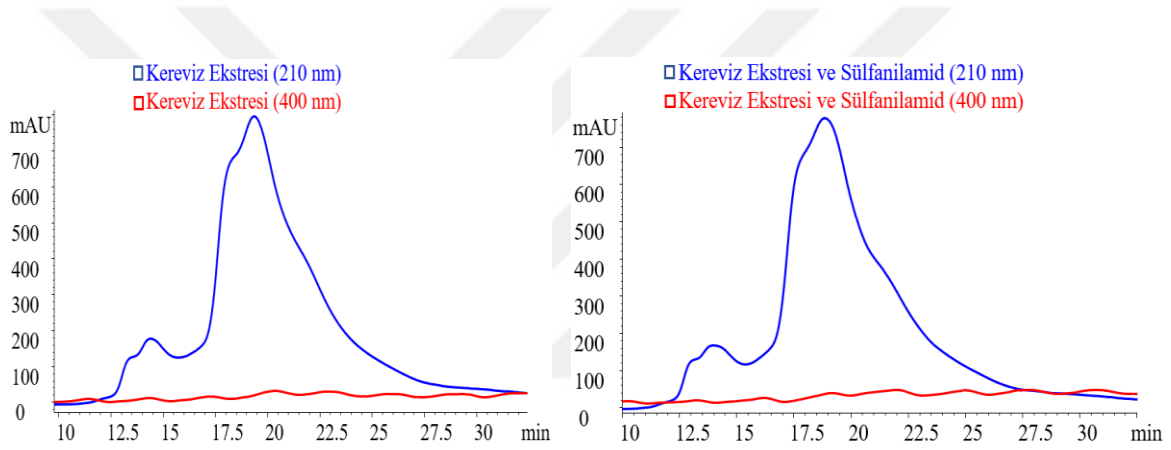
Taze olarak hazırlanan protein içeriği bilinmeyen bitki (ıspanak, brokoli ve kereviz) ve hayvan doku (sığır karaciğeri) ekstraktları, valide edilmiş on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemine optimum çalışma şartlarında (hareketli faz olarak pH' sı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu, 25 °C sıcaklık, 5 mM substrat (*p*-nitrofenilasetat) konsantrasyonu, 3 m tübing boyu, 0,3 mL/dk şırınga pompa akış hızı ve 0,5 mL/dk HPLC pompa akış hızı) enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilerek boyut dışlama kolonu ile proteinlerin 210 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı gerçekleştirildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesi gösteren piklerin yüksekliklerini ve pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedildi. Esteraz aktiviteleri 400 nm dalga boyunda pik alanları üzerinden tespit edilen bitki (ıspanak, brokoli ve kereviz) ve hayvan doku (sığır karaciğeri) ekstraktları, CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid çözeltisi (18 µM son konsantrasyonlu) ile reaksiyona sokularak inhibisyon takip edildi. Ispanak, brokoli ve kereviz ekstrelerinden alınan proteinlerin düşük esteraz aktivitesine sahip olduğu ve CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid varlığında bu aktivitenin değişmediği tespit edildi (Şekil 86-88). Sığır karaciğer ekstresinden alınan proteinlerin ise yüksek esteraz aktivitesine sahip olduğu fakat CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid varlığında bu aktivitenin değişmediği tespit edildi (Şekil 89). Bu durum hem bitki hem de hayvan dokularında CA dışı esteraz aktivitesi gösteren proteinlerin varlığını göstermektedir.



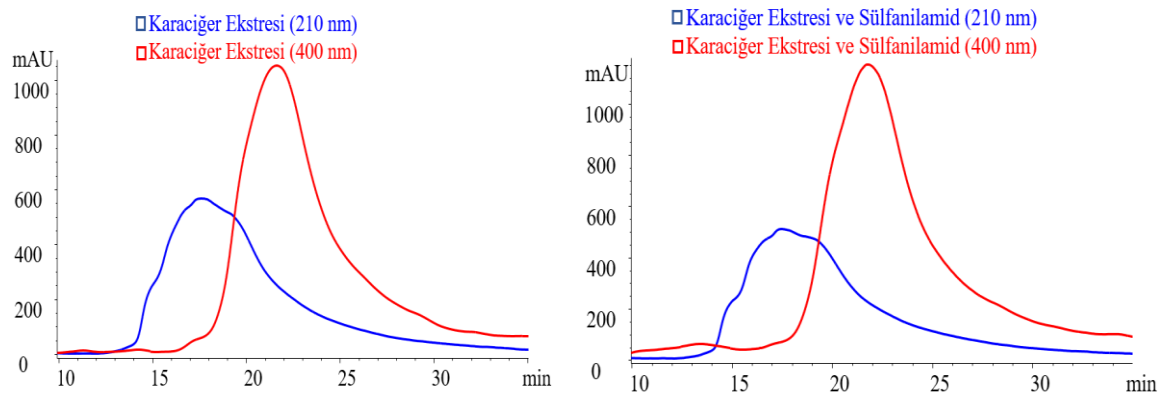
Şekil 86. Ispanak ekstresinin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 µM son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



Şekil 87. Brokoli ekstresinin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



Şekil 88. Kereviz ekstresinin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar



Şekil 89. Sığır karaciğer ekstresinin 210 nm de kromatografik ayrımını ve inhibitörsüz ve 18 μ M son konsantrasyonlu inhibitör (sülfanilamid) içeren substrat çözeltileriyle reaksiyonu sonucu 400 nm de esteraz aktivitesini gösteren kromatogramlar

3.5.4. On-line HPLC-CA Enzim Tayin Yönteminin Pik Alanları Üzerinden Verilen Esteraz Aktivite Değerlerinin Enzim Ünitesine Dönüştürülmesi

Enzim ünitesi (U), 25 °C de, bir dakikada, optimal koşullar altında 1 mikromol substratı ürüne dönüştüren enzim miktarıdır. Enzim ünitesinin tanımından yola çıkarak optimum şartlar altında bir dakikada spektrofotometrik ürün oluşumu, absorbans değişimi üzerinden takip edildi. 0,2 mg/mL BCA enzimi, pH' ı 8,2 olan 0,15 M fosfat tamponu varlığında taze hazırlanmış 5 mM substrat çözeltisiyle reaksiyona sokulur sokulmaz 400 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okuma yapıldı. Sonrasında on beş saniye aralıklarla sekiz dakika boyunca ölçüm yapılarak absorbans değerleri kaydedildi. Grafik üzerinden doğrusallıktan sapmayan değerler kullanılarak dakikadaki absorbans değişimlerinin ortalaması 0,16 olarak belirlendi. Beer-ambert yasası ($A = \epsilon \times l \times c$) üzerinden *p*-nitrofenolün molar absorptivite değeri ($18320 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) ve dakikadaki absorbans değişimi (0,16) aşağıda verilen formülde yerine konularak enzim ünitesi spektrofotometrik şartlarda 498 U/L olarak hesaplandı (Bowers vd., 1980). Aynı şartlar altında aynı çalışma reaksiyon gerçekleştirildikten sonra FIA modunda HPLC sistemine uygulandı ve grafik üzerinden doğrusallıktan sapmayan değerler kullanılarak dakikadaki pik alanı değişimlerinin ortalaması 422 mAU x dk olarak belirlendi (Şekil 90). Dakikadaki ortalama pik alanı değişimine (422 mAU x dk) karşılık gelen enzim ünitesi (498 U/L) üzerinden 1 enzim ünitesinin pik alanı karşılığı 0,85 mAU x dk olarak belirlendi. Esteraz aktivitesine karşılık gelen pik alanları, 1 enzim ünitesine karşılık gelen pik alanına (0,85 mAU x dk) bölünerek sonuçlar enzim ünitesi şeklinde ifade edildi. Enzim ünitesinin tespiti aşağıdaki formül kullanılarak yapıldı.

$$U/L ((\mu\text{mol} / \text{dk}) / L) = [((\Delta A / \text{dk}) \times V_t \times 10^6 (\mu\text{mol} / \text{mol})) / (\epsilon \times V_s \times l)]$$

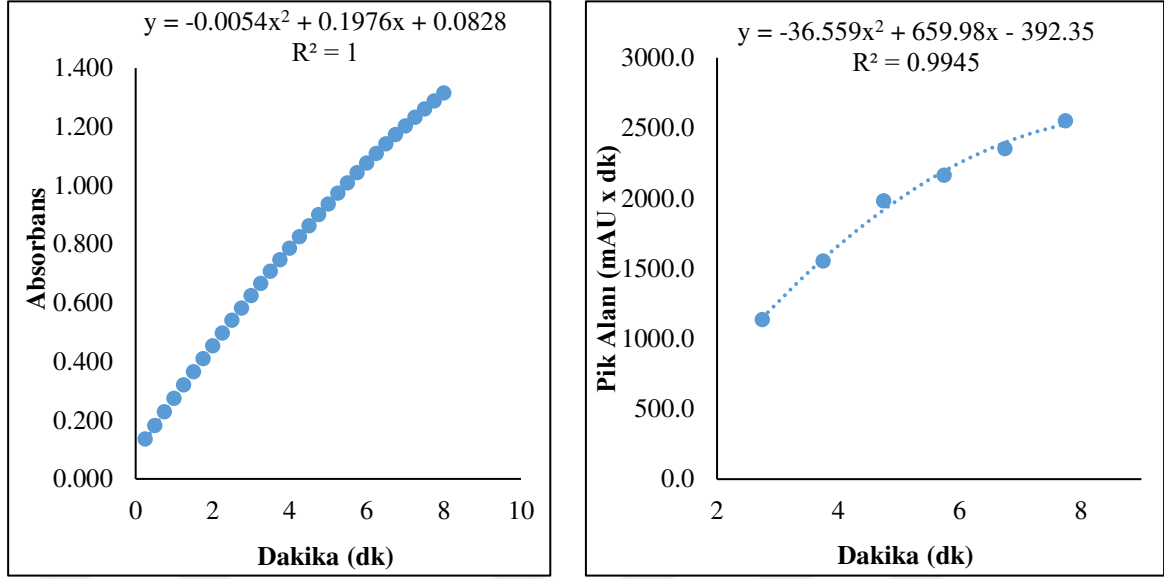
$\Delta A / \text{dk}$ = Dakikadaki absorbans değişimi

V_t = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_s = Örnek hacmi (mL)

l = Işığın geçtiği yol (cm)

ϵ = Molar absorptivite katsayısı ($\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)



Şekil 90. 0,2 mg/mL BCA enziminin 400 nm de spektrofotometrik ve kromatografik esteraz aktivitesinin zamana bağlı değişimini gösteren grafikler

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Karbonik anhidraz (CA, EC: 4.2.1.1), CO_2 ve HCO_3^- arasındaki karşılıklı dönüşümü katalizleyen aktif bölgesinde Zn^{+2} bulunan bir metaloenzimdir (Supuran, 2010). Katalizör olmadan da gerçekleşen bu dönüşüm karbonik anhidraz yokluğunda oldukça yavaş ilerlemektedir. Karbonik anhidraz, bu reaksiyonun hızını saniyede 10^4 ile 10^6 kat arasında farklı seviyelerde arttırmaktadır (Çoban vd., 2007).

Herhangi bir canlı organizmanın optimal işleyişi için kesinlikle gerekli olan CA tüm canlı organizma gruplarında bulunmaktadır. Şu anda bilinen altı farklı CA sınıfı (α , β , γ , δ , ζ ve η) mevcuttur. Bu sınıflandırma, proteinin amino asit dizisini, üç boyutlu yapısını, aktif bölgenin organizasyonunu ve katalitik özelliklerini dikkate alarak yapılmıştır. CA' lar kemik rezorpsiyonu, iyon ve karbondioksit taşınması, solunum, asit-baz dengesi, glukoneogenez, ürogenez, vücut sıvısı üretimi ve lipogenez gibi çeşitli önemli biyolojik mekanizmalara katılmaktadırlar (Caglayan vd., 2019). CA, gastrik mukoza, göz merceği, tükürük bezleri, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat, böbrek, uterus ve endometrium dokularında aktivite göstermekte olup ayrıca solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, yumurta kabuğunun oluşumunda, alglerde ve bitkilerin fotosentetik kloroplastlarında önemli rollere sahiptir (Testereci vd., 1999).

Ökaryotlar, hayvan, bitki ve mantar krallıklarının yanı sıra daha önce protistler olarak adlandırılan büyük bir gruba ait organizmaları da içermektedir. Ökaryotlar, bilinen altı CA sınıfından beş sınıfı (α , β , δ , ζ ve η) taşımaktadırlar. γ sınıfı CA' lar ise ökaryotlarda bulunmamaktadır. Memelilerin farklı doku ve hücrelerinde çeşitli oranlarda bulunan, 16 farklı (CAI-XIV) CA izoenzimi tespit edilmiştir (Supuran, 2010). En çok çalışılan CA enzim formları, büyük miktarlarda CO_2 ' nin taşınmasında yer alan ve eritrositlerde (CA I ve CA II) bulunan sitozolik CA' lardır (Kupriyanova vd., 2017). CA-I izoenzimi sitozolik bir protein olup insan eritrositlerinde bol miktarda bulunmaktadır. CA-I izoenzimine lens, ter bezleri, kornea epitelyumu, kalın bağırsağın epitelyumu ve adipoz dokuda da rastlanmaktadır. CA-II izoenzimi yüksek katalitik aktiviteye sahip olup insanda hemen hemen her doku veya organda mevcuttur. Bazı hücrelerin sitozolünde bulunan CA-II izoenzimi, dönüşümsüz körlüğe sebep olan glokomda aköz humor göz içi basıncının sağlanmasında oldukça önemli rol üstlenmektedir (Supuran, 2010). Mantar hücreleri α ve β sınıflarının CA' larına

sahiptirler. Bu enzimler farklı fizyolojik işlevleri yerine getirmektedirler. Fizyolojik rolü tam olarak bilinmeyen çok sayıda protozoa türü, η -CA taşıyan tek organizmadır. Ökaryotik fotoototroflarda, CA' ların ana rolü, fotosentez ve ilgili biyosentetik reaksiyonların düzenlenmesini sağlamaktır (Kupriyanova vd., 2017).

Bakteriler α , β , ve γ olmak üzere üç CA sınıfı taşımaktadırlar ve arkealara dahil olmayan tüm prokaryotları içermektedirler (Kupriyanova vd., 2017).

Arkealar, bilinen altı CA sınıfından sadece ikisini (β ve γ) içermektedirler. Bu CA' ların hücre içi işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Fotosentetik prokaryotlarda (siyanobakteriler), CA' lar CO₂ tutulma mekanizmasına katılmaktadırlar (Kupriyanova vd., 2017).

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi iki farklı yöntem kullanılarak ölçülebilmektedir. İlk yöntem in vitro koşullarda gerçekleştirilen esteraz aktivitesi yöntemi, ikinci yöntem ise CA enziminin fizyolojik aktivitesi olan hidrataz aktivitesi yöntemidir. Hidrataz aktivitesi yöntemi fizyolojik olarak daha değerli olsa da esteraz aktivite yöntemine göre daha düşük hassasiyetle çalışmaktadır.

Bu çalışmada, karbonik anhidraz enziminin aktivite tespiti esteraz aktivite tayin yöntemi üzerinden yapılmıştır. Bu yöntem, CA' nın substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenil asetatın ester bağlarını hidroliz etmesi sonucu oluşan *p*-nitrofenolün takibi esasına dayanmaktadır (Armstrong vd., 1966). *p*-nitrofenil asetat çözeltisi, suda çözünmediği için öncelikli olarak az miktarda DMSO' da çözülerek manyetik karıştırıcı üzerinde hızlıca karıştırılan saf suya yavaşça ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde % 20 seviyelerine kadar önemli bir inhibisyon etkisi göstermeyen DMSO, substratın çözünmesi işleminde tercih edilmiştir (Alkan Türkuçar, 2018).

CA' lar glokom, obezite, osteoporoz, epilepsi, yüksek irtifa hastalığı ve kanser tedavisi için ilaç geliştirme hedefleri olmuştur. CA' lar, özellikle prokaryotlardan ökaryotlara kadar tüm organizmalarda çok sayıda fizyolojik ve patolojik sürece dahil oldukları için araştırma noktasında geçmişten günümüze kadar oldukça fazla ilgi görmüştür. Son yıllarda, biyokimyasal, yapısal ve filogenetik çalışmalar yapmak için farklı kaynaklardan çeşitli CA' lar klonlanmış, saflaştırmış ve karakterize edilmiştir. Bu tür araştırmalar, makul bir saflık derecesine ve büyük miktarda enzime sahip CA' ları gerektirmektedir (Ozensoy vd., 2016). Son yıllarda ayrıca, bir hücre sistemi içinde bulunan çok sayıda bileşeni tanımlayabilen, miktarını belirleyebilen ve aktivite tespiti yapabilen teknolojiler geliştirmek için artan bir

aba oluşmuştur (Ingkaninan vd., 2000; Queiroz vd., 2005; Hirano vd., 2005; Haselberg vd., 2006; Shi vd., 2009; Malherbe vd., 2012; De Vega vd., 2015).

Analiz edilen karışımların karmaşıklığı, etkili bir ayırım ve aktivite tespiti için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu gereklilik bizi, çalışmamızda yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve bağlı bulunduğu on-line sistemler yardımıyla ayırım ve eş zamanlı CA tayini yapabilen yeni bir yöntem geliştirmeye yönlendirmiştir.

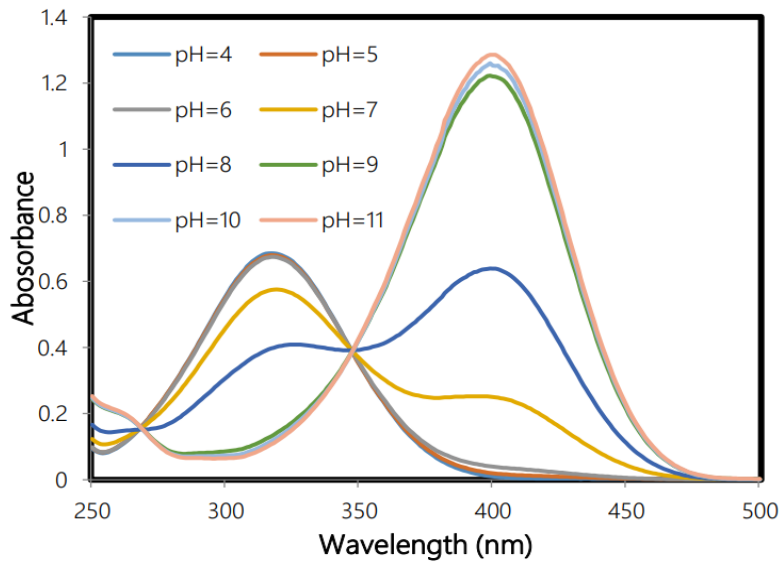
Çalışmada, on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemini geliştirebilmek adına çok sayıda spektrofotometrik ve kromatografik denemeler yapılmıştır. BCA enziminin esteraz aktivitesi ve esteraz aktivitesi üzerinden CA' nın standart inhibitörleri olan sülfanilamid ve asetazolamidin IC₅₀ değerleri spektrofotometrik şartlarda in vitro olarak incelenmiştir. Aktivite lm pH' sı 7,4 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu ve BCA enziminin bulunduğu ortama 3 mM *p*-nitrofenil asetat (substrat) zltisinin eklenmesiyle kinetik olarak yapılmıştır. Esteraz aktivitesi üzerinden yapılan inhibisyon çalışmasında sülfanilamid ve asetazolamid zltilerinin IC₅₀ değerleri daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak sırasıyla 7,83 μM ve 95,48 nM olarak bulunmuştur.

BCA enziminin esteraz aktivitesi ve BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sülfanilamidin IC₅₀ değeri HPLC ile FIA modunda da incelenmiştir. FIA modunda BCA enziminin esteraz aktivitesinin ölçümünde, hareketli faz olarak pH' sı 7,4 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponu kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki (2,0; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 ve 0,1 mg/mL) BCA enzimi enjeksiyon noktasından sisteme enjekte edilip ikinci bir pompa ile sisteme 3 mM *p*-nitrofenil asetat gönderildikten sonra meydana gelen reaksiyon sonucu oluşan pik alanı ve pik yükseklikleri takip edilerek esteraz aktivitesi belirlenmiştir. İnhibitörsüz substrat ve farklı konsantrasyonlarda (600, 450, 300, 240, 180, 120 ve 60 μM) sülfanilamid zltileri içeren substrat zltileri ile yapılan inhibisyon çalışmasında sülfanilamid zltisinin IC₅₀ değeri 4,21 μM olarak belirlenmiştir. Esteraz aktivitesi ve esteraz aktivitesi üzerinden inhibisyon çalışmalarının spektrofotometrik olarak belirlenmesinin ardından benzer sonuçların HPLC sisteminde FIA modunda da alınması yöntemin on-line sisteme uyarlanabileceğini göstermiştir.

On-line HPLC sisteminde, enjeksiyon noktasından sisteme gönderilen 5 mg/mL BCA enziminin ayırımı pH' sı 8,25 olan 0,05 M Tris-SO₄ tamponundan oluşan hareketli faz zltisi ile 0,7 mL/dk akış hızında boyut dışlama kolonundan kromatografik olarak gerçekleştirilmiştir. Protein ayırımına ait sinyal 230 nm dalga boyunda elde edilmiştir.

Protein ayrımını takiben 0,3 mL/dk akış hızıyla ikinci bir pompa ile sisteme gönderilen 3 mM *p*-nitrofenil asetat çözeltisi ile reaksiyon sonucu esteraz aktivitesine ait sinyal 348 nm dalga boyunda elde edilmiştir. 348 nm dalga boyunda elde edilen sinyalin BCA enziminin esteraz aktivitesine ait olduğu ise ikinci bir pompa ile sisteme gönderilen saf su ve inhibitörlü substrat çözeltilerinin aynı dalga boyunda verdiği sinyaller üzerinden tespit edilmiştir. Sisteme saf su gönderildiğinde hiçbir aktivite gözlenmezken, inhibitörlü substrat çözeltisi gönderildiği zaman aktivite sinyalinin azaldığı belirlenmiştir.

Esteraz aktivitesinin takibinde genellikle *p*-nitrofenolün izobestik noktası (348 nm) kullanılmaktadır. Literatürde, yapılan bir çalışmada *p*-nitrofenolün UV-VIS absorpsiyon spektrumu farklı pH değerlerinde takip edilmiş, absorpsiyonun pH 4-11 aralığında önemli ölçüde değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 191). 317 ve 400 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon sinyali elde edilen iki farklı tepe noktası gözlemlenmiştir. Absorpsiyon sinyalinin, pH 7 altındaki değerlerde 317 nm dalga boyunda, pH 8 üstündeki değerlerde 400 nm dalga boyunda çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Peng vd., 2016). Yapılan çalışma pH 8,2 değerinde gerçekleştirilmiş ve dalga boyu (348 ve 400 nm) seçiminin BCA enziminin esteraz aktivitesi üzerine etkisi kromatografik olarak araştırılmıştır. Esteraz aktivitesine ait sinyalin 400 nm dalga boyunda iki kat daha arttığı tespit edilmiştir ve bu dalga boyu optimum olarak belirlenmiştir.



Şekil 91. *p*-Nitrofenolün farklı pH değerlerindeki UV-Vis absorpsiyon spektrumu (Peng vd., 2016).

Esteraz aktivitesine sahip olmayan BSA proteininin, 230 nm dalga boyunda kromatografik ayrımı yapıldıktan sonra 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesi takibi yapılmıştır. Negatif kontrol olarak çalışılan BSA proteininin esteraz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, geliştirilen on-line HPLC sisteminin doğal numunelere vereceği tepkiyi öngörebilmek adına taze hazırlanan sığır karaciğeri ekstresinin 230 nm de kromatografik ayrımı ve takiben 400 nm dalga boyunda esteraz aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Sığır karaciğer ekstresinden protein ayrımının gerçekleştiği ve ayrımı yapılan bazı proteinlerin esteraz aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Protein ayrımı ve miktar tayini için 280 nm dalga boyundaki absorbanstan yaygın olarak yararlanılmaktadır. Fakat bu yöntem sadece fenilalanin, tirozin ve triptofan amino asitlerini içeren proteinlere uygulanabilmektedir. Tirozin ve triptofan amino asitlerini çok az içeren ya da içermeyen protein örneklerinin analizi ve miktarı peptit bağı üzerinden absorbans sinyali veren 205-210 nm dalga boyları seçilerek belirlenmektedir (Scopes, 1974).

Çalışmanın devamında on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemini geliştirmek adına tampon çözelti seçimi, tampon çözelti pH' sı, tampon çözelti sisteminin kompozisyonu, akış hızları ve substrat konsantrasyonu parametrelerinin esteraz aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Farklı tampon sistemlerinin (Tris-SO₄, fosfat ve asetat) esteraz aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Hareketli faz olarak fosfat tamponu kullanıldığı zaman hem protein ayrımının daha iyi olduğu hem de esteraz aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Hareketli faz olarak kullanılan tampon çözeltinin pH' sı arttıkça esteraz aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir. Fakat protein ayrımında kullandığımız boyut dışlama kolonunun en iyi etkiyi gösterdiği tampon çözelti pH' sının 3-8,5 aralığında olacak şekilde tasarlandığı bilindiğinden bu sınırların dışına çıkmamaya özen gösterilmiştir.

Boyut dışlama kolonlarında daha iyi bir ayırım ve dolayısıyla daha düzgün pikler görebilmek adına iyonik şiddetin etkisinin ortadan kaldırılması gerektiği ve bunun için de tampon çözelti kompozisyonuna genellikle KCl ilave edildiği belirlenmiştir. Fakat tampon çözelti kompozisyonunda KCl' nin varlığı durumunda esteraz aktivitesinin azaldığı, hatta KCl konsantrasyonu 0,4 M olunca aktivite kaybının %15 seviyelerine ulaştığı tespit edilmiştir.

HPLC sisteminde akış hızı azaldığı zaman hem kolonda ayrılan numunelerin dedektör önünden geçiş sürelerinin arttığı hem de detektöre varış zamanının uzamasıyla reaksiyonun daha ileri seviyede gerçekleştiği tespit edilmiştir. Reaksiyondan bağımsız olarak akış hızı 1

mL/dk' dan 0,7 mL/dk' ya düşürüldüğü zaman oluşan pikin alanı %52, 0,5 mL/dk' ya düşürüldüğü zaman oluşan pikin alanı %114 artış göstermiştir. Enzimatik reaksiyon varlığında ise akış hızı 1 mL/dk' dan 0,7 mL/dk' ya düşürüldüğü zaman oluşan pikin alanı %94, 0,5 mL/dk' ya düşürüldüğü zaman oluşan pikin alanı %228 artış göstermiştir. Dolayısıyla akış hızının azaltılması enzimatik reaksiyondan kaynaklanan sinyal artışına sebep olmaktadır.

Farklı substrat konsantrasyonlarında (3 ve 5 mM) esteraz aktivitesinden sorumlu pik yüksekliği ve pik alanları takip edilmiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça esteraz aktivitesinden sorumlu pikin yüksekliğinin ve alanının da arttığı görülmüştür.

Çalışmanın devamında geliştirilen on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, akış hızları, tampon çözelti seçimi, tampon çözelti konsantrasyonu, tampon çözelti pH' sı, reaksiyon sıcaklığı, tübing boyu ve substrat konsantrasyonu parametreleri üzerinden optimize edilmiştir.

Boyut dışlama kromatografisinde numune moleküllerinin difüzyon hızı ayırım performansını etkilemektedir. Ayırımı yapılan molekül ne kadar büyükse, difüzyon hızı o kadar yavaş olmaktadır. Bu yavaş difüzyon, artan akış hızı ile hızla genişleyen tepe noktalarına sebep olmaktadır. Boyut dışlama kromatografisi ile ayırımı yapılan moleküller de genellikle yüksek molekül kütlesine sahip olduğundan, ayırmalar yapılırken akış hızlarını minimumda tutmak önemlidir. Fakat çok düşük akış hızlarında analiz zamanı uzamakta, pik genişlemesi olmakta ve duyarlılık da düşmektedir (Ricker ve Sandoval, 1996). Bütün etkiler göz önünde bulundurularak benzer literatür çalışmaları değerlendirildiğinde protein ayırmaları için en ideal akış hızının 0,5 mL/dk olduğu tespit edilmiştir (Luo vd., 2019; Huang vd., 2018). Yapılan çalışmada HPLC pompanın farklı akış hızlarında (0,5; 0,7 ve 1 mL/dk) esteraz aktivitesinden sorumlu pik yükseklikleri ve pik alanları takip edilmiştir. HPLC pompanın akış hızı 0,5 mL/dk olduğu zaman en büyük pik yüksekliği ve pik alanına ulaşılmıştır ve bu değer optimum HPLC pompa akış hızı olarak belirlenmiştir.

Şırınga pompanın farklı akış hızlarında (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk) esteraz aktivitesinden sorumlu pik yükseklikleri ve pik alanları takip edilmiştir. Şırınga pompanın akış hızı 0,3 mL/dk akış hızı seviyelerine kadar çıktığında pik yüksekliği ve pik alanlarının giderek arttığı, bu değerden sonra ya sabit kaldığı ya da azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca şırınga pompanın yüksek akış hızlarında gürültü artışının da fazla oluşu göz önünde bulundurularak optimum şırınga pompa akış hızının 0,3 mL/dk olmasına karar verilmiştir.

BCA enziminin esteraz aktivitesi tayin yönteminde sıklıkla tercih edilen Tris-SO₄ tamponu ile protein ayrımı ve aktivite çalışmalarında geniş yer bulan fosfat tamponu on-line HPLC-CA enzim tayin yönteminde esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanları ve pik yükseklikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Fosfat tamponu ile elde edilen pik alanı ve pik yükseklikleri, Tris-SO₄ tamponu ile elde edilen pik alanı ve pik yüksekliklerinin iki katı olması nedeniyle fosfat tamponu tercih edilen tampon çözelti olarak seçilmiştir.

Fosfat tamponunun farklı konsantrasyonlu (50, 100, 150 ve 200 mM) çözeltilerinde esteraz aktivitesinden sorumlu pik yükseklikleri ve pik alanları takip edilmiştir. Esteraz aktivitesinden sorumlu en yüksek pik alanı ve pik yüksekliğinin elde edildiği 150 mM değeri optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

0,15 M fosfat tamponunun farklı pH değerlerindeki (7; 7,4; 7,8 ve 8,2) hareketli faz sistemi ile elde edilen esteraz aktivitesinden sorumlu pik yükseklikleri ve pik alanları takip edilmiştir. 400 nm dalga boyunda elde edilen absorpsiyon sinyali, pH 10 seviyelerinde oldukça yüksek olmasına rağmen (Peng vd., 2016), protein ayrımında kullandığımız boyut dışlama kolonunun optimum ayırım pH'ının 3-8,5 aralığında olması nedeniyle yüksek pH seviyelerine çıkılamamıştır. En yüksek pik alanı ve pik yüksekliğinin elde edildiği ve kolonun çıkılabilecek üst sınırı olan 8,2 pH değeri optimum olarak belirlenmiştir.

1 mg/mL BCA enzim çözeltisinin farklı sıcaklık değerlerinde (25, 30, 35, 40, 45, 50 °C) esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri takip edilmiştir. 45 °C seviyelerine kadar esteraz aktivitesinin giderek arttığı ve sonrasında düşüşe geçtiği tespit edilmiştir. En büyük pik alanı ve pik yüksekliğine sahip olan sıcaklık değerinin 45 °C olduğu görülmüştür. Yüksek sıcaklıklarda reaksiyonun çok daha hızlı gerçekleşmesi aktivitenin de daha yüksek çıkmasına sebep olmuştur. Ancak yüksek sıcaklıklarda hem gürültünün daha fazla olması hem de reaksiyonun erken tamamlanması dedeksiyon sınırını düşürmüştür. CA konsantrasyonunun düşük olduğu çözeltilerde tespit ve tayin yapabilmek adına 25 °C değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir. Fakat yüksek konsantrasyonlu çözeltilerle çalışılırken aktivite sinyalini arttırmak adına yüksek sıcaklıklar tercih edilebilir.

Farklı uzunluklara (2; 2,5 ve 3 m) sahip tübingler kullanılarak BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanları ve pik yükseklikleri tespit edilmiştir. Tübing boyu 2 m seviyelerinin altında olduğu zaman reaksiyonun gerçekleşmesi adına yeterli sürenin oluşmadığı, 3 m seviyelerinin üstünde olduğu zaman ise pik yayvanlaşmasının olduğu tespit edilerek bu seviyeler arasındaki uzunluk değerleri kullanılmıştır. Tübing boyunun uzunluğu

hem karışma oranını, hem de reaksiyon süresini arttırmaktadır. En yüksek pik alanına ve pik yüksekliğine sahip olan 3 m tübing boyu optimum olarak belirlenmiştir.

Farklı konsantrasyonlu (3, 4 ve 5 mM) substrat (*p*-nitrofenil asetat) çözeltileri kullanılarak BCA enziminin esteraz aktivitesinden sorumlu pik alanları ve pik yükseklikleri kromatografik olarak on-line HPLC sistemi ile tespit edilmiştir. Substrat konsantrasyonu arttıkça esteraz aktivite sinyalinin de arttığı belirlenmiştir. Fakat yüksek konsantrasyonlu substrat çözeltilerinin hazırlanmasında çözünürlük problemleri gözlemlenmiştir. 6 mM konsantrasyonlu substrat çözeltisi hazırlanmış olsa da şırında içerisinde pompa ile sisteme gönderilirken çökelmelerin olduğu tespit edilmiştir. On-line HPLC sisteminde çalışılabilen en yüksek konsantrasyon olan 5 mM optimum olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın devamında optimize edilen on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi doğrusallık, doğrusal aralık, tespit (LOD) sınırı, tayin (LOQ) sınırı, kesinlik ve sağlamlık parametreleri üzerinden valide edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) hazırlanmış olan BCA enzim çözeltisi, optimum çalışma şartlarında sisteme enjekte edilerek 210 nm dalga boyunda kromatografik protein ayrımı ve takibinde substratla meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedilmiştir. BCA enzim konsantrasyonunun 6 mg/mL seviyelerine kadar doğrusal aktivite sinyalinin devam ettiği bu konsantrasyondan sonra yavaş yavaş doğrusallıktan sapma olduğu tespit edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 8,0 ve 10 mg/mL) hazırlanmış olan BCA enzim çözeltisi, optimum çalışma şartlarında sisteme enjekte edilerek 210 nm dalga boyunda kromatografik protein ayrımı ve takibinde substratla meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedilmiştir. 5 mg/mL BCA enzim konsantrasyon seviyesine kadar doğrusal aktivite sinyali ($R^2 = 0,9997$) tespit edilmiştir ve bu konsantrasyona kadar olan bölge doğrusal aralık olarak belirlenmiştir.

Optimum çalışma şartlarında, düşük konsantrasyonlu (0,2 mg/mL) BCA enzim çözeltisi sisteme enjekte edilerek 210 nm dalga boyunda kromatografik protein ayrımı ve takibinde substratla meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedilmiştir. Yapılan on bağımsız ölçümün pik alanlarının standart sapması 690,90 mAU x dk olarak bulunmuştur.

Standart sapma değeri 3 ile çarpılarak LOD' un pik alanına karşılık gelen sayısal değeri 2072,70 mAU x dk olarak belirlenmiştir.

Optimum çalışma şartlarında, düşük konsantrasyonlu (0,2 mg/mL) BCA enzim çözeltisi sisteme enjekte edilerek 210 nm dalga boyunda kromatografik protein ayrımı ve takibinde substratla meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedilmiştir. Yapılan on bağımsız ölçümün pik alanlarının standart sapması 690,90 mAU x dk olarak bulunmuştur. Standart sapma değeri 10 ile çarpılarak LOQ' un pik alanına karşılık gelen sayısal değeri 6909,05 mAU x dk olarak belirlenmiştir.

Doğrusal aralık sınırları içerisinde düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı konsantrasyonda (0,2 ve 4 mg/mL) BCA enzim çözeltisi sisteme enjekte edilerek 210 nm dalga boyunda kromatografik protein ayrımı ve takibinde substratla meydana gelen reaksiyon sonucu 400 nm dalga boyunda BCA enziminin esteraz aktivitesini gösteren pik alanlarını veren kromatogramlar kaydedilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik üzerinden değerlendirilen kesinliğin % bağıl standart sapma değerleri 0,2 mg/mL için sırasıyla 1,04 ve 0,50, 4 mg/mL için ise sırasıyla 0,75 ve 0,22 olarak tespit edilmiştir.

Yöntemin sağlamlığı akış hızı (0,48 ve 0,52 mL/dk), reaksiyon sıcaklığı (24,5 ve 25,5 °C), hareketli fazın pH' sı (8,15 ve 8,25) ve hareketli fazın konsantrasyonu (0,14 ve 0,16 M) üzerinde küçük değişiklikler yapılarak değerlendirilmiştir. Yöntemin en fazla etkilendiği parametrenin sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. Fakat yapılan küçük değişiklikler sonucunda tüm parametreler üzerindeki yüzde bağıl hatanın %5 seviyelerinin altında kalması yöntemin sağlamlığını göstermiştir.

Çalışmanın devamında, validasyonu tamamlanan on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemine protein içeriği bilinen standart protein karışımları ve protein içeriği bilinmeyen bitki ve hayvan dokuları uygulanmıştır. CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamidin BCA enzimini %50 oranında inhibe ettiği sülfanilamid konsantrasyonu (IC₅₀) geliştirilen bu yöntemle 2,1 µM olarak belirlenmiştir. Eşit konsantrasyonlu BCA ve Esteraz X enzim çözeltilerinin bulunduğu karışım, geliştirilen bu yöntemle uygulanmış ve her bir proteinin de esteraz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Esteraz aktivitesine sahip proteinleri içeren karışım, CA' nın standart inhibitörü olan sülfanilamid çözeltisi ile reaksiyona sokularak inhibisyon üzerinden CA' nın tayini yapılmıştır. Ayrıca protein içeriği bilinmeyen bitki ve hayvan dokularının da uygulandığı bu yöntem sayesinde esteraz aktivitesine sahip proteinler rahatlıkla tespit edilmiştir. Esteraz aktivitesine sahip proteinlerin hem bitki hem de hayvan

dokularında sülfanilamid çözeltisi ile inhibe olmaması bu çözeltilerde CA' nın bulunmadığını ya da ekstraksiyon işleminde dokularda bulunan CA' nın alınamadığını göstermiştir.

Çalışmanın son aşamasında, enzimatik reaksiyon sonucu üretilen *p*-nitrofenol miktarının takibi ile esteraz aktivitelerinden sorumlu olan pik alanları enzim ünitesi şeklinde ifade edilmiştir. On-line HPLC sisteminde hareketli faz kompozisyonunun ve akışının sabit oluşu alan ve aktivite arasında ilişki kurulabilmesine olanak vermiştir. Enzim ünitesi, spektrofotometrik şartlarda oluşan *p*-nitrofenolün dakikadaki absorbanı değişimi (0,16) üzerinden 498 U/L olarak bulunmuştur. Yapılan çalışma aynı şartlar altında FIA modunda HPLC sistemine uygulandığında dakikadaki pik alanı değişiminin 422 mAU x dk olduğu tespit edilmiştir. Dakikadaki ortalama pik alanı değişimine (422 mAU x dk) karşılık gelen enzim ünitesi (498 U/L) üzerinden 1 enzim ünitesinin pik alanı karşılığı 0,85 mAU x dk olarak belirlenmiştir. Esteraz aktivitesine karşılık gelen pik alanları, 1 enzim ünitesine karşılık gelen pik alanına (0,85 mAU x dk) bölünerek sonuçlar enzim ünitesi şeklinde ifade edilmiştir. Bu sabit değer, HPLC akış hızının 0,5 mL/dk ve şırınga pompa akış hızının 0,3 mL/dk olduğu HPLC sisteminde diğer bütün parametreler üzerinde değişiklik yapılsa bile kullanılabilir. Geliştirilen bu yaklaşım on-line HPLC-CA yönteminde kullanılırken substratın enjeksiyonu sonrası ikinci detektöre kadar geçen sürenin dikkate alınması gerekmektedir. Bu anlamda gerçek numunelerde her bir esteraz aktiviteli enzime ait tam bir aktivite değeri elde edilmek istendiğinde, aynı yöntemde standart enzim kullanılmasıyla elde edilecek aktivite üzerinden reaksiyon sarmalında geçen sürenin gerçekçi bir yaklaşımla hesaplamaya dahil edilmesi amacıyla korelasyon kurulmalıdır.

5. ÖNERİLER

Geliştirilen ve uygulanan on-line HPLC-CA enzim tayin yöntemi, protein ayrımı üzerinden aktivite tespiti yapılan ilk çalışma olarak literatüre kazandırılmıştır. Bu yöntem, bitki, hayvan, insan dokuları ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan esteraz aktivitesi gösteren proteinlerin belirlenip eş zamanlı karbonik anhidraz enzim tayininin yapılabilmesi ile literatürde önemli bir boşluğu dolduracaktır. Esteraz aktiviteli proteinlerin ve CA' nın tespitine hızlı ve kolay analiz imkanı veren bu yöntem, biyoaktif bileşen saflaştırılmasının yapıldığı sektörlerde ve biyoaktivite çalışmalarının yapıldığı araştırma laboratuvarlarında uygulanabilecektir. Geliştirilen yöntemde, şırınga pompa yerine HPLC pompa kullanılması sinyal gürültüsünün azalmasına sebep olacaktır. Bu da LOD ve LOQ değerlerinin düşmesiyle daha düşük konsantrasyonlardaki CA tayininin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Biz çalışmamızda protein ayrımının iyileştirilmesinden ziyade aktivite sinyalinin arttırılması ile ilgilendik. Geliştirilen yöntem daha iyi protein ayrımının yapılabilirdiği yeni nesil kolonlarda uygulanarak görseelliği çok daha güzel, proteinlerin etkin ayrımının görüldüğü kromatogramlar elde edilebilir. Ayrıca bu çalışmada sadece CA enzimin esteraz aktivitesinin on-line uygulanması yapılmıştır. CA enzimin hidrataz aktivitesinin de on-line HPLC sistemine uygulanabilir duruma gelmesi adına çalışma grubumuz tarafından planlamalar yapılmaktadır. Bu alanda uygulanan çalışmalar son zamanlarda sayısını arttırmakta olup önümüzdeki süreçte benzer ve daha kapsamlı birçok çalışma yapılabilir. Çalışma grubumuzun ilgi ve araştırma alanlarından birisi olan on-line HPLC uygulamaları ile farklı araştırma konuları üzerinden yeni planlamalar yapılmaktadır. Teknolojinin gelişimi ile birlikte cihaz fonksiyonu ve çeşitliliğinin giderek artması on-line HPLC uygulamalarına önemli bir katkı sağlayacaktır. Bu doğrultuda, kromatografik sinyal gürültüsünü ortadan kaldıracak pompa sistemlerinin, akışın yanı sıra karışmayı da sağlayacak reaksiyon sarmalları ya da diğer alternatiflerin ve tüm sistem için sıcaklık kontrolünün yapılabilirdiği izole HPLC sistemlerinin geliştirilmesi ihtiyaçları önemli ölçüde karşılayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Alber, B., E. ve Ferry, J., G., 1994. A Carbonic Anhydrase From the Archaeon *Methanosarcina thermophila*, P. Natl. Acad. Sci., 91, 6909-6913.
- Alkan Türkuçar, S., 2018. Yeni Bir On-line HPLC-CA İnhibitör Belirleme Yönteminin Geliştirilmesi ve Biyoaktif Bitki Ekstraktlarına Uygulanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Alterio, V., Di Fiore, A. ve D'Ambrosio, K., 2012. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?, Chem. Rev., 112, 4421-4468.
- Armstrong, J., M., Myers, D., V., Verpoorte, J., A. ve Edsall, J., T., 1966. Purification and properties of human erythrocyte carbonic anhydrase, Journal of Biological Chemistry, 214, 5137-5149.
- Arslan Burnaz, N., Küçük, M. ve Akar, Z., 2017. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods, Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 1052, 66-72.
- Bowers Jr, G., N., McComb, R., B., Christensen, R., G. ve Schaffer, R., 1980. High-purity 4-nitrophenol: purification, characterization, and specifications for use as a spectrophotometric reference material, Clinical chemistry, 26, 6, 724-729.
- Bradford M., M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem., 72, 248-254.
- Careri, M. ve Mangia, A., 2003. Analysis of food proteins and peptides by chromatography and mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1000, 1-2, 609-635.
- Caglayan, C., Taslimi, P., Türk, C., Kandemir, F. M., Demir, Y. ve Gulcin, I., 2019. Purification and characterization of the carbonic anhydrase enzyme from horse mackerel (*Trachurus trachurus*) muscle and the impact of some metal ions and pesticides on enzyme activity, Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 226, 108605.
- Çoban, T., A., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. ve Ekinçi, D., 2007. Morphine Inhibits Erythrocyte Carbonic Anhydrase in vitro and in vivo, Biol. Pharm. Bull., 30, 2257-2261.
- De Vega, R., G., Fernández-Sánchez, M., L., Iglesias, H., G., Prados, M., C. ve Sanz-Medel, A., 2015. Quantitative selenium speciation by HPLC-ICP-MS (IDA) and simultaneous activity measurements in human vitreous humor, Analytical and bioanalytical chemistry, 407, 9, 2405-2413.

- Doğan, H., 2015. Yeni Bir On-line HPLC İndikatör Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Mor Lahana Ekstraktına Uygulanması, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Eyupoğlu, O., E., 2017. HPLC ile Proteinlerin Ayrılmasında Deteksiyon Amaçlı Yeni On-Line Yöntemin Geliştirilmesi ve Gıda ve İlaç Analizinde Uygulanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Ferry, J., G., 2010. The gamma Class of Carbonic Anhydrases, Biochim. Biophys. Acta, 1804, 374-381.
- Grangeon, A., Clermont, V., Barama, A., Gaudette, F., Turgeon, J. ve Michaud, V., 2019. Development and validation of an absolute protein assay for the simultaneous quantification of fourteen CYP450s in human microsomes by HPLC-MS/MS-based targeted proteomics, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 173, 96-107.
- Haselberg, R., Hempen, C., van Leeuwen, S., M., Vogel, M. ve Karst, U., 2006. Analysis of microperoxidases using liquid chromatography, post-column substrate conversion and fluorescence detection, Journal of Chromatography B, 830, 1, 47-53.
- Hilvo, M., Tolvanen, M., Clark, A., Shen, B., Shah, G., N., Waheed, A., Halmi, P., Hanninen, M., Hamalainen, J., M., Vihinen, M., Sly, W., S. ve Parkkila, S., 2005. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase, Biochemical journal, 392, 1, 83-92.
- Hirano, Y., Tsunoda, M., Funatsu, T. ve Imai, K., 2005. Rapid assay for catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, Journal of Chromatography B, 819, 1, 41-46.
- Huang, T., Y., Chi, L., M. and Chien, K., Y., 2018. Size-exclusion chromatography using reverse-phase columns for protein separation, Journal of chromatography A, 1571, 201-212.
- Ingkaninan, K., De Best, C., M., Van Der Heijden, R., Hofte, A., J., P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U., R., Van der Greef, J. ve Verpoorte, R., 2000. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products, Journal of Chromatography A, 872, 1-2, 61-73.
- Issaq, H. J., 2001. The role of separation science in proteomics research, Electrophoresis, 22, 17, 3629-3638.
- Issaq, H. J., Fox, S., D., Mahadevan, M., Conrads, T., P. ve Veenstra, T., D., 2003. Effect of experimental parameters on the HPLC separation of peptides and proteins, Journal of liquid chromatography & related technologies, 26, 14, 2255-2283.
- Jung, S., Rickert, D., A., Deak, N., A., Aldin, E., D., Recknor, J., Johnson, L., A. ve Murphy, P., A., 2003. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein

- contents of soybean products, Journal of the American Oil Chemists' Society, 80, 12, 1169.
- Kandel, M., Gonall, A., G., Wong, S. ve Kondel, S., I., 1970. Some Characteristics Of Human, Bovine And Horse Carbonic Anhydrase As Revealed By Inactivation Studies, J. Biol. Chem., 245, 2444.
- Keha E., E. ve Küfrevioğlu Ö., İ., 2010. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum, 109-110.
- Kupriyanova, E., Pronina, N. ve Los, D., 2017. Carbonic Anhydrase-a Universal Enzyme of the Carbon-Based Life, Photosynthetica, 55, 1, 3-19.
- Larive, C., K., Lunte, S., M., Zhong, M., Perkins, M., D., Wilson, G., S., Gokulrangan, G., Williams, T., Afroz, F., Schöneich, C., Derrick, T., S., Middaugh, C., S. ve Bogdanowich-Knipp, S., 1999. Separation and analysis of peptides and proteins, Analytical chemistry, 71, 12, 389-423.
- Liljas, A. ve Laurberg, M., 2000. A Wheel Invented Three Times. The Molecular Structures of the Three Carbonic Anhydrases, EMBO Reports, 1, 1, 16-17.
- Luo, Y., Ronk, M., Joubert, M., K., Semin, D., ve Nashed-Samuel, Y., 2019. Determination of interactions between antibody biotherapeutics and copper by size exclusion chromatography (SEC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP/MS), Analytica chimica acta, 1079, 252-259.
- Malherbe, C., J., Beer, D. ve Joubert, E., 2012. Development of On-Line High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Biochemical Detection Methods as Tools in the Identification of Bioactives, Int. J. Mol. Sci., 13, 3101-3133.
- Manco, G., Nucci, R. ve Febbraio, F., 2009. Use of esterase activities for the detection of chemical neurotoxic agents, Protein and peptide letters, 16, 10, 1225-1234.
- Ohm, J. B., Hareland, G., Simsek, S. ve Seabourn, B., 2009. Size-exclusion HPLC of protein using a narrow-bore column for evaluation of breadmaking quality of hard spring wheat flours, Cereal chemistry, 86, 4, 463-469.
- Ozensoy Guler, O., Capasso, C. ve Supuran, C. T., 2016. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization, Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 31, 5, 689-694.
- Pastarekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J. ve Supuran, C. T., 2004. Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 19, 199-229.
- Peng, Y., Fu, S., Liu, H. ve Lucia, L. A., 2016. Accurately Determining Esterase Activity via the Isosbestic Point of p-Nitrophenol, BioResources., 11, 4, 10099-10111.
- Ricker R., D. ve Sandoval L., A., 1996. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules, Journal of Chromatography A, 743, 1, 43-50.

- Queiroz, E., F., Ioset, J., R., Ndjoko, K., Guntern, A., Foggin, C., M. ve Hostettmann, K., 2005. On-line identification of the bioactive compounds from *Blumea gariepina* by HPLC-UV-MS and HPLC-UV-NMR, combined with HPLC-micro-fractionation, Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques, 16, 3, 166-174.
- Rowlett, R., S., 2014. Structure and Catalytic Mechanism of β -carbonic Anhydrases. Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. - In: Frost, S. C., McKenna, R. (ed.), Subcell. Biochem. Springer 53-76.
- Sapan, C., V. ve Lundblad, R., L., 2015. Review of methods for determination of total protein and peptide concentration in biological samples, PROTEOMICS–Clinical Applications, 9, 3-4, 268-276.
- Scopes R., K., 1974. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm, Analytical Biochemistry, 59, 1, 277-282.
- Seipke, G., Müllner, H. ve Grau, U., 1986. High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC) of Proteins [New Analytical Methods (29)], Angewandte Chemie International Edition in English, 25, 6, 535-552.
- Shi, S., Y., Zhang, Y., P., Jiang, X., Y., Chen, X., Q., Huang, K., L. ve Zhou, H., H., 2009. Coupling HPLC to on-line, post-column (bio) chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28, 7, 865-877.
- Skoog, D., A., ve Leary, J., J., 1992. Principles of Instrumental Analysis, Fourth Edition, Saunders College Publishing, USA, 628-629.
- Smith, K., S. ve Ferry, J., G., 2000. Prokaryotic Carbonic Anhydrases, FEMS Microbiol. Rev., 24, 335-366.
- Supuran, C., T. ve Scozzafava, A., 2001. Carbonic Anhydrase Inhibitors, Current Medicinal Chemistry, 1, 61-97.
- Supuran, C., T. ve Scozzafava, A., 2007. Carbonic Anhydrases as Targets for Medicinal Chemistry, Bioorgan. Med. Chem., 15, 4336-4350.
- Supuran, C., T., 2010. Carbonic anhydrase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 20,12, 3467–74.
- Supuran, C., T., 2016. Structure and function of carbonic anhydrases, Biochemical Journal, 473, 14, 2023-2032.
- Swartz, M., 2010. Hplc Detectors: A Brief Review, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33, 9-12, 1130-1150.

- Testereci, H., Sekin, S. ve Ekin, S., 1999. A study on esterase activity of carbonic anhydrase from Van Lake fish (*Calcalburnus tarichi*), Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 23(EK1), 145-154.
- Verpoorte, J., A., Mehta S. ve Edsall J., T., 1967. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C, Journal of Biological Chemistry, 242, 4221-4229.
- Warburg O. ve Christian W., 1941. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, Die Naturwissenschaften, 29, 39, 589-590.
- Wilbur, K., M. ve Anderson, N., G., 1948. Electrometric and Colorimetric Determination Of Carbonic Anhydrase, J. Biol. Chem., 176, 147-154.



ÖZGEÇMİŞ

İlkokul ve ortaokulu Mareşal Fevzi Çakmak İlköğretim Okulu' nda 2003 yılında, liseyi ise Ahmet Can Bali Lisesi' nde 2006 yılında tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü' ne girdi. Bir yıl lisans öncesi İngilizce hazırlık okuduktan sonra 2013 yılında bu bölümden mezun oldu. 2016 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu' nda Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı. 2017 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalında Doktora eğitimine başladı. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

Yüksek Lisans Tezi

“Bitki özütleri ve doğal ürünlerin tereyağının bozunmasını önleyici olarak kullanılmaları”
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

Gültekin, E., **Kardil, U.**, Topaloğlu, Y., Ocak, M., Yıldırım, N., Alkan, S. ve Bekircan, O., 2017. Synthesis of some new 1, 2, 4-triazole derivatives, investigation of their fluorescence properties and biological activities, Karadeniz Chemical Science and Technology, 1, 36-42.

Saral, A., **Kardil, U.** ve Düzgün, A. Ö., 2019. Antibacterial Activity of DMSO Extracts of Selected Plants Against Antibiotic Resistant Clinical Isolates, Erzincan University Journal of Institute of Science, 12, 2, 576-584.